



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



## **Impacto da gestação e da pielonefrite na atividade dos transportadores de ânions orgânicos (OAT) 1 e 3**

**JULIA CRISTINA COLOMBARI**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP, como requisito para aprovação em TCC IV.

Área: Toxicologia

Orientadora: Profa. Dra. Vera Lucia Lanchote

Ribeirão Preto

2023

**Julia Cristina Colombari**

**Impacto da gestação e da pielonefrite na atividade dos transportadores de ânions orgânicos (OAT) 1 e 3**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP, como requisito para aprovação em TCC IV.

Orientadora: Profa. Dra. Vera Lucia Lanchote

Ribeirão Preto

2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Este trabalho foi autorizado pela Comissão de Graduação da FCFRP/USP

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Julia Cristina Colombari**

### **IMPACTO DA GESTAÇÃO E DA PIELONEFRITE NA ATIVIDADE DOS TRANSPORTADORES DE ÂNIONS ORGÂNICOS (OAT) 1 E 3.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão  
Preto/USP, como requisito para aprovação em  
TCC IV.

Orientadora: Profa. Dra. Vera Lucia Lanchote

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Ribeirão Preto

2023

Dedico este trabalho aos meus pais, Danila Cristina M. Colombari e Marcelo Colombari, e minha irmã, Laura C. Colombari, por investirem em mim e apoiarem meus sonhos. Sem eles nada seria possível.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha orientadora Profa. Dra. Vera Lucia Lanchote, por me aceitar em seu laboratório de braços abertos. Obrigada pela compreensão, paciência e conselhos. Obrigada por ser uma inspiração de profissional e mulher para mim. Obrigada por ser um exemplo de força, dedicação e coragem. Seu papel foi muito importante para o meu crescimento profissional e pessoal. Obrigada por me mostrar a beleza da farmacocinética através da sua paixão.

Ao Prof. Dr. João Paulo Bianchi Ximenez por ter me ajudado tanto mesmo em tão pouco tempo. Por me incentivar, me mostrar caminhos, pelos conselhos e por sempre me acalmar. Todas as conversas me fizeram ter mais certeza do caminho que quero. Obrigada por ser um modelo de profissional e pessoa.

Ao Dr. Jhohann Richard de Lima Benzi por todos os ensinamentos passados. Obrigada por todas as dicas e por ter paciência e leveza de me ensinar. Obrigada por me aceitar no seu projeto, ele foi muito especial para a minha formação. Minha graduação foi muito mais leve, principalmente na pandemia, graças as nossas reuniões.

Ao Dr. Glauco Henrique Balthazar Nardotto por permitir que eu auxiliasse em sua pesquisa, por compartilhar seus conhecimentos e por ter me ensinado muito.

Aos membros do Laboratório de Farmacocinética Clínica da FCFRP, Dra. Adriana Rocha e Dra. Maria Paula Marques Pereira pela paciência para ensinar os procedimentos do laboratório, pelo suporte na utilização das ferramentas necessárias à realização deste trabalho e por todas as orientações.

Aos meus companheiros de laboratório Alef, Ana Flavia, Lucas, Marta, Matheus, Tiago e Valéria pelo compartilhamento de experiências e conhecimento. Obrigada por transformarem o ambiente de trabalho em um dos meus lugares favoritos e por todas as conversas que me motivaram a continuar o meu caminho.

Aos meus pais, Danila Cristina M. Colombari e Marcelo Colombari, por todo o suporte que me deram ao longo dos anos. Por apoiarem os meus sonhos, me levantarem nos momentos de dificuldade e por nunca me deixarem desistir. Obrigada por fazerem mais que o possível para que eu tivesse uma vida boa e pudesse focar nos meus estudos. Obrigada por me incentivarem, por enxugarem as minhas lágrimas e por me fazerem sorrir. Obrigada por serem exemplo de força, dedicação e bondade.

A minha irmã, Laura C. Colombari, por sempre me fazer querer ser uma pessoa melhor e por acreditar em mim. Por compreender os meus momentos de estresse, por fazer minha vida mais leve e alegre. Todas as risadas aliviaram as dificuldades do caminho. Tudo que sempre quis for ser um bom exemplo para você.

Aos meus tios, Prof. Dr. Eduardo Colombari e Profa. Dra. Débora Simões de Almeida Colombari, por todos os conselhos e conversas que me ajudaram a clarear meu futuro e seguir o que amo. Obrigada por serem um exemplo de profissionais para mim.

Aos meus amigos da graduação por terem feito a faculdade mais leve e fácil. Em especial a Giovanna (Valentina) por ter me apoiado sempre, por estar do meu lado nos momentos de

desespero e por sempre melhorar o meu dia. E ao Luiz por ter me apoiado e me ajudado mesmo não sendo sua área.

Aos meus amigos mais antigos por sempre me fazerem bem mesmo distante. Vocês influenciaram muito na pessoa que sou hoje. Em especial ao Renan que sempre me incentivou, me apoiou e acreditou em mim. Obrigada por sempre exaltar e incentivar o meu melhor. Por ser um exemplo de pessoa e profissional. Por me ajudar na graduação mesmo não sendo o seu curso e por todos os almoços ao longo dos anos que tiram um pouco do peso.

A minha psicóloga, Lydiane, por me ajudar a enfrentar as dificuldades, por me preparar para os momentos difíceis e por todos os conselhos.

Aos professores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto por todos os ensinamentos compartilhados.

A todas as participantes desta pesquisa, por aceitarem fazer parte do estudo. Sem vocês, ele não seria possível.

O estudo foi realizado com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – SP, Brasil (FAPESP) - processos nº 2018/05616-3 (Projeto Temático), nº 2021/00351-4.

## RESUMO

As gestantes apesar de excluídas dos estudos clínicos, podem requerer o tratamento com medicamentos durante a gravidez. As alterações fisiológicas ocorridas durante a gestação podem alterar os processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) dos medicamentos, dificultando a extrapolação dos regimes de dosagens de não gestantes para gestantes. Além disso, inflamações também podem resultar em alterações nos parâmetros de ADME dos fármacos, sendo considerada um importante fator na variabilidade da eficácia e toxicidade de medicamentos, visto que, a expressão e/ou a atividade de transportadores de fármacos podem ser alterados pelo aumento da concentração de múltiplas citocinas. Considerando que a atividade dos transportadores de ânions orgânicos (OATs) 1 e 3 são de grande importância na excreção renal e no regime de dosagem de fármacos, o presente estudo avalia a influência da gestação e da pielonefrite aguda nesses transportadores usando a furosemida como fármaco marcador. O método de análise da furosemida (FUR) e seu metabólito (glicuronídeo de furosemida) em plasma, ultrafiltrado de plasma e urina foi desenvolvido e validado empregando LC-MS/MS. A FUR foi eluída da coluna LiChrospher® 60 RP-Select B, empregando fase móvel em modo isocrático, em 7 minutos. Para a análise do ultrafiltrado de plasma e urina, utilizou-se a fase móvel em modo de gradiente, obtendo-se um tempo total de corrida cromatográfica de 15 minutos. As amostras foram analisadas nas concentrações de controles de qualidade e apresentaram os parâmetros de validação (precisão, exatidão, linearidade, seletividade, efeito matriz, efeito residual e estudos de estabilidade) dentro dos limites internacionais. Os dados obtidos permitem inferir que o método desenvolvido é preciso, exato, estável e com efeito matriz desprezível. Os métodos de análise da FUR e glicuronídeo de furosemida (FUR-GLI) foram aplicados em estudos de farmacocinética em participantes não gestantes e gestantes diagnosticadas com pielonefrite. As participantes foram divididas em três grupos: (1) Participantes gestantes diagnosticadas com pielonefrite aguda (Fase I, antes do tratamento: n = 10 e Fase II, após o tratamento: n = 7), (2) Participantes saudáveis não gestantes (n = 12) e (3) Participantes no segundo ou terceiro trimestre da gestação (n = 10, o grupo inclui as participantes de Fase II e três participantes recrutadas para atingir o tamanho amostral). Todas as participantes receberam dose única oral de furosemida 40 mg. As amostras seriadas de plasma e urina foram coletadas até 24 h após a administração do fármaco marcador para a análise da furosemida e glicuronídeo de furosemida. A análise farmacocinética foi realizada empregando o programa *Phoenix WinNonlin*®, versão 8.3.4.295 (Certara USA, Inc., Princeton, EUA). O programa R foi empregado na análise do teste de *Shapiro-Wilk* (distribuição normal ou não normal) e testes de *Mann-Whitney* (participantes não gestantes vs gestantes saudáveis) e *Wilcoxon* (gestantes com pielonefrite antes (Fase I) e após (Fase II) com valor de alfa de 5% (nível de significância). As participantes gestantes quando comparadas com as não gestantes não mostraram diferenças nos valores de  $CL_R$  (7,85 vs 6,09 L/h),  $CL_{SEC}$  (7,70 vs 6,05 L/h) e  $CL_M$  (2,47 vs 2,92 L/h), sugerindo que a eliminação renal da FUR não foi alterada pela gravidez, e portanto, as atividades de influxo dos OAT 1 e 3 não estão alteradas durante o terceiro trimestre da gestação. As participantes gestantes diagnosticadas com pielonefrite apresentaram menores valores medianos durante a Fase I em comparação com a Fase II no  $CL_R$  (4,08 vs 7,85 L/h),  $CL_{SEC}$  (3,95 vs 7,70 L/h) e  $CL_M$  (0,80 vs 2,47 L/h), sugerindo que a inflamação causada pela pielonefrite aguda, reduziu a atividade *in vivo* dos OAT 1 e 3 em aproximadamente 50%.

## ABSTRACT

Although pregnant women are excluded from clinical studies, they may require treatment with medications during pregnancy. The physiological changes that occur during pregnancy can alter the processes of absorption, distribution, metabolism and excretion (ADME) of drugs, making it difficult to extrapolate dosage regimens from non-pregnant to pregnant women. In addition, inflammation can also result in changes in the ADME parameters of drugs, being considered an important factor in the variability of drug efficacy and toxicity, since the expression and/or activity of drug transporters can be altered by increasing the concentration of multiple cytokines. Considering that the activity of organic anion transporters (OATs) 1 and 3 are of great importance in renal excretion and drug dosing regimen, the present study evaluates the influence of pregnancy and acute pyelonephritis on these transporters using furosemide as a marker drug. The method of analysis of furosemide (FUR) and its metabolite (furosemide glucuronide) in plasma, plasma ultrafiltrate and urine was developed and validated using LC-MS/MS. FUR was eluted from a LiChrospher® 60 RP-Select B column, using mobile phase in isocratic mode, in 7 minutes. For the analysis of plasma ultrafiltrate and urine, the mobile phase was used in gradient mode, obtaining a total chromatographic run time of 15 minutes. Samples were analyzed at quality control concentrations and presented validation parameters (precision, accuracy, linearity, selectivity, matrix effect, carry-over and stability studies) within international limits. The data obtained allow inferring that the developed method is precise, accurate, stable and with a negligible matrix effect. FUR and furosemide glucuronide (FUR-GLI) analysis methods were applied in pharmacokinetic studies in non-pregnant participants and pregnant women diagnosed with pyelonephritis. Participants were divided into three groups: (1) Pregnant participants diagnosed with acute pyelonephritis (Phase I, before treatment: n = 10 and Phase II, after treatment: n = 7), (2) Healthy non-pregnant participants (n = 12) and (3) Participants in second or third trimester of pregnancy (n = 10, group includes Phase II participants and three participants recruited to achieve sample size). All participants received a single oral dose of 40 mg furosemide. Serial plasma and urine samples were collected within 24 h after administration of the tracer drug for the analysis of furosemide and furosemide glucuronide. Pharmacokinetic analysis was performed using the Phoenix WinNonlin® program, version 8.3.4.295 (Certara USA, Inc., Princeton, USA). The R program was used to analyze the *Shapiro-Wilk test* (normal or non-normal distribution), the *Mann-Whitney test* (non-pregnant participants vs healthy pregnant women) and the *Wilcoxon test* (pregnant women with pyelonephritis before (Phase I) and after (Phase II) with an alpha value of 5% (significance level). Pregnant participants when compared to non-pregnant participants did not show differences in the values of  $CL_R$  (7.85 vs 6.09 L/h),  $CL_{SEC}$  (7.70 vs 6.05 L/h) and  $CL_M$  (2.47 vs 2.92 L/h), suggesting that the renal elimination of FUR was not altered by pregnancy, and therefore, the influx activities of OAT 1 and 3 are not altered during the third trimester of pregnancy. Pregnant participants diagnosed with pyelonephritis had lower median values during Phase I compared to Phase II at  $CL_R$  (4.08 vs 7.85 L/h),  $CL_{SEC}$  (3.95 vs 7.70 L/h) and  $CL_M$  (0.80 vs 2.47 L/h), suggesting that the inflammation caused by acute pyelonephritis reduced the in vivo activity of OAT 1 and 3 by approximately 50%.

## LISTA DE IMAGENS

Figura 1 – Procedimento de preparo de amostras de plasma para a análise da furosemida. ....	24
Figura 2 - Procedimento de preparo de amostras de hidrolisado de plasma para a análise da furosemida glicuronídeo.....	25
Figura 3 - Procedimento de preparo de amostras de plasma ultrafiltrado para a análise da furosemida. ....	26
Figura 4 - Procedimento de preparo de amostras de urina para a análise da furosemida. ....	27
Figura 5 - Estudo do tamanho amostral em relação ao poder do teste para estudo da farmacocinética da furosemida protocolo 1 (imagem de cima) e protocolo 2 (imagem de baixo). ....	33
Figura 6 - Representação do protocolo clínico para a avaliação do impacto da pielonefrite aguda em pacientes gestantes. ....	35
Figura 7 – Espectro de massas da furosemida monitorada na transição 328,95 > 285. ....	37
Figura 8 – Espectro de massas da furosemida glicuronídeo na transição 505,20 > 205,30. ....	38
Figura 9 – Espectro de massas do padrão interno furosemida deuterado monitorado na transição 333,9 > 290,05. ....	39
Figura 10 - Cromatogramas obtidos na análise de plasma branco. Analito furosemida (FUR) monitorado na transição 328,95 > 285 e padrão interno furosemida deuterado (FUR-D5) monitorado na transição 333,9 > 290,05. Tempo de retenção: 5,3 minutos. ....	40
Figura 11 - Cromatogramas obtidos na análise de plasma branco enriquecido na concentração do limite inferior de quantificação (LIQ; 0,5 ng/mL). Analito furosemida (FUR) monitorado na transição 328,95 > 285 e padrão interno furosemida deuterado (FUR-D5) monitorado na transição 333,9 > 290,05. Tempo de retenção: 5,3 minutos. ....	40
Figura 12 - Cromatogramas obtidos na análise de amostra de plasma de voluntário saudável (a amostra de plasma foi coletada 1 hora após a administração oral de 40mg de furosemida). Analito furosemida (FUR) monitorado na transição 328,95 > 285 e padrão interno furosemida deuterado (FUR-D5) monitorado na transição 333,9 > 290,05. Tempo de retenção: 5,2 minutos. ....	41
Figura 13 - Cromatogramas obtidos na análise de plasma branco com enzima. Analito furosemida (FUR) monitorado na transição 328,95 > 285 e padrão interno furosemida deuterado (FUR-D5) monitorado na transição 333,9 > 290,05. Tempo de retenção: 5,3 minutos. ....	41
Figura 14 - Cromatogramas obtidos na análise de plasma branco com enzima enriquecido na concentração do limite inferior de quantificação (LIQ; 0,5 ng/mL). Analito furosemida (FUR) monitorado na transição 328,95 > 285 e padrão interno furosemida deuterado (FUR-D5) monitorado na transição 333,9 > 290,05. Tempo de retenção: 5,3 minutos. ....	42
Figura 15 - Cromatogramas obtidos na análise de amostra de plasma de voluntário saudável (a amostra de plasma foi coletada 1 hora após a administração oral de 40mg de furosemida) adicionado de enzima. Analito furosemida (FUR) monitorado na transição 328,95 > 285 e padrão interno furosemida deuterado (FURD5) monitorado na transição 333,9 > 290,05. Tempo de retenção: 5,2 minutos. ....	42
Figura 16 - Tempos de incubação das amostras de plasma com a enzima para a análise da furosemida glicuronídeo. Série 1: 1,25 ng/ml; série 2: 1250 ng/ml e série 3: = 2500 ng/ml ....	43
Figura 17 - Cromatogramas obtidos na análise de plasma ultrafiltrado branco. Analito furosemida (FUR) monitorado na transição 328,95 > 285, glicuronídeo de furosemida monitorado na transição 505,20>205,30 e padrão interno furosemida deuterado (FUR-D5) monitorado na transição 333,9 > 290,05. Tempo de retenção: 8,2 e 11,5 minutos. ....	45
Figura 18 - Cromatogramas obtidos na análise de plasma ultrafiltrado branco enriquecido na concentração do limite inferior de quantificação (LIQ; 0,125 ng/mL). Analito furosemida (FUR) monitorado na transição 328,95 > 285, glicuronídeo furosemida monitorado na transição	

505,20>205,30 e padrão interno furosemida deuterado (FUR-D5) monitorado na transição 333,9 > 290,05. Tempo de retenção: 8,2 e 11,5 minutos. ....	46
Figura 19 - Cromatogramas obtidos na análise de amostra de plasma ultrafiltrado de voluntário saudável. Analito furosemida (FUR) monitorado na transição 328,95 > 285, FUR glicuronídeo monitorado na transição 505,20>205,30 e padrão interno FUR deuterado (FUR-D5) monitorado na transição 333,9 > 290,05. Tempo de retenção: 8,2 e 11,5 minutos.....	47
Figura 20 - Cromatogramas obtidos na análise de urina branco. Analito furosemida (FUR) monitorado na transição 328,95 > 285, glicuronídeo de furosemida monitorado na transição 505,20>205,30 e padrão interno furosemida deuterado (FUR-D5) monitorado na transição 333,9 > 290,05. Tempo de retenção: 8,2 e 11,5 minutos. ....	49
Figura 21 - Cromatogramas obtidos na análise de urina branco enriquecida na concentração do limite inferior de quantificação (LIQ; 0,05 µg/mL). Analito furosemida (FUR) monitorado na transição 328,95 > 285, glicuronídeo de furosemida monitorado na transição 505,20>205,30 e padrão interno furosemida deuterado (FURD5) monitorado na transição 333,9 > 290,05. Tempo de retenção: 8,2 e 11,5 minutos. ....	50
Figura 22 - Cromatogramas obtidos na análise de amostra de urina de voluntário saudável. Analito furosemida (FUR) monitorado na transição 328,95 > 285, glicuronídeo de furosemida monitorado na transição 505,20>205,30 e padrão interno furosemida deuterado (FUR-D5) monitorado na transição 333,9 > 290,05. Tempo de retenção: 8,2 e 11,5 minutos. ....	51
Figura 23 - Gráficos de concentração plasmática de furosemida vs tempo das participantes não gestantes saudáveis (n=12). ....	55
Figura 24 - Gráficos de concentração plasmática de furosemida vs tempo das participantes gestantes saudáveis (n=10). ....	57
Figura 25 - Gráfico de comparação da concentração plasmática de furosemida vs tempo das participantes gestantes saudáveis com não gestantes. Os dados estão indicados em mediana (intervalo interquartil). ....	58
Figura 26 - Parâmetros farmacocinéticos da furosemida que não apresentaram diferença estatística entre as participantes não gestantes (quadrados azuis; n = 12) e participantes gestantes (círculos laranja; n = 10) após dose única de 40 mg de furosemida, mas são importantes. Dados apresentados em mediana (intervalo interquartil). Grupos avaliados pelo teste de Mann-Whitney (p > 0,05). ....	59
Figura 27 - Parâmetros farmacocinéticos da furosemida que apresentaram diferença estatística entre as participantes não gestantes (quadrados azuis; n = 12) e participantes gestantes (círculos laranja; n = 10) após dose única de 40 mg de furosemida. Dados apresentados em mediana (intervalo interquartil). Grupos avaliados pelo teste de Mann-Whitney (p > 0,05). ....	60
Figura 28 - Gráficos de concentração plasmática de furosemida vs tempo das participantes gestantes com pielonefrite aguda – fase I (n=10). ....	63
Figura 29 - Gráficos de concentração plasmática de furosemida vs tempo das participantes gestantes com pielonefrite aguda – fase II (n=7). ....	64
Figura 30 - Gráfico de comparação da concentração plasmática de furosemida vs tempo das participantes gestantes com pielonefrite aguda de Fase I e Fase II. Os dados estão indicados em mediana (intervalo interquartil). ....	66
Figura 31 - Parâmetros farmacocinéticos da furosemida que apresentaram diferença estatística entre as participantes gestantes diagnosticadas com pielonefrite Fase I (quadrados azuis; n = 10) e Fase II (círculos laranja; n = 7) após dose única de 40 mg de furosemida. Dados apresentados em mediana (intervalo interquartil). Grupos avaliados pelo teste de Wilcoxon (p > 0,05). ....	67

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Analitos analisados e suas transições, energia do cone e energia de colisão.....	23
Tabela 2 - <i>Concentrações de furosemida e furosemida glicuronídeo nos controles de qualidade (CQ) utilizados na validação dos métodos bioanalíticos de plasma, plasma ultrafiltrado e urina.</i> .....	28
Tabela 3 - <i>Efeito matriz, linearidade, equação da reta e coeficiente de correlação (r<sup>2</sup>) do método de determinação de furosemida em plasma e hidrolisado de plasma.</i> .....	43
Tabela 4 - <i>Parâmetros de validação do método de determinação de furosemida em plasma e em hidrolisado.</i> .....	44
Tabela 5 - <i>Efeito matriz, linearidade, equação da reta e coeficiente de correlação (r<sup>2</sup>) do método de determinação de furosemida e de furosemida glicuronídeo em ultrafiltrado.</i> .....	48
Tabela 6 - <i>Parâmetros de validação do método de determinação de furosemida e furosemida glicuronídeo em ultrafiltrado de plasma.</i> .....	48
Tabela 7 - <i>Efeito matriz, linearidade, equação da reta e coeficiente de correlação (r<sup>2</sup>) do método de determinação de furosemida e de furosemida glicuronídeo em urina.</i> .....	52
Tabela 8 - <i>Parâmetros de validação do método de determinação de furosemida e furosemida glicuronídeo em urina.</i> .....	52
Tabela 9 - <i>Características demográficas das participantes gestantes (n=10) e não gestantes saudáveis (n=12). Os dados estão indicados em mediana (intervalo interquartil).</i> .....	53
Tabela 10 - <i>Parâmetros bioquímicos e hematológicos das participantes gestantes (n=10) e não gestantes saudáveis (n=12). Os dados estão indicados em mediana (intervalo interquartil).</i> .....	54
Tabela 11 - <i>Parâmetros farmacocinéticos da furosemida observados em participantes gestantes (n=10) e não gestantes saudáveis (n=12) após dose única de 40 mg de furosemida. Os dados estão indicados em mediana (intervalo interquartil).</i> .....	58
Tabela 12 - <i>Características demográficas das participantes gestantes com pielonefrite aguda. Os dados estão indicados em mediana (intervalo interquartil).</i> .....	61
Tabela 13 - <i>Parâmetros bioquímicos e hematológicos das participantes gestantes com pielonefrite aguda fase I (n = 10) e fase II (n = 7). Os dados estão indicados em mediana (intervalo interquartil).</i> .....	62
Tabela 14 - <i>Concentrações plasmáticas de citocinas observadas em pacientes gestantes diagnosticadas com pielonefrite aguda antes (Fase I) e depois (Fase II) do tratamento com cefuroxima 750 mg endovenosa. Dados apresentados em mediana (intervalo interquartil).</i> .....	62
Tabela 15 - <i>Parâmetros farmacocinéticos da furosemida observados em gestantes com pielonefrite aguda fase I (n = 10) e fase II (n = 7) após dose única de 40 mg de furosemida. Os dados estão indicados em mediana (intervalo interquartil).</i> .....	66

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- ®: Marca registrada
- ADME: absorção, distribuição, metabolismo, excreção
- Ae: Quantidade eliminada inalterada na urina
- ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- AUC: Área sob a curva concentração plasmática versus tempo
- BCRP: Breast Cancer Resistance Protein
- BDDCS: Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System
- CL/F: Clearance total aparente
- CL: Clearance total
- Clast: Última concentração determinada experimentalmente
- CLCR: Clearance de creatinina
- CLM: Clearance de formação de metabólito
- CLNR: Clearance não renal
- CLR: Clearance renal
- CLSEC: Clearance de secreção
- Cmax: Concentração plasmática máxima
- CQ: Controle de qualidade de baixa concentração
- CQA: Controle de qualidade de alta concentração
- CQB: Controle de qualidade de baixa concentração
- CQD: Controle de qualidade de diluição
- CQM: Controle de qualidade de média concentração
- CV: Coeficiente de variação
- CYP: Citocromo P 450
- DMET: Drug Metabolism Enzymes and Transporters
- E: Extraction ratio
- EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético
- EPR: Erro padrão relativo
- FDA: Food and drug administration
- Fe: Fração da dose eliminada na urina
- FMN: Fator matriz normalizado por padrão interno
- Fu: Fração livre
- FUR: furosemida
- FUR-GLI: glicuronídeo de furosemida
- HC-FMRPUSP: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
- HCl: ácido clorídrico
- HIV: Human immunodeficiency virus
- HPLC-MS/MS: Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em tandem
- IFN- $\gamma$ : Interferon gama
- IL: Interleucina
- ITU: Infecção do trato urinário
- Kel: Constante de eliminação da fase terminal
- LIQ: Limite inferior de quantificação
- LSQ: Limite superior de quantificação
- MCP: Proteína quimioatraente de monócitos

MDR1: Multidrug resistance mutation  
MRM Multiple reaction monitoring  
mRNA: RNA mensageiro  
MRP: Multi-Drug Resistance Protein  
NTCP: Na<sup>+</sup>-taurocholate cotransporting polypeptide  
OAT: Transportadores de ânions orgânicos  
OATP: Organic anion transporting polypeptides  
OCT: Organic cation transporter  
PCR: Proteína C reativa  
P-gp: Glicoproteína P  
pH: Potencial hidrogeniônico  
PI: Padrão interno  
pKa: Logaritmo da constante de acidez PK-PD: Farmacocinética-farmacodinâmica (PK-PD)  
r<sup>2</sup>: Coeficiente de correlação  
t<sub>1/2</sub>: Meia vida de eliminação  
T<sub>max</sub>: Tempo de observação da concentração plasmática máxima  
TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral alfa  
TR: Tempo de retenção  
UDPGA: Ácido uridina-difosfato glicurônico UGT: UDP-glicuronosil transferase  
UPC: Unidade de Pesquisa Clínica  
UPLC-MS/MS: Cromatografia líquida de ultra performance acoplada à espectrometria de massas  
V<sub>d</sub>: Volume de distribuição

# Sumário

1.	INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	17
2.	OBJETIVO .....	21
3.	MATERIAIS E MÉTODOS .....	21
3.1	Soluções padrão e reagentes .....	21
3.2	Preparação de soluções de estoque e de trabalho .....	21
3.3	Análise cromatográfica .....	22
3.4	Análise do ultrafiltrado .....	23
3.5	Métodos de preparo das amostras .....	23
3.5.1	Furosemida em plasma .....	23
3.5.1	Hidrolisado de furosemida em plasma .....	24
3.5.3	Otimização da hidrólise do glicuronídeo de furosemida em plasma .....	25
3.5.4	Análise da Furosemida e Glicuronídeo de furosemida em ultrafiltrado de plasma .....	26
3.5.5	Análise da Furosemida e Glicuronídeo de furosemida em urina .....	27
3.6	Validação dos métodos analíticos .....	27
3.6.1	Precisão e exatidão .....	28
3.6.2	Efeito matriz .....	28
3.6.3	Estabilidade do analito em matriz biológica .....	29
3.6.4	Linearidade .....	30
3.6.5	Efeito residual .....	30
3.6.6	Seletividade .....	30
3.6.7	Adsorção ao filtro .....	30
3.7	Métodos e protocolos clínicos .....	31
3.7.1	Critérios de inclusão e exclusão .....	31
3.7.2	Cálculo de tamanho amostral .....	32
3.7.3	Protocolo clínico .....	33
3.7.4	Determinação de citocinas em plasma .....	35
3.7.5	Análise farmacocinética não compartimental .....	35
3.7.6	Análise estatística .....	36
4.	RESULTADOS .....	36
4.1	Resultados das validações dos métodos analíticos em plasma .....	36
4.2	Resultados das validações dos métodos analíticos em plasma ultrafiltrado .....	44
4.3	Resultados das validações dos métodos analíticos em urina .....	49
4.4	Impacto da gestação .....	53
4.5	Impacto da pielonefrite aguda .....	61

5. DISCUSSÃO.....	67
<b>5.1 Métodos de validação</b> .....	67
<b>5.2 Impacto da gestação</b> .....	69
<b>5.3 Impacto da pielonefrite aguda</b> .....	71
6. CONCLUSÃO .....	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	74

# 1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As gestantes podem apresentar doenças crônicas (como asma, hipertensão, epilepsia, diabetes mellitus) ou podem desenvolver doenças associadas a gravidez (como diabetes gestacional e hipertensão) que requerem o uso de medicação, no entanto essa população é historicamente excluída dos estudos clínicos (ANDERSON; MOMPER, 2020, QUINNEY; BONATE, 2020). Aproximadamente 70% das gestantes relatam o uso de um medicamento durante a gravidez, enquanto uma proporção ainda maior relata o uso de mais de um medicamento durante o período da gravidez (QUINNEY; BONATE, 2020).

Estudos recentes clamam a inclusão de gestantes em estudos clínicos (QUINNEY; BONATE, 2020; KAZMA et al., 2020; ABDULJALIL et al., 2022; EKE et al., 2021; ANDERSON; MOMPER, 2020) e apresentam diretrizes especialmente para os estudos de farmacocinética, abordando desde os trimestres da gestação que devem ser incluídos até a apresentação dos resultados (EKE et al., 2021).

As alterações fisiológicas observadas durante a gestação resultam em alterações nos processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) dos medicamentos, dificultando a extrapolação de regimes de dosagens estabelecidos em não gestantes para gestantes (ANDERSON, 2005, TASNIF; MORADO; CONSTANTINE, 2014; HEBERT, 2016; KAZMA et al., 2020).

Na gestação, o aumento na concentração plasmática de progesterona ocasiona na diminuição da velocidade de esvaziamento gástrico e prolongamento do tempo de trânsito gastrointestinal em 30-50% (CONSTANTINE, 2014). Além disso, outras alterações (como náuseas e vômitos) podem resultar na diminuição da concentração plasmática máxima ( $C_{max}$ ) e no prolongamento do tempo para a observação da  $C_{max}$  ( $T_{max}$ ) (CONSTANTINE, 2014).

O aumento no volume de água corporal (de 6,5 – 8,5 L) e o aumento no volume sanguíneo durante a gestação podem modificar o volume de distribuição de fármacos hidrofílicos (CONSTANTINE, 2014; TASNIF; MORADO; HEBERT, 2016). A redução da concentração de albumina sérica e outras proteínas durante a gestação pode impactar a farmacocinética de medicamentos de baixo E (extraction ratio), de administração oral e intravenosa, altamente ligados às proteínas plasmáticas, resultando no aumento da fração livre e assim, no aumento da sua distribuição para os tecidos e aumento no clearance (CONSTANTINE, 2014; MATTISON; HALBERT, 2013). Assim, o aumento do peso e da gordura corporal, o aumento do volume plasmático e a redução da concentração plasmática de albumina podem resultar no aumento da distribuição e, por consequência, na diminuição da

concentração plasmática dos fármacos (ANDERSON, 2005; KAZMA et al., 2020). Já para fármacos que não são altamente ligados às proteínas do plasma alteração da fração livre não causa mudanças significativas em sua concentração plasmática (BENET; HOENER, 2002).

O aumento da frequência cardíaca (30-50%) observado no final da gestação resulta em aumento do fluxo sanguíneo, por consequência pode aumentar o clearance hepático de fármacos com alta razão de extração hepática administrados por via intravenosa (TASNIF; MORADO; HEBERT, 2016). Além disso, ocorrem alterações nas atividades das enzimas hepáticas metabolizadoras de fármacos, resultando na variação do metabolismo dependendo da enzima específica (KAZMA et al., 2020). Na gravidez as atividades das enzimas CYP3A, CYP2E1, CYP2D6, CYP2C9 e UGT1A4 estão aumentadas, já as atividades das enzimas CYP1A2 e CBR1 estão reduzidas (TASNIF; MORADO; HEBERT, 2016). Os medicamentos de baixo E, de administração oral e intravenosa, quando há aumento na atividade enzimática mostram diminuição da exposição plasmática (AUC) em função do aumento do clearance total (MATTISON; HALBERT, 2013).

O fluxo de sangue renal é aumentado na gestação, assim como a filtração glomerular (aproximadamente 50% desde o primeiro trimestre e continua durante toda a gestação), podendo resultar no aumento do clearance renal e na diminuição da meia-vida de eliminação de fármacos de excreção predominantemente renal (ANDERSON, 2005). A gestação também pode modificar a atividade dos transportadores renais P-glicoproteína (P-gp), transportador de cátions orgânicos 2 (OCT2) e transportador de ânions orgânicos 1 (OAT1)) (TASNIF; MORADO; HEBERT, 2016). Outro estudo sugere o aumento da atividade de OCT2, visto que o clearance de secreção tubular da metformina (fármaco marcador da atividade OCT2) é aumentado (38 a 45%) durante a metade e final da gravidez quando comparado com o período pós-parto (EYAL et al., 2010). Assim, sugerindo o aumento da eliminação renal por secreção ativa durante a gestação.

As infecções do trato urinário (ITU) são as infecções bacterianas mais comuns durante a gestação (SALEH et al., 2015). As gestantes são mais susceptíveis às formas sintomáticas de infecções urinárias devido a fatores mecânicos e hormonais que provocam alterações no trato urinário materno (DUARTE et al., 2008). A pielonefrite aguda, a principal causa de choque séptico na gravidez, é a complicação médica mais prevalente da gestação (1-2%), podendo resultar em morbidade e mortalidade fetal e materna (SALEH et al., 2015). A pielonefrite aguda é causada principalmente por bactérias gram-negativas da flora intestinal *Echerichia coli* (70%), dos gêneros *Enterobacter* e *Klebsiella* (3%) e do gênero *Proteus* e pelas bactérias gram positivas do gênero *Streptococcus* grupo B (10%) (SALEH et al., 2015;

JIM e GAROVIC, 2017). Devido a possibilidade de evolução para septicemia, o tratamento da pielonefrite aguda requer o uso de antibióticos pela via endovenosa e a hospitalização, sendo necessário o monitoramento dos sinais vitais da gestante (DUARTE et al., 2008, JIM e GAROVIC, 2017). Os antimicrobianos indicados para o tratamento da pielonefrite aguda na gestação é a cefuroxima (750mg), a cada oito horas, ou a ceftriaxona (1g), uma vez ao dia. O tratamento deve ser iniciado por via parenteral e só alterado para via oral após remissão do quadro clínico agudo por mais de 24-48 horas (DUARTE et a., 2008). Estudos clínicos realizados em mulheres não gestantes com pielonefrite mostram concentrações plasmáticas aumentadas das interleucinas (IL) 6 e 8, do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e da proteína C reativa (PCR) quando comparadas com as concentrações de referência em participantes saudáveis (HEDGES et al., 1992; JACOBSON et al., 1994; HORCAJADA et al., 2004), atingindo 2 a 19 vezes o valor basal quando comparadas com os níveis de referência (HORCAJADA et al., 2004).

A inflamação é considerada um importante fator na variabilidade da eficácia e toxicidade de medicamentos por resultar em alterações nos parâmetros de absorção, distribuição, metabolismo e excreção dos fármacos (LIPTROTT AND OWEN, 2011). Visto que, a expressão e/ou a atividade de transportadores de fármacos podem ser alterados pelo aumento da concentração de múltiplas citocinas como TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-6, entre outras, conforme demonstrados em estudos *in vitro* em modelos experimentais e clínicos (WRIGHT, 1997; AITKEN; RICHARDSON; MORGAN, 2006; MORGAN et al., 2009; FARDEL e VÉE, 2009; CRESSMAN; PETROVIC; PIQUETTE-MILLER, 2012; COLOMBO e RODRIGUES, 2015; SEIFERT et al., 2017; EVERS et al., 2018). Além disso, estudos relatam a alteração da atividade de transportadores e enzimas CYP devido a inflamação sistêmica causada por artrite reumatoide, leishmaniose visceral ou lúpus eritematoso sistêmico (LANCHOTE et al., 2015; CARIS et al., 2020; CESTARI et al., 2020).

A furosemida [ácido 4-cloro-2-(2-furilmetilamino) -5-sulfamoil-benzóico] apresenta  $pK_a = 3,9$ , sendo um ácido fraco praticamente insolúvel em água (BOLES PONTO e SCHOENWALD, 1990). A furosemida é um diurético potente utilizado no tratamento da hipertensão e edema associados a insuficiência cardíaca, renal e hepática (BOLES PONTO e SCHOENWALD, 1990).

O fármaco pode ser administrado por via oral, intravenosa ou intramuscular. É um medicamento geralmente seguro e prescrito com frequência para pacientes adultos e pediátricos, porém é recomendado o monitoramento cuidadoso para ajuste da dose visto que doses mais altas podem levar ao aumento da excreção de sódio, cloreto e água e, em alguns

casos, pode levar a efeitos tóxicos (CHAPA et al.; 2020; HUANG et al., 2016). Além disso, o fármaco é considerado seguro se usado com moderação em gestantes (GONÇALVES et al., 2020). A furosemida liga-se fortemente às proteínas plasmáticas (91-99%), particularmente em sítios aniônicos na albumina (HUANG et al., 2016). O fármaco apresenta biodisponibilidade aproximada de 60% (a absorção varia de 10-100%), isso se deve pela diferença na formulação, no pH gástrico e esvaziamento, ao momento da dosagem em relação à ingestão de alimentos e condições de doença (GONÇALVES et al., 2020; HUANG et al., 2016). A furosemida é eliminada predominantemente inalterada na urina (aproximadamente 65%), porém também é metabolizada via glicuronidação pela UGT1A9 e UGT1A1, resultando na formação de furosemida glicuronídeo (GONÇALVES et al., 2020; HUANG et al., 2016; KERDPIN et al., 2008). Além disso, os transportadores de ânions orgânicos (OAT) 1 e 3 são os responsáveis pela excreção renal do fármaco inalterado, enquanto a filtração glomerular é limitada devido à alta ligação do fármaco à proteína plasmática (CHAPA et al., 2020; GONÇALVES et al., 2020; HUANG et al., 2016).

Desta forma a atividade dos transportadores de ânions orgânicos (OATs) 1 e 3 são de grande importância na excreção renal e no regime de dosagem de fármacos. Portanto, o estudo visa avaliar a influência da gestação e da inflamação aguda causada pela pielonefrite nas atividades dos OATs 1 e 3 usando a furosemida como fármaco marcador (STOPFER et al., 2016; FDA, 2022).

A furosemida em plasma e urina humana foi determinada em diversos estudos empregando os sistemas HPLC-UV (ABOU-AUDA et al., 1998; BARANOWSKA; WILCZEK; BARANOWSKI, 2010; EL-SAHARTY ET AL., 2003; MILLS et al., 1997; NAGUIB et al., 2018; SNEDDEN; SHARMA; FERNANDEZ, 1982), HPLC-MS/MS (ABDEL-HAMID et al., 2000; DEVENTER; DELBEKE; VAN EENOO, 2002; THIEME et al., 2001; SIMONSEN et al., 2010; SORA et al., 2010; STOPFER et al., 2016; VEDAR et al., 2021) ou cromatografia gasosa (LINDSTROM e MOLANDER, 1974; MARGALHO et al., 2005). Para a determinação de furosemida em plasma ou urina por LC-MS/MS, a maioria das amostras foram preparadas por extração líquido-líquido (ABDEL-HAMID et al., 2000; ABOU-AUDA et al., 1998; DEVENTER; DELBEKE; VAN EENOO, 2002), mas há exemplos de preparação por extração em fase sólida (STOPFER et al., 2016; THIEME et al., 2001; VEDAR et al., 2021) e por precipitação de proteínas (SORA et al., 2010). Com base nesses e em outros estudos, foram desenvolvidos métodos precisos, exatos e seletivos para a análise da furosemida e seu metabólito glicuronídeo em plasma, plasma ultrafiltrado e urina com aplicação em estudos da furosemida como marcador da atividade dos OATs 1 e 3 em não

gestantes saudáveis e em gestantes diagnosticadas com pielonefrite e avaliadas antes e após o tratamento com antibióticos.

## 2. OBJETIVO

Desenvolver e validar métodos de análise da furosemida e seu metabólito glicuronídeo em ultrafiltrado de plasma, plasma e urina empregando LC-MS/MS. Avaliar a influência da gestação e da pielonefrite aguda na atividade *in vivo* dos transportadores OAT 1 e 3, empregando a furosemida como fármaco marcador.

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Soluções padrão e reagentes

Para o estudo foi utilizado acetonitrila (Biograde, Anápolis, GO, Brasil) grau HPLC, ácido fórmico (90.1 %, Phillipsburg, NJ, EUA) grau analítico e metanol (Phillipsburg, NJ, EUA) grau HPLC. Durante os experimentos, toda água utilizada foi obtida através do sistema de purificação Milli-QR Plus (Millipore Corp., Bedford, MA, EUA). Além disso, foi utilizado éter metil-terc-butílico (Fisher Scientific, Fair Lawn, New Jersey, EUA) grau HPLC e ácido clorídrico (J.T. Baker, Mexico) grau analítico. Para preparar o tampão acetato foi utilizado ácido acético (100%, Merck, Darmstadt, Germany) grau analítico e acetato de sódio (99,5%, J.T. Baker, Mexico) grau analítico. Utilizou-se padrão analítico de furosemida (FUR) (98%, Toronto Research Chemicals, Toronto, ON, Canada), padrão analítico do glicuronídeo de furosemida (FUR-GLI) (95%, TRC, Toronto, ON, Canada), padrão deuterado de FUR como padrão interno (PI) (98%, Toronto Research Chemicals, Toronto, ON, Canada) e enzima  $\beta$ -glicuronidase (Type HP-2, *Helix pomatia*, atividade glicuronidase  $\geq 100.000$  unidades/mL e atividade sulfatase  $\leq 7500$  unidades/mL; Sigma, St. Louis, EUA) para reação de hidrólise enzimática do FUR-GLI em plasma.

### 3.2 Preparação de soluções de estoque e de trabalho

A solução estoque de FUR foi preparada na concentração de 1 mg/mL e de FUR-GLI foi preparada na concentração de 0,4 mg/mL, ambas em metanol. As soluções de trabalho de furosemida e glicuronídeo de furosemida foram preparadas individualmente nas concentrações de 0,25; 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 25; 50; 100; 250; 500; 1000; 2500; 5000 ng por mL de metanol e utilizadas para construção das curvas de calibração de FUR em plasma (0,5; 1,25; 2,5; 5; 12,5; 25; 50; 125; 250; 500; 1250; 2500 ng por mL de plasma), FUR em

ultrafiltrado de plasma (0,125; 0,25; 0,5; 1,25; 2,5; 5; 12,5; 25; 50; 125; 250 ng por mL de ultrafiltrado de plasma), FUR em urina (50; 100; 200; 500; 1.000; 2.000; 5.000; 10.000; 16.000 e 20.000 ng/mL de urina), FUR-GLI em ultrafiltrado de plasma (0,125; 0,25; 0,5; 1,25; 2,5; 5; 12,5; 25; 50; 125; 250 ng por mL de ultrafiltrado de plasma) e FUR-GLI em urina (50; 100; 200; 500; 1.000; 2.000; 5.000; 10.000; 16.000 e 20.000 ng por mL de urina). A solução de PI foi feita na concentração de 0,1 mg/mL de metanol. O armazenamento das soluções foi a -20°C.

### 3.3 Análise cromatográfica

Realizou-se a determinação de FUR em plasma e em hidrolisado de plasma, assim como de FUR e FUR-GLI em ultrafiltrado de plasma e urina empregando o sistema de cromatografia líquida de ultra performance acoplada a espectrometria de massas (HPLCMS/MS). Foi utilizado o sistema cromatográfico composto por bomba quaternária ACQUITY HPLC<sup>®</sup> H-Class, injetor automático ACQUITY HPLC<sup>®</sup> Sample Manager – FTN equipado com organizador de amostras ACQUITY Sample Organizer, forno de coluna TCM/CHM<sup>®</sup> e espectrômetro de massas triplo quadrupolo XEVO TQ-S<sup>®</sup> equipado com interface por eletronebulização Zspray<sup>®</sup>, em modo negativo, todos Waters (Milford, CT, EUA). Foi utilizado como fase estacionária uma coluna LiChrospher<sup>®</sup> 60 RP-select B (5 µm, 125 × 4,6 mm; Merck, Darmstadt, Germany), a 20 °C, e uma pré-coluna LiChrospher<sup>®</sup> 60 RP-select B (5 µm, 4 x4 mm; Merck, Darmstadt, Germany). Para as análises de plasma e de hidrolisado de plasma utilizou-se a fase móvel de modo isocrático, com fluxo de 0,8 mL/min. A fase **A** era composta por uma solução aquosa de ácido fórmico 0,1 % e a fase **B** era composta por acetonitrila, na proporção de 50%A:50%B, resultando em tempos de retenção (TR) de 5,3 min para a FUR e 7 min como tempo total da corrida. Já para a análise de FUR e FUR-GLI em ultrafiltrado de plasma e urina utilizou-se fase móvel de modo gradiente, com fluxo de 0,8mL/min. A fase **A** era composta por uma solução aquosa de ácido fórmico 0,1% e a fase **B** por acetonitrila. O gradiente foi iniciado com 2% de A, mantido por 2 min e aumentado linearmente para 45% por 3 min e mantido novamente por 5,5 min. Então, o gradiente foi subitamente retomado às condições iniciais e mantido por 5 min para equilíbrio da coluna analítica. O gradiente resultou em tempo de retenção da FUR de 11,5 min e do FUR-GLI de 8,23 min, resultando em 15 min como tempo total de corrida.

A tabela 1 apresenta as condições utilizadas para a detecção da FUR, FUR-GLI e do PI, descrevendo os valores utilizados para energia do cone, energia de colisão, voltagem

do capilar, temperatura da fonte e de dessolvatação e pressão do gás de colisão. Executaram-se as análises no modo MRM (*multiple reaction monitoring*) sendo que as condições de otimização do MS/MS foram obtidas por infusão direta das soluções padrão dos analitos na concentração de 10 µg/mL de acetonitrila. A aquisição de dados e a quantificação das amostras foram realizadas utilizando o programa MassLynx versão 4.1 (Micromass, Manchester, Reino Unido).

**Tabela 1** – Analitos analisados e suas transições, energia do cone e energia de colisão.

Analitos	Transição (m/z)	Energia do cone (V)	Energia de colisão (eV)	Voltagem do capilar (kV)	Temperaturas da fonte e dessolvatação (°C)	Vazão do gás de colisão (mbar)	Vazão do gás de dessolvatação (L/h)
FUR	328,95 > 285,00	20	15	3,2	150 e 450	7,00 x 10 <sup>-3</sup>	900
PI	333,90 > 290,05	10	15	3,2	150 e 450	7,00 x 10 <sup>-3</sup>	900
FUR-GLI	505,20 > 328,70	20	15	3,2	150 e 450	7,00 x 10 <sup>-3</sup>	900

Nota: FUR: furosemida; PI: padrão interno deuterado de furosemida; FUR-GLI: glicuronídeo de furosemida.

### 3.4 Análise do ultrafiltrado

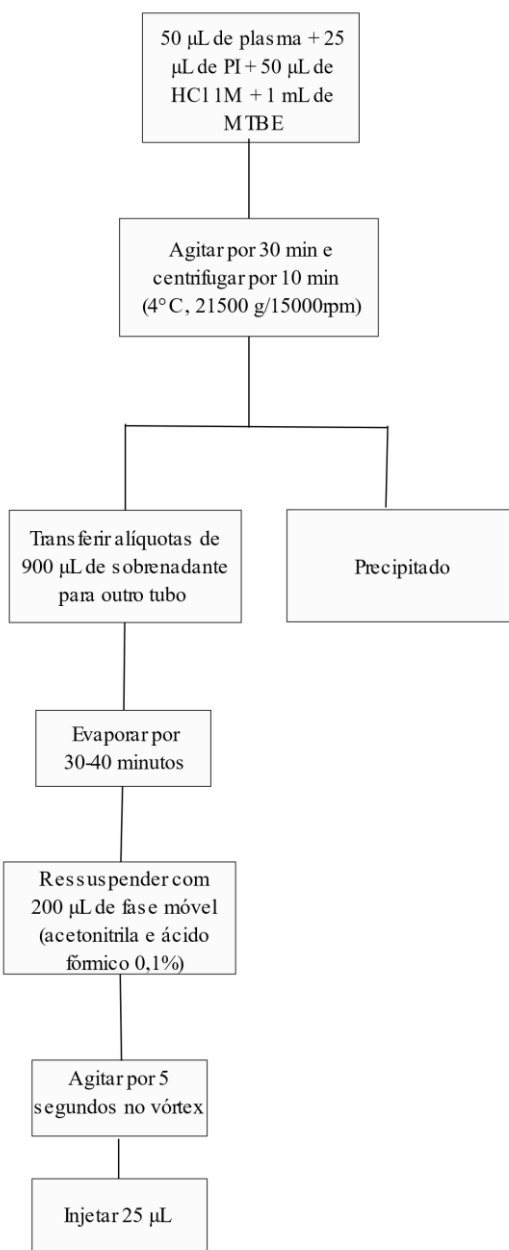
Para a análise do plasma ultrafiltrado foi utilizado uma centrífuga refrigerada (NT 825 Nova técnica, Piracicaba, Brasil) e o dispositivo de filtração Centrifree® Ultrafiltration Device 4104 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

### 3.5 Métodos de preparo das amostras

#### 3.5.1 Furosemida em plasma

Amostras de 50 µL de plasma foram adicionadas de 25 µL da solução de PI (0,1 µg/mL MeOH), 50 µL de ácido clorídrico (HCl) 1M e 1mL de éter metil-terc-butílico (MTBE). Em seguida, as amostras foram agitadas durante 30 minutos (mesa agitadora 220±10 ciclos/min, modelo MA 139/CTF, Marconi, Piracicaba, SP, Brasil) e centrifugadas por 10 minutos (4 °C; 21,500 g/15,000 rpm) (Hitachi refrigerated centrifuge, model CT 15RE, Hitachinaka – Ibaraki, Japan). O sobrenadante (900 µL) foi separado e evaporado em uma faixa de 30 a 40 minutos. O resíduo foi reconstituído em 200 µL de fase móvel constituída de uma mistura de acetonitrila e ácido fórmico 0,1% (1:1, v/v) e agitado por 30 segundos no vórtex. Por fim, foram injetados 25 µL no sistema cromatográfico.

**Figura 1** – Procedimento de preparo de amostras de plasma para a análise da furosemida.

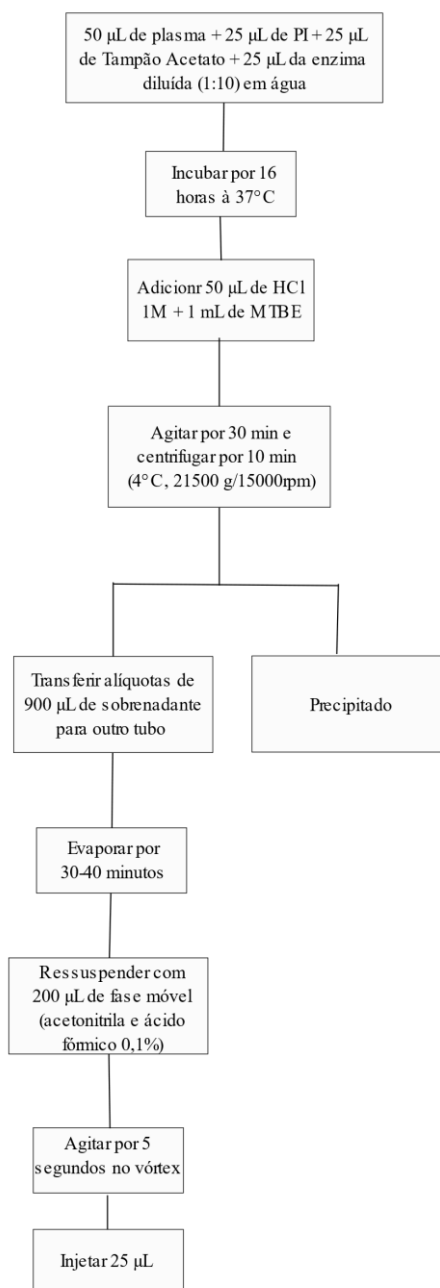


### 3.5.1 Hidrolisado de furosemida em plasma

Realizou-se a hidrólise do FUR-GLI em amostras de plasma. Assim, foram adicionados 25 µL da solução de PI (0,1 µg/mL MeOH), 25 µL de tampão acetato (pH 5) e 25 µL da enzima β-glicuronidase diluída (1:10 em água) em 50 µL de plasma. Em seguida, as amostras foram agitadas por 30 segundos e incubadas por 16 horas a 37°C. Após a incubação, as amostras seguiram o preparo de amostra descrito anteriormente. A concentração de FUR-GLI foi determinada através da subtração da concentração de FUR em uma amostra hidrolisada pela concentração de FUR da mesma amostra não

hidrolisada. Ambas as amostras (que passaram por hidrólise enzimática ou não) foram preparadas simultaneamente e analisadas em um mesmo dia.

**Figura 2** - Procedimento de preparo de amostras de hidrolisado de plasma para a análise da furosemida glicuronídeo.



### 3.5.3 Otimização da hidrólise do glicuronídeo de furosemida em plasma

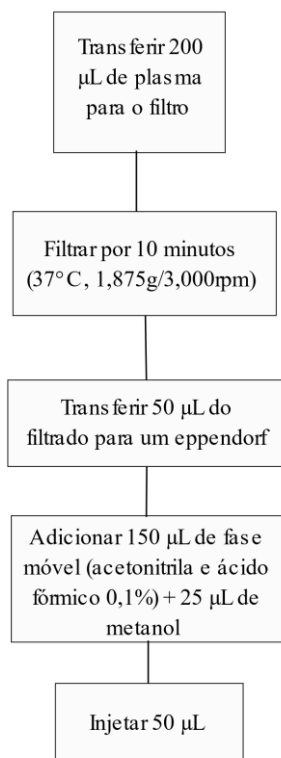
Utilizou-se diferentes concentrações da enzima e diferentes períodos de incubação para avaliar a otimização da hidrólise enzimática em plasma. Para avaliar a melhor concentração da enzima, fortificou-se as amostras de plasma a 2.500 ng/mL de FUR-GLI e foram submetidas ao processo de hidrólise com o uso de diferentes diluições da enzima

$\beta$ -glicuronidase em água (1:500; 1:200; 1:100; 1:50; 1:20; 1:10; 1:5; 1:2 e 1 - sem diluição). Desta forma, com a melhor condição de concentração da enzima, as amostras de plasma enriquecidas com FUR-GLI nas concentrações do controle de qualidade de baixa concentração (CQB), controle de qualidade de média concentração (CQM) e controle de qualidade de alta concentração (CQA) para a avaliação dos diferentes tempos de incubação da enzima (2, 4, 6 e 16h). Foi avaliado a razão de áreas de FUR pelo PI de uma mesma concentração adicionada de FUR-GLI em cada teste.

### 3.5.4 Análise da Furosemida e Glicuronídeo de furosemida em ultrafiltrado de plasma

Amostras de 200  $\mu$ L de plasma foram transferidas para um dispositivo de ultrafiltração Centrifree<sup>®</sup> (Milipore, Carrigtohill, Irlanda) e centrifugadas por 10 minutos (37°C; 1,875 g/ 3,000 rpm). Após a ultrafiltração, foram transferidos 50  $\mu$ L do ultrafiltrado e adicionado 150  $\mu$ L da mistura de acetonitrila e ácido fórmico 0,1% (1:1, v/v) e 25  $\mu$ L de PI. Por fim, as amostras foram agitadas em vórtex por 5 segundos e foram injetados 50  $\mu$ L no sistema cromatográfico.

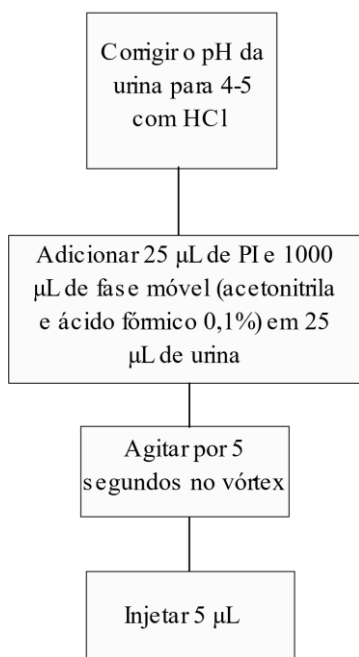
**Figura 3** - Procedimento de preparo de amostras de plasma ultrafiltrado para a análise da furosemida.



### 3.5.5 Análise da Furosemida e Glicuronídeo de furosemida em urina

Amostras de 25  $\mu\text{L}$  de urina (pH corrigido para 4-5) foram adicionados 25  $\mu\text{L}$  da solução de PI (0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e 1000  $\mu\text{L}$  da mistura de acetonitrila e ácido fórmico 0,1% (1:1, v/v). Por fim, as amostras foram agitadas em vórtex por 5 segundos e foram injetados 5  $\mu\text{L}$  no sistema cromatográfico.

**Figura 4** - Procedimento de preparo de amostras de urina para a análise da furosemida.



### 3.6 Validação dos métodos analíticos

Os métodos analíticos foram validados de acordo com a Resolução ANVISA RDC n° 27 de 17 de maio de 2012 e European Medicines Agency (EMA), considerando os parâmetros efeito matriz, linearidade, limite de quantificação, precisão e exatidão (inter e intraensaios) e estabilidade em matriz biológica em temperatura ambiente (curta duração), após ciclos de congelamento e descongelamento e pós-processamento.

**Tabela 2 - Concentrações de furosemida e furosemida glicuronídeo nos controles de qualidade (CQ) utilizados na validação dos métodos bioanalíticos de plasma, plasma ultrafiltrado e urina.**

Furosemida (ng/mL)	Plasma e hidrolisado de plasma	Plasma Ultrafiltrado	Urina
LIQ	0,5	0,125	50
CQB	1,25	0,25	100
CQM	1250	125	10000
CQA	2000	200	16000
CQD	10000	500	10000

CQ: controles de qualidade, LIQ: limite inferior de quantificação, CQB: controle de qualidade de baixa concentração, CQM: controle de qualidade de média concentração, CQA: controle de qualidade de alta concentração, CQD: controle de qualidade de diluição (CQ diluído em plasma na proporção de 1:10).

### 3.6.1 Precisão e exatidão

A precisão e a exatidão dos métodos foram avaliadas através dos estudos intraensaio e interensaios com amostras branco enriquecidas em cinco diferentes concentrações (Tabela 2). Foram analisadas quintuplicatas de cada amostra em uma única corrida analítica para avaliação de precisão e exatidão intraensaio do método. Já para interensaios, foram analisadas quintuplicatas de cada amostra em três corridas diferentes. O método foi considerado preciso e exato nos testes intraensaio e interensaios quando o coeficiente de variação foi igual ou inferior a 15%, aceitando-se 20% para amostras do LIQ.

**Equação 1** – Equação de erro padrão relativo

$$\text{Erro padrão relativo} = \frac{(\text{Concentração média experimental} - \text{valor nominal}) \times 100}{\text{Valor nominal}}$$

**Equação 2** – Equação do coeficiente de variação (CV%)

$$\text{Coeficiente de variação} = \frac{\text{Concentração média experimental} \times 100}{\text{Desvio Padrão}}$$

### 3.6.2 Efeito matriz

A análise do efeito matriz foi realizada pela comparação das razões dos picos dos analitos em solução padrão pelo PI, nas concentrações de CQB (amostra de controle de qualidade de baixa concentração), CQM (amostra de controle de qualidade de média concentração) e CQA (amostra de controle de qualidade de alta concentração) (Tabela 2) injetados diretamente no sistema cromatográfico, com as razões de áreas dos picos dos analitos em solução padrão pelo PI nas mesmas concentrações, adicionadas em extratos de plasma branco, hidrolisado de plasma, ultrafiltrado de plasma e urina de seis voluntários distintos, sendo para os métodos de plasma e ultrafiltrado de plasma quatro amostras

normais, duas hemolisadas e duas lipêmicas. Para cada amostra foi obtido o fator de matriz normalizado por PI (FMN), de acordo com a fórmula a seguir:

**Equação 3** – Equação do fator de matriz normalizado por PI (FMN)

$$FMN = \frac{\text{Resposta do analito em matriz}/\text{Resposta do PI em matriz}}{\text{Resposta do analito em solução}/\text{Resposta do PI em solução}}$$

Após o cálculo de FMN, foi calculado o coeficiente de variação (CV) dos FMNs relativos a todas as amostras. O efeito matriz é aceitável quando o CV de todos os valores de FMN forem menores que 15%.

### **3.6.3 Estabilidade do analito em matriz biológica**

A estabilidade dos métodos foi avaliada em amostras enriquecidas nas concentrações de CQB, CQM e CQA (Tabela 2). Para avaliação da estabilidade da FUR e seu FUR-GLU em matriz biológica, foram analisadas quintuplicatas de cada amostra em uma única corrida analítica. Os resultados obtidos foram comparados com as amostras recentemente preparadas e foram consideradas estáveis nas condições de armazenamento e do método analítico quando o EPR e o CV forem iguais ou inferiores a 15%.

#### *3.6.3.1 Estabilidade de curta duração*

A estabilidade de curta duração foi avaliada ao manter amostras enriquecidas em temperatura ambiente (22°C) por 6 horas em amostras de plasma e hidrolisado de plasma, já as amostras de ultrafiltrado de plasma e urina foram mantidas em temperatura ambiente (22°C) por 2 horas. Após esse período, as amostras foram extraídas e analisadas.

#### *3.6.3.2 Estabilidade pós-processamento*

A estabilidade de pós processamento foi avaliada mantendo as amostras processadas na temperatura do injetor do sistema HPLC-MS/MS (12°C) por 24 horas, sendo analisadas após esse período.

#### *3.6.3.3 Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento*

Avaliou-se a estabilidade após 3 ciclos de congelamento e descongelamento, na qual as amostras enriquecidas foram congeladas a -80°C por 24 horas. Após este período, foram descongeladas e congeladas novamente por 24 horas, repetindo-se este processo até o terceiro ciclo de descongelamento. Após o terceiro ciclo, as amostras de plasma, hidrolisado de plasma e urina foram extraídas e analisadas. O teste não foi

realizado em amostra de ultrafiltrado, pois as amostras não foram congeladas durante as análises sendo analisadas logo após o preparo.

#### **3.6.4 Linearidade**

A linearidade do método foi avaliada pela construção de três curvas de calibração que inclui a análise da amostra branco e da amostra zero, além das amostras de diferentes concentrações do padrão. O método foi considerado linear quando os desvios em relação a concentração nominal forem menores ou iguais a 20% para os padrões do LIQ e menor ou igual a 15% para os outros padrões, sendo necessário que no mínimo 75% dos padrões de calibração estejam aprovados no critério anterior e no mínimo 6 padrões de calibração de concentrações diferentes, incluindo o LIQ e o LSQ, aprovados no critério anterior.

#### **3.6.5 Efeito residual**

O efeito residual foi avaliado através de três injeções de amostra branco, sendo uma antes e duas após a injeção de duas amostras de CQA (Tabela 2). O efeito residual é considerado desprezível quando as respostas das interferências (picos) próximas ao tempo de retenção do analito forem inferiores a 20% da resposta do analito nas amostras do LIQ e 5% da resposta do PI.

#### **3.6.6 Seletividade**

A seletividade foi avaliada através da comparação entre as áreas obtidas no tempo de retenção do padrão e PI de seis amostras branco. O método será considerado seletivo quando as respostas das interferências (picos) próximas ao tempo de retenção do analito forem inferiores a 20% da resposta do analito nas amostras do LIQ e 5% da resposta do PI.

#### **3.6.7 Adsorção ao filtro**

A adsorção ao filtro foi determinada para as amostras de plasma ultrafiltrado submetendo 3 amostras para cada concentração de CQ (Tabela 2) ao processo de ultrafiltração, os resultados das soluções ultrafiltradas foram comparados com soluções que não passaram pelo procedimento. Calculou-se o erro padrão relativo e o coeficiente de variação (Equação 1 e 2), sendo que os resultados são considerados aceitos quando apresentam valores de desvios menores que 15%.

### **3.7 Métodos e protocolos clínicos**

As participantes gestantes e não gestantes estavam cientes de todas as etapas do estudo, tendo recebido uma explicação sobre a proposta do estudo, sua duração, os procedimentos e os possíveis riscos envolvidos de forma detalhada, apenas incluídas no estudo após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Além disso, foi garantida a liberdade das participantes para se negarem a participar ou retirar seu consentimento em qualquer etapa da pesquisa, sem penalização ou prejuízo de seu atendimento e/ou tratamento. Ademais, foi garantido o afastamento da paciente do protocolo e atendimento médico pelo médico membro da equipe de pesquisa, no HCFMRP-USP em caso da ocorrência de efeitos adversos.

Houve a aprovação dos protocolos de pesquisa pelo Registro Brasileiro de Ensaio Clínicos (ReBEC; Universal Trial Number: U1111-1238-7680), pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP).

#### **3.7.1 Critérios de inclusão e exclusão**

Foram investigadas participantes (maiores de 18 anos) diagnosticadas com pielonefrite aguda e com indicação de tratamento com antibióticos, atendidas no HCFMRP-USP. Além disso, foram recrutadas participantes saudáveis não gestantes da comunidade do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e participantes gestantes saudáveis, com idade superior a 18 anos.

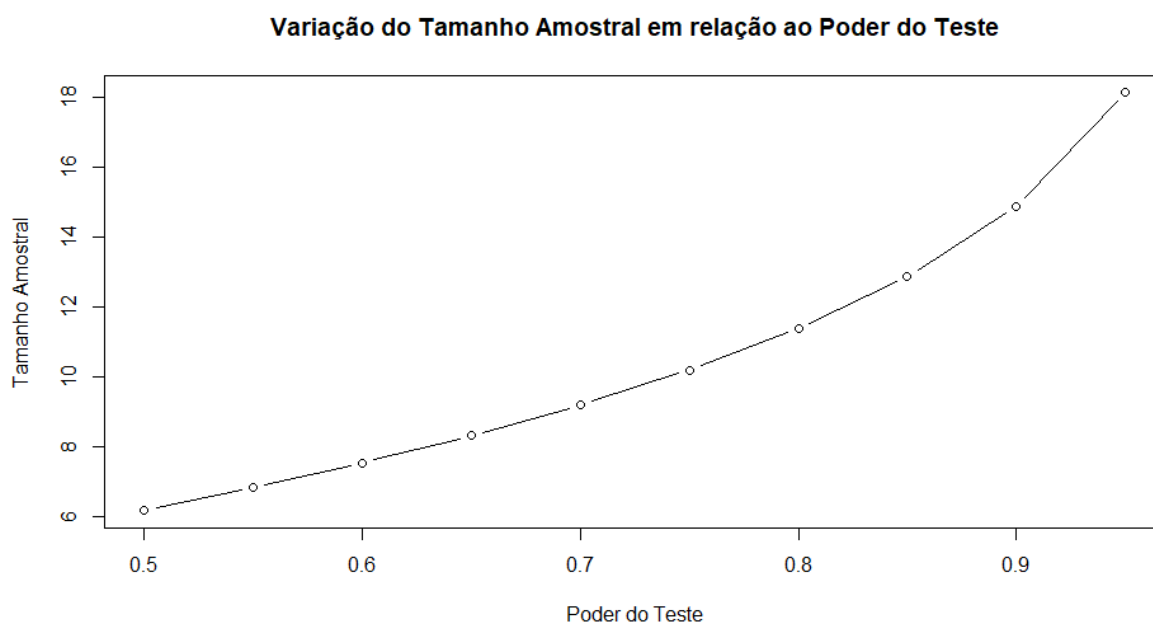
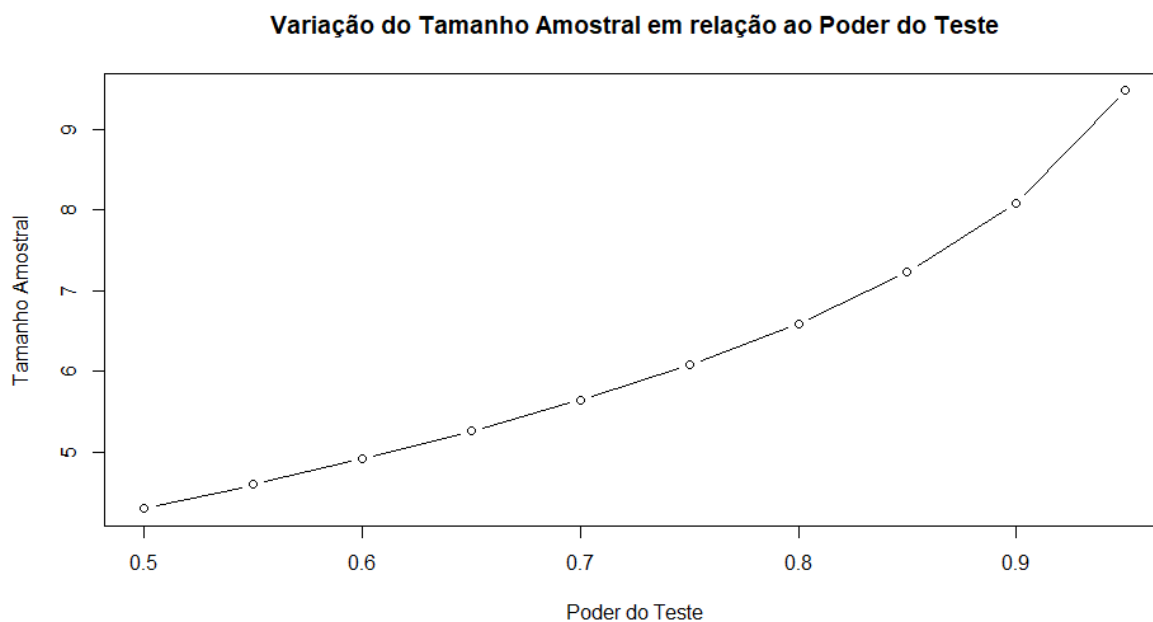
Foram excluídas do estudo as participantes gestantes diagnosticadas com pielonefrite aguda quando apresentaram pelo menos uma das condições seguintes: insuficiência renal crônica, lúpus eritematoso sistêmico, síndromes hipertensivas (hipertensão arterial crônica e/ou pré-eclâmpsia), sofrimento fetal crônico ou outras condições inflamatórias. Além disso, as participantes que faziam uso de fármacos inibidores ou indutores dos OAT 1 e 3, que possam interagir com a furosemida, foram excluídas da pesquisa. Exemplo dos fármacos: ácido para amino salicílico, ácido para-amino-hipúrico, citalopram, colestiramina, escitalopram, diclofenaco, digoxina, lítio, linezolida, rifampina, rifabutina, rifapentina, sertralina e teriflunomida (PARVEZ et al., 2016; HUO e LIU, 2018).

### 3.7.2 Cálculo de tamanho amostral

O programa R foi empregado para realizar o cálculo do tamanho amostral. Para o cálculo amostral para o primeiro protocolo (gestantes diagnosticadas com pielonefrite - Fase 1 vs Fase 2) foram utilizados os valores do clearance de secreção ( $CL_{SEC}$ ) (média  $\pm$  desvio padrão  $57.6 \pm 17.3$  mL/min) observados em voluntários saudáveis tratados com dose oral única de 40 mg de furosemida (SHEN et al., 2019). Para observar diferença significativa entre os grupos pareados de pelo menos 40% no parâmetro  $CL_{SEC}$ , com erro tipo I fixado em 0,05 e poder do teste superior a 80%, o tamanho mínimo amostral foi de 7 voluntárias em cada grupo. A figura 1 apresenta a variação do tamanho amostral com relação ao poder do teste.

Já o cálculo amostral para o segundo protocolo (gestantes saudáveis vs não gestantes saudáveis) foram utilizados os valores do clearance de secreção ( $CL_{SEC}$ ) (média  $\pm$  desvio padrão  $57.6 \pm 17.3$  mL/min) observados em voluntários saudáveis tratados com dose oral única de 40 mg de furosemida (SHEN et al., 2019). Para observar diferença significativa entre os grupos independentes de pelo menos 40% no parâmetro  $CL_{SEC}$ , com erro tipo I fixado em 0,05 e poder do teste superior a 80%, o tamanho mínimo amostral foi de 12 voluntárias em cada grupo. A figura 1 apresenta a variação do tamanho amostral com relação ao poder do teste.

**Figura 5** - Estudo do tamanho amostral em relação ao poder do teste para estudo da farmacocinética da furosemida protocolo 1 (imagem de cima) e protocolo 2 (imagem de baixo).



### 3.7.3 Protocolo clínico

As participantes foram divididas em três grupos:

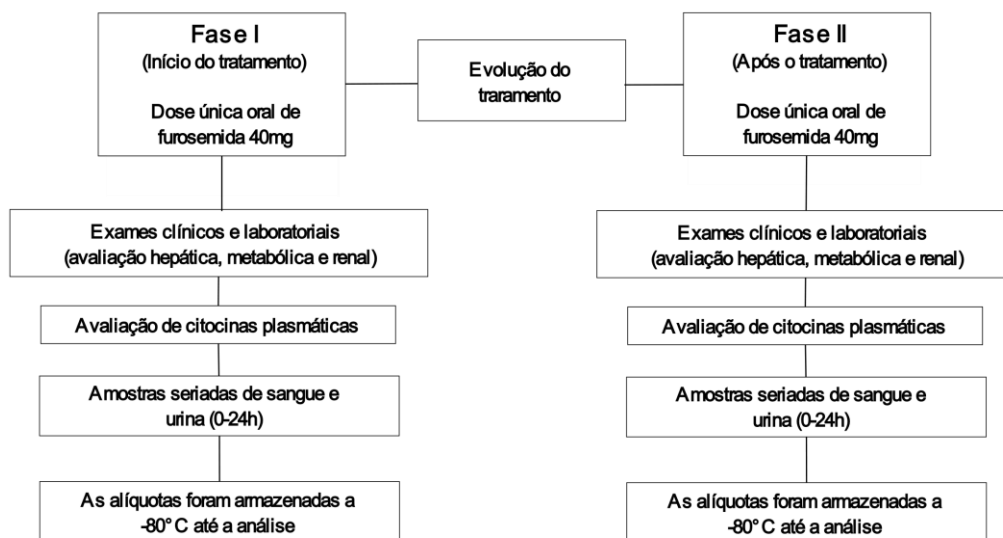
Grupo 1: Participantes gestantes diagnosticadas com pielonefrite aguda (Fase I:  $n = 10$  e Fase II:  $n = 7$ ).

Grupo 2: Participantes saudáveis não gestantes ( $n = 12$ ).

Grupo 3: Participantes no segundo ou terceiro trimestre da gestação (n = 10). O grupo inclui as participantes de Fase II e três participantes recrutadas para atingir o tamanho amostral.

O protocolo clínico para as participantes gestantes diagnosticadas com pielonefrite aguda foi dividido em duas fases. Na Fase I, após o diagnóstico da paciente e indicação de tratamento com antibiótico pela equipe médica, foi coletado 2 mL de sangue em tubo heparinizado contendo EDTA para avaliação da concentração plasmática de citocinas. Foram realizados exames laboratoriais para a avaliação hepática, metabólica e renal pelo hospital local de maneira rotineira e os dados foram acessados via prontuário eletrônico posteriormente. Foi administrado uma dose única oral de 40 mg de FUR com 200 mL de água, após as gestantes receberem a primeira dose de antibiótico. Realizou-se a coleta de amostras seriadas de sangue com volumes aproximados de 5 mL por meio de punção venosa com escalpe em tubos contendo heparina (Liquemine 5000UI, Roche) como anticoagulante. As amostras foram colhidas antes e 30 min; 1; 1,5; 2; 4; 6; 8; 10; 16 e 24h após a administração de FUR. Já a urina foi coletada no período de 0-24h, em frascos individuais. Para cada volume de urina coletado, retirou-se alíquotas de 10 mL e manteve-se o pH entre 4-5 para evitar a hidrólise do FUR-GLI (MIZUMA et al., 1999). Por fim, as alíquotas foram armazenadas a -80°C até a análise. As gestantes receberam alta hospitalar, seguindo o protocolo do hospital local, após o tratamento com antibiótico endovenoso e ao apresentar melhora do quadro infeccioso (mal-estar, febre, entre outros sintomas), e continuaram o tratamento com antibiótico via oral durante 10-14 dias. Na Fase II, após o fim do tratamento com antibióticos orais e avaliação com a equipe médica em seguimento do tratamento, as gestantes foram convidadas a irem à Unidade de Pesquisa Clínica (UPC) do HC-FMRPUSP, onde receberam dose única oral de FUR 40 mg. Foram coletadas amostras de sangue para a avaliação das citocinas plasmáticas, exames laboratoriais para a avaliação hepática, metabólica e renal e estudo da farmacocinética da FUR (de forma semelhante a Fase I).

**Figura 6** - Representação do protocolo clínico para a avaliação do impacto da pielonefrite aguda em pacientes gestantes.



Já o protocolo clínico das participantes não gestantes e gestantes saudáveis foi realizado em apenas uma fase. As participantes foram encaminhadas à Unidade de Pesquisa Clínica (UPC) do HC-FMRPUSP onde foi administrado uma dose única oral de 40 mg de FUR com 200 mL de água, de forma semelhante aos outros protocolos. Realizou-se a coleta de amostras seriadas de sangue e de urina (todo o volume excretado no período de 0-24h) de maneira semelhante ao protocolo anterior. As alíquotas foram armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até a análise. Além disso, realizou-se exames laboratoriais para a avaliação hepática, metabólica e renal pelo hospital local de maneira rotineira.

### 3.7.4 Determinação de citocinas em plasma

Foram quantificadas as citocinas  $\text{IFN-}\gamma$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IL-2}$ ,  $\text{IL-4}$ ,  $\text{IL-6}$ ,  $\text{IL-8}$ ,  $\text{IL-10}$ ,  $\text{IL-12p40}$ ,  $\text{IL12p70}$ ,  $\text{MCP-1}$  e  $\text{TNF-}\alpha$  empregando o kit *Milliplex MAP<sup>®</sup> Human Cytokine/Chemokine, Magnetic Bead Panel Immunoassay, Luminex Corporation* nas amostras de plasma das participantes gestantes diagnosticadas com pielonefrite coletadas nas Fases I e II do estudo.

### 3.7.5 Análise farmacocinética não compartimental

Aplicou-se o programa *Phoenix WinNonlin<sup>®</sup>*, versão 8.3.4.295 (Certara USA, Inc., Princeton, EUA) para calcular os parâmetros farmacocinéticos da FUR observados nas participantes. O cálculo da AUC foi realizado utilizando o método dos trapézios do tempo 0-24h ( $\text{AUC}_{0-24}$ ) e para calcular  $\text{AUC}_{0-\infty}$  utilizou a equação  $\text{AUC}_{0-\infty} = \text{AUC}_{0-24} + C_{\text{last}}/K_{\text{el}}$  para extrapolar até o infinito, sendo  $C_{\text{last}}$  a última concentração da FUR

determinada experimentalmente e  $k_{el}$  é a constante de velocidade de eliminação da fase terminal. Já a fração livre ( $F_u$ ) da FUR foi calculada através da razão da concentração livre no plasma pela concentração total no plasma, em amostras de  $C_{max}$ . A quantidade de FUR eliminada na urina ( $A_e$ ) foi determinada pela multiplicação das concentrações obtidas nas amostras pelo volume total de urina coletado. A fração da dose de FUR eliminada inalterada ( $F_e$ ) foi calculada através da divisão do  $A_e$  pela dose administrada. A determinação do clearance renal ( $CL_R$ ) se deu pela multiplicação do  $F_e$  pelo clearance total aparente ( $CL/F$ ). Ademais, calculou-se o clearance de secreção ( $CL_{sec}$ ) através da subtração do  $CL_R$  pela  $F_u$  multiplicada pelo clearance de creatinina ( $CL_{CR}$ ) (ROWLAND e TOZER, 2011), que foi calculado pela equação de Cockcroft-Gault (ROWLAND e TOZER, 2011). Considerou-se a reabsorção tubular da furosemida nula. Já o clearance não renal ( $CL_{NR}$ ) obteve-se através da subtração do  $CL/F$  pelo  $CL_R$ . Por fim, o clearance de formação ( $CL_M$ ) do FUR-GLI foi calculado pela multiplicação do  $CL/F$  da FUR pelo  $F_e$  do FUR-GLI (ROWLAND e TOZER, 2011), visto que o  $F_e$  foi obtido pela razão do  $A_e$  do FUR-GLI (calculada de forma semelhante ao da FUR) corrigida pelo peso molecular pela dose da FUR.

### **3.7.6 Análise estatística**

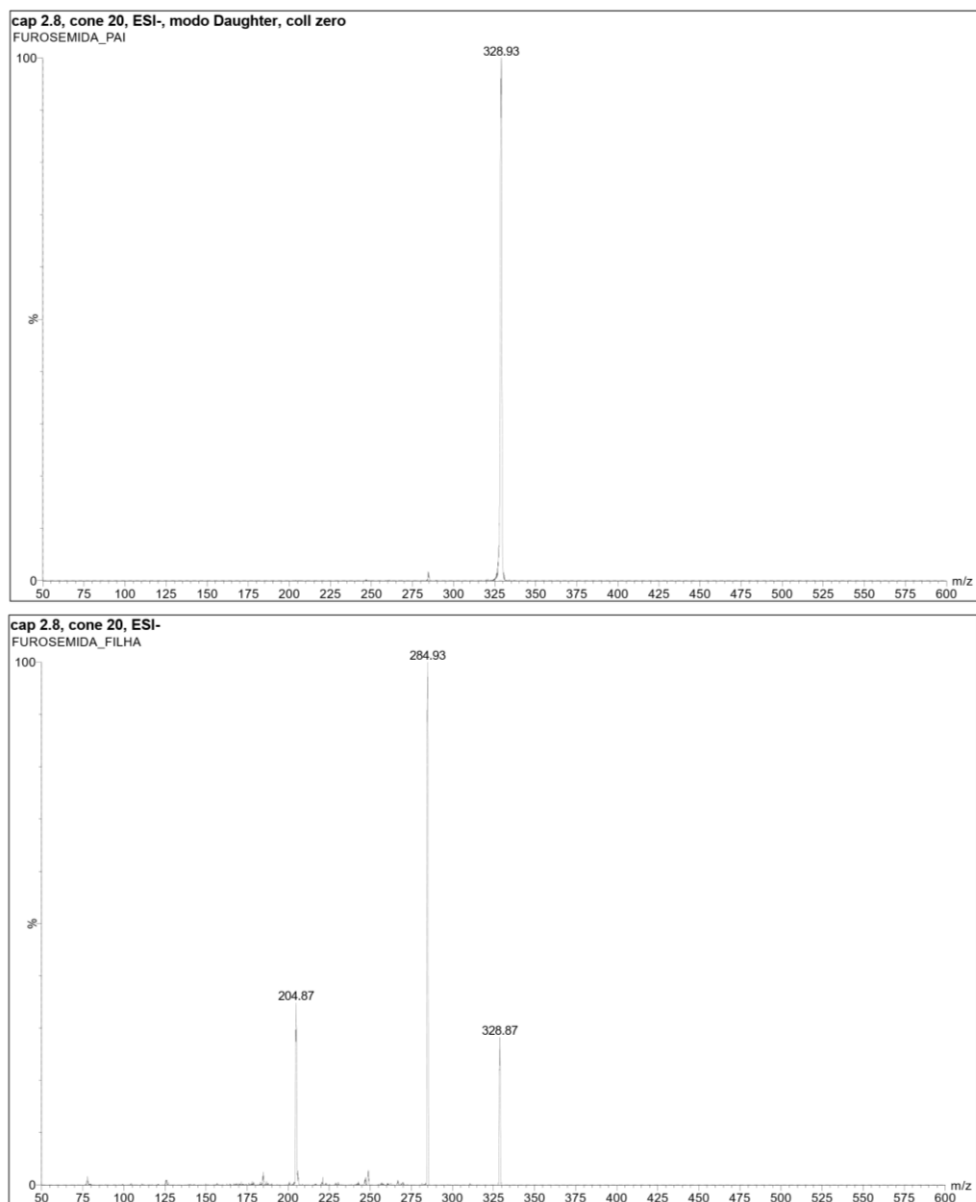
O programa R foi empregado para realizar o teste de *Shapiro-Wilk* em que se verifica se a amostra analisada segue uma distribuição normal. Além disso, também foi usado o teste de *Mann-Whitney* para comparar as participantes não gestantes e gestantes saudáveis a fim de avaliar a influência da gravidez, assim como o teste de *Wilcoxon* para comparar as participantes gestantes com pielonefrite aguda Fase I (antes do tratamento com antibiótico) e Fase II (após o tratamento com antibiótico) a fim de avaliar a influência da pielonefrite aguda. O valor de alfa adotado foi de 5% (nível de significância).

## **4. RESULTADOS**

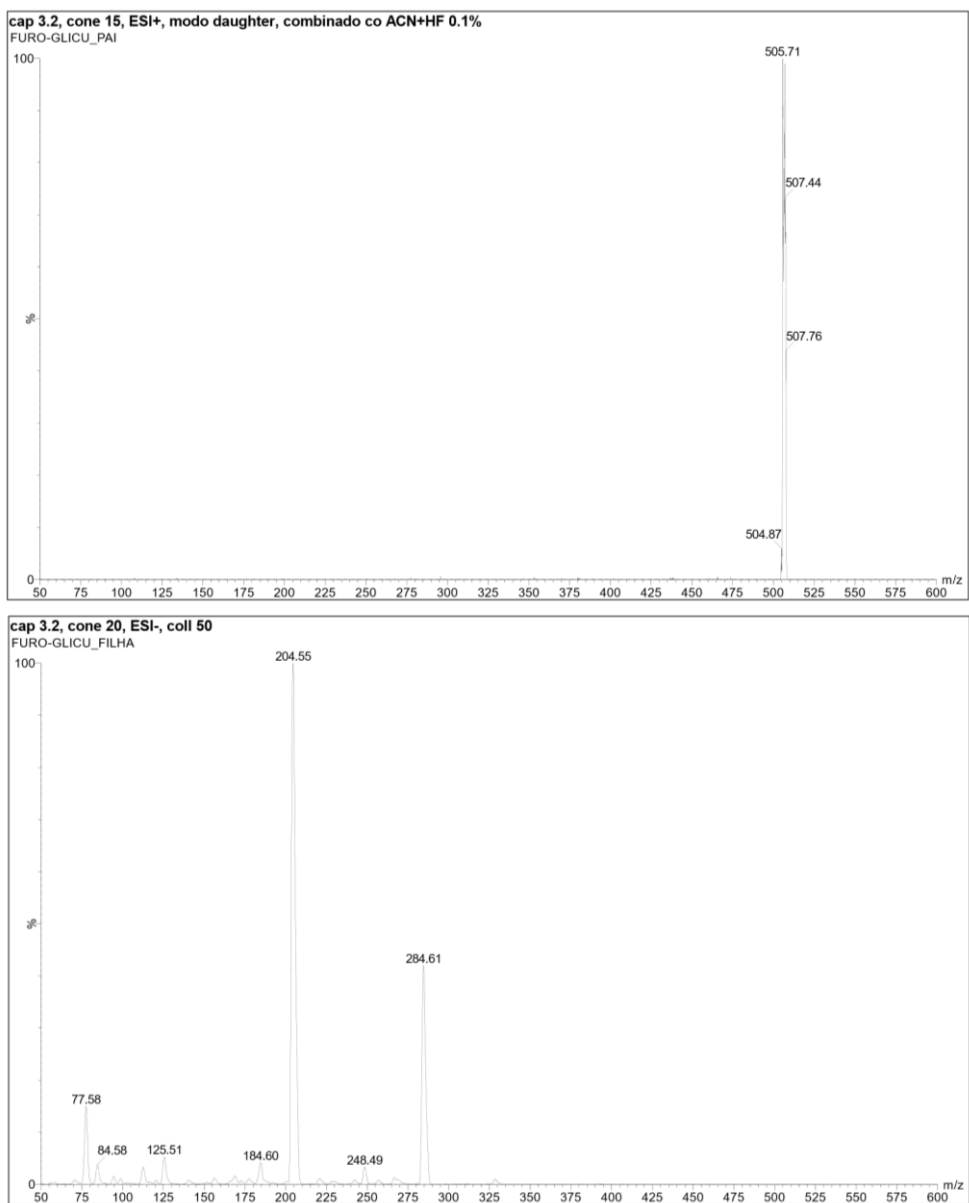
### **4.1 Resultados das validações dos métodos analíticos em plasma**

Os espectros de massas das moléculas protonadas e seus íons filhos da FUR, FUR-GLI e do PI estão apresentados nas Figuras 7, 8 e 9, respectivamente. As transições foram selecionadas com base na intensidade do sinal.

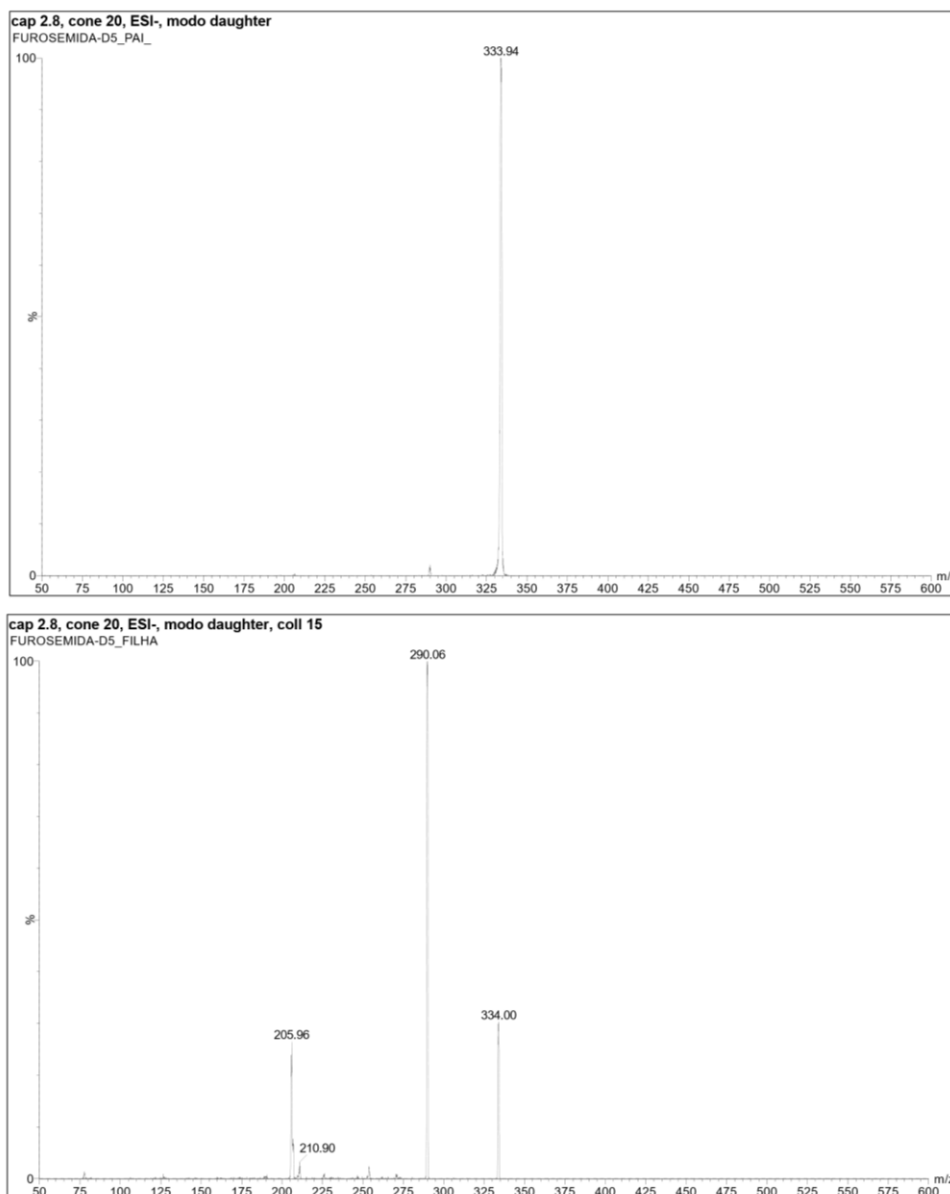
**Figura 7** – Espectro de massas da furosemida monitorada na transição 328,95 > 285.



**Figura 8** – Espectro de massas da furosemida glicuronídeo na transição 505,20 > 205,30.

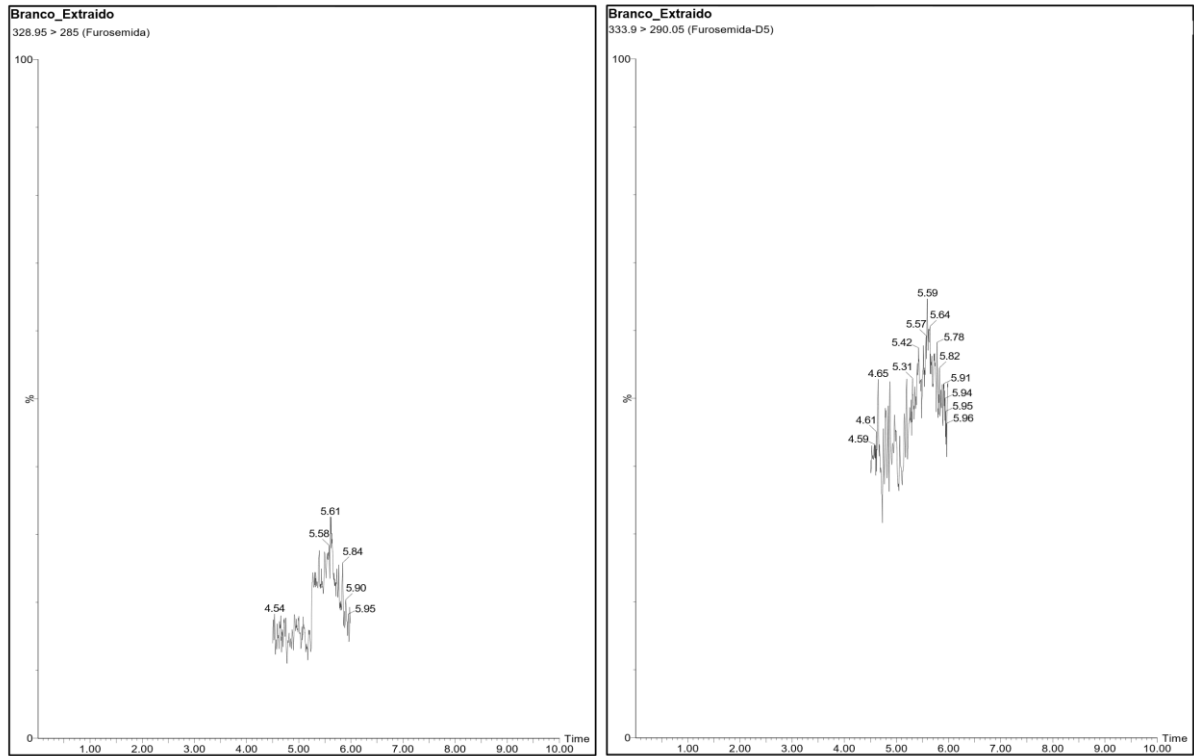


**Figura 9** – Espectro de massas do padrão interno furosemida deuterado monitorado na transição 333,9 > 290,05.

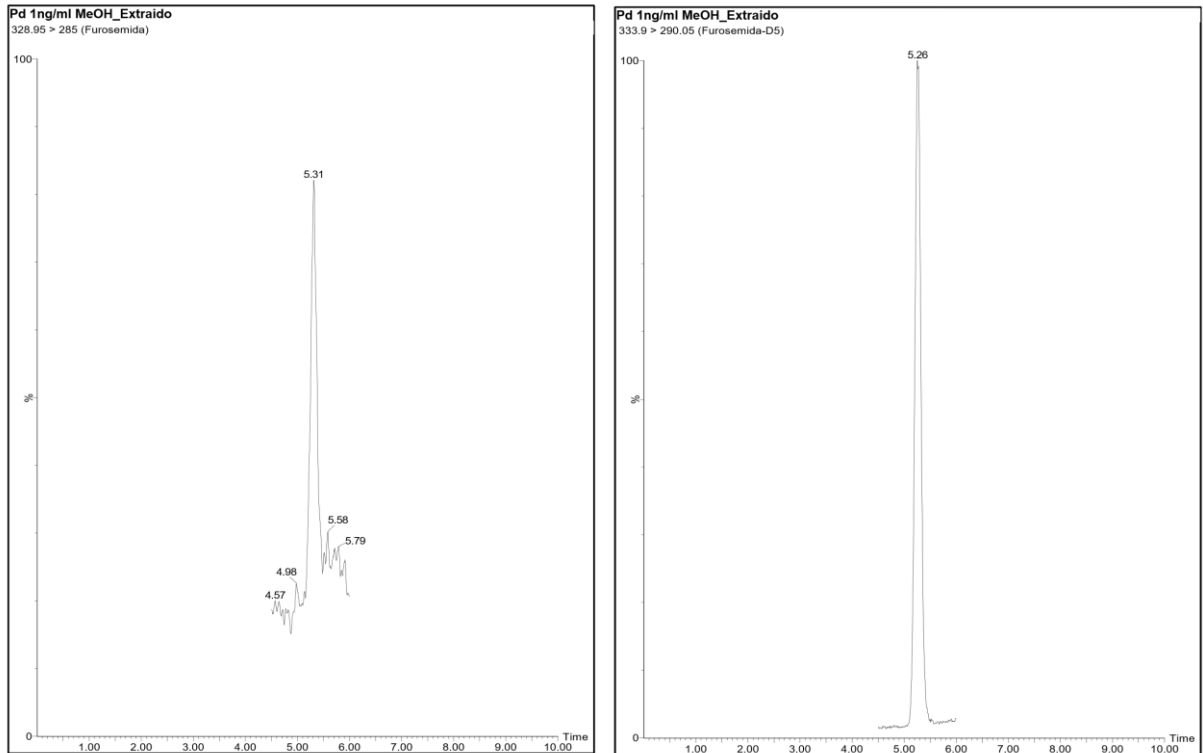


Foram obtidos os cromatogramas por meio da análise de amostra de plasma branco indicada na Figura 10, plasma enriquecido na concentração do LIQ (0,5 ng/mL) indicada na Figura 11 e amostra de paciente saudável depois de 1 hora da administração de dose única oral de 40 mg de FUR (Figura 12).

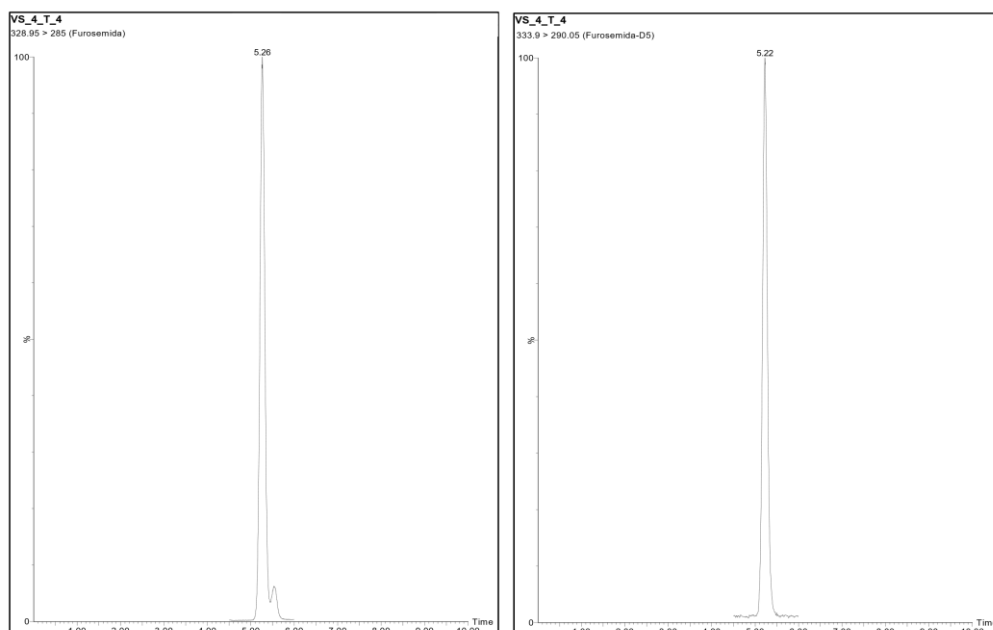
**Figura 10** - Cromatogramas obtidos na análise de plasma branco. Analito furosemida (FUR) monitorado na transição 328,95 > 285 e padrão interno furosemida deuterado (FUR-D5) monitorado na transição 333,9 > 290,05. Tempo de retenção: 5,3 minutos.



**Figura 11** - Cromatogramas obtidos na análise de plasma branco enriquecido na concentração do limite inferior de quantificação (LIQ; 0,5 ng/mL). Analito furosemida (FUR) monitorado na transição 328,95 > 285 e padrão interno furosemida deuterado (FUR-D5) monitorado na transição 333,9 > 290,05. Tempo de retenção: 5,3 minutos.

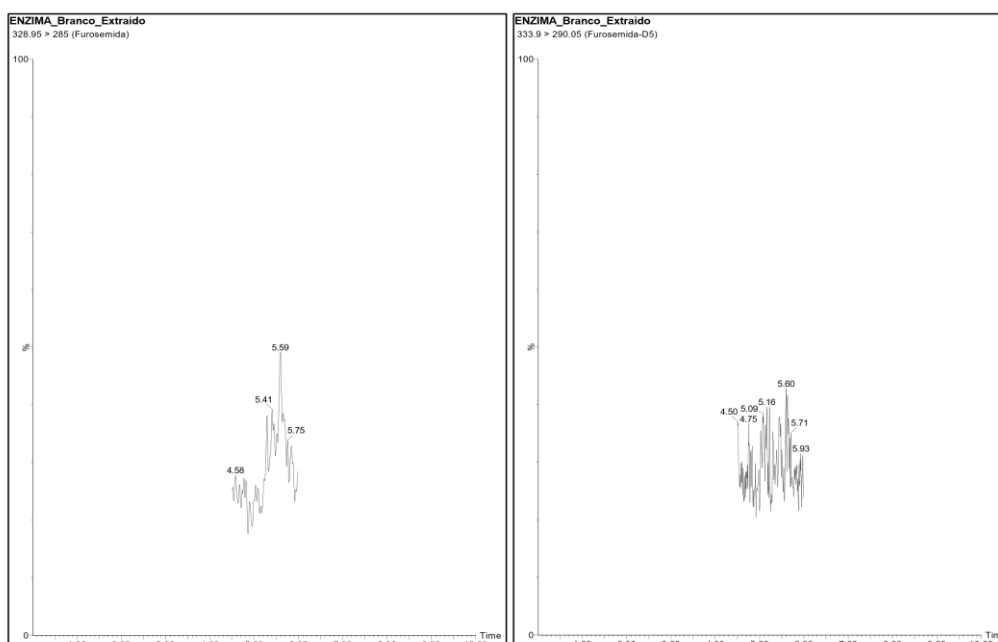


**Figura 12** - Cromatogramas obtidos na análise de amostra de plasma de voluntário saudável (a amostra de plasma foi coletada 1 hora após a administração oral de 40mg de furosemida). Analito furosemida (FUR) monitorado na transição 328,95 > 285 e padrão interno furosemida deuterado (FUR-D5) monitorado na transição 333,9 > 290,05. Tempo de retenção: 5,2 minutos.

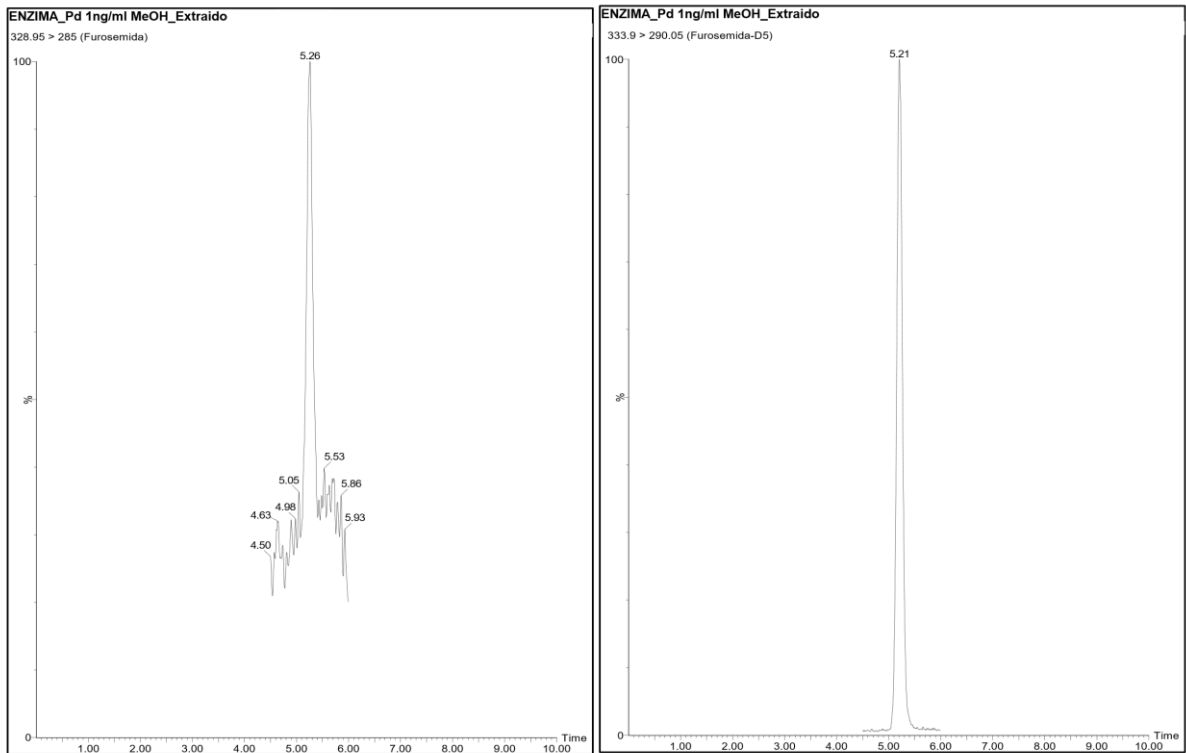


Além disso, foram obtidos os cromatogramas por meio da análise de amostra de plasma branco adicionado com enzima indicada na Figura 13, plasma enriquecido na concentração do LIQ (0,5 ng/mL) e adicionado com enzima indicada na Figura 14 e amostra de plasma de paciente saudável depois de 1 hora de administração de dose única oral de 40 mg de FUR e adicionado com enzima (Figura 15).

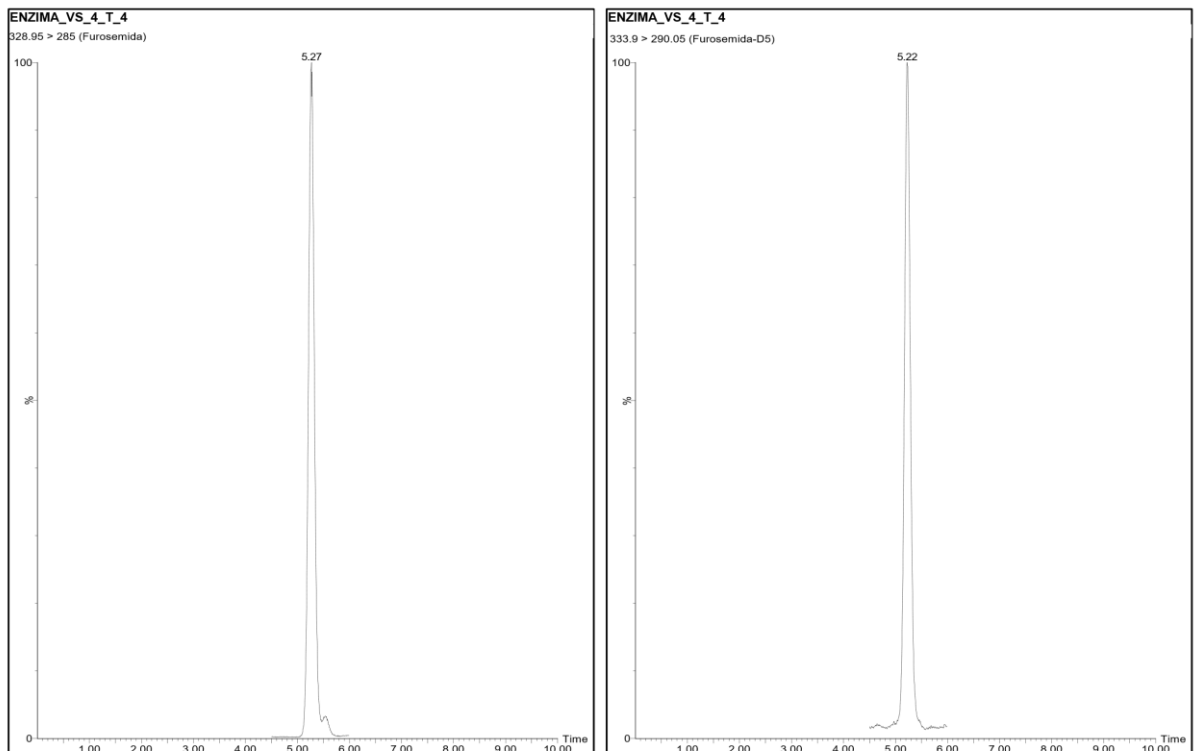
**Figura 13** - Cromatogramas obtidos na análise de plasma branco com enzima. Analito furosemida (FUR) monitorado na transição 328,95 > 285 e padrão interno furosemida deuterado (FUR-D5) monitorado na transição 333,9 > 290,05. Tempo de retenção: 5,3 minutos.



**Figura 14** - Cromatogramas obtidos na análise de plasma branco com enzima enriquecido na concentração do limite inferior de quantificação (LIQ; 0,5 ng/mL). Analito furosemida (FUR) monitorado na transição 328,95 > 285 e padrão interno furosemida deuterado (FUR-D5) monitorado na transição 333,9 > 290,05. Tempo de retenção: 5,3 minutos.

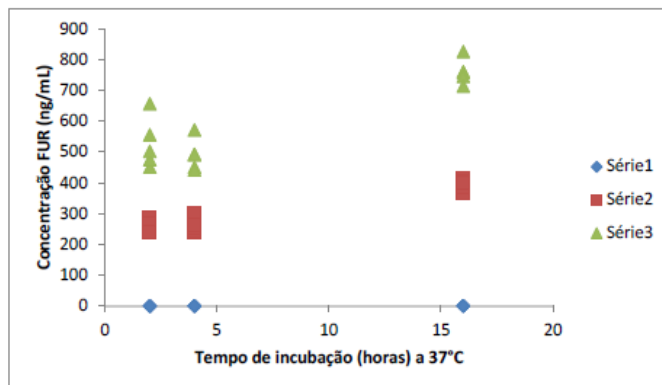


**Figura 15** - Cromatogramas obtidos na análise de amostra de plasma de voluntário saudável (a amostra de plasma foi coletada 1 hora após a administração oral de 40mg de furosemida) adicionado de enzima. Analito furosemida (FUR) monitorado na transição 328,95 > 285 e padrão interno furosemida deuterado (FURD5) monitorado na transição 333,9 > 290,05. Tempo de retenção: 5,2 minutos.



Por fim, a figura 16 apresenta os tempos de incubação das amostras de plasma com a enzima  $\beta$ -glicuronidase e as tabelas 3 e 4 descrevem os resultados dos parâmetros de validação do método de determinação da FUR e FUR-GLI.

**Figura 16** - Tempos de incubação das amostras de plasma com a enzima para a análise da furosemida glicuronídeo. Série 1: 1,25 ng/ml; série 2: 1250 ng/ml e série 3: = 2500 ng/ml



**Tabela 3** - Efeito matriz, linearidade, equação da reta e coeficiente de correlação ( $r^2$ ) do método de determinação de furosemida em plasma e hidrolisado de plasma.

	Efeito matriz FMN médio (CV%)	Linearidade (ng/mL de matriz)	Equação da reta	$r^2$
<b>Plasma</b>	CQB: 5,20 CQM: 6,21 CQA: 9,24	0,5 – 2.500	$Y = 0,0175x + 0,0100838$	0,993281
<b>Hidrolisado de plasma</b>	CQB: 10,73 CQM: 5,13 CQA: 5,43	0,5 – 2.500	$Y = 0,0151129x + 0,00742689$	0,997225

FMN: fator de matriz normalizado por padrão interno, CV: coeficiente de variação [(desvio padrão/concentração média experimental)]\*100; CQ: controles de qualidade, LIQ: limite inferior de quantificação do método, CQB: controle de qualidade de baixa concentração, CQM: controle de qualidade de média concentração, CQA: controle de qualidade de alta concentração.

Tabela 4 - Parâmetros de validação do método de determinação de furosemina em plasma e em hidrolisado.

	Plasma		Hidrolisado de plasma	
	Precisão (CV%)	Exatidão (EPR %)	Precisão (CV%)	Exatidão (EPR %)
<b>Experimentos intra-ensaio (n=5)</b>				
LIQ (0,5 ng/mL)	10,56	0,82	9,32	-2,20
CQB (1,25 ng/mL)	7,93	-0,84	6,23	-3,02
CQM (1.250 ng/mL)	1,12	-11,00	2,55	5,92
CQA (2.000 ng/mL)	1,13	-8,11	2,05	-1,44
CQD (1:10; 10.000 ng/mL)	2,05	-1,53	-	-
CQD (1:10; 500 ng/mL)	-	-	1,57	8,82
<b>Experimentos inter-ensaios (n=3)</b>				
	Precisão (CV%)	Exatidão (EPR %)	Precisão (CV%)	Exatidão (EPR %)
LIQ (0,5 ng/mL)	11,0	5,45	10,89	-4,96
CQB (1,25 ng/mL)	9,29	-6,73	6,08	1,45
CQM (1250 ng/mL)	4,21	-9,65	10,40	-6,83
CQA (2000 ng/mL)	2,05	-6,34	6,62	-8,32
CQD (1:10; 10000 ng/mL)	4,79	-0,07	-	-
CQD (1:10; 500 ng/mL)	-	-	8,48	-1,29
<b>Estabilidade em matriz biológica</b>				
<b>Pós-processamento (15 °C por 21 h; n = 5)</b>				
	Precisão (CV%)	Exatidão (EPR %)	Precisão (CV%)	Exatidão (EPR %)
CQB (1,25 ng/mL)	4,54	-12,73	14,31	8,90
CQM (1.250 ng/mL)	2,82	-8,86	7,91	-2,93
CQA (2.000 ng/mL)	2,16	-8,73	5,94	-3,44
<b>Estabilidade de curta duração (24 °C por 6 h; n =5)</b>				
CQB (1,25 ng/mL)	9,00	-14,64	7,95	-4,02
CQM (1.250 ng/mL)	3,04	-7,97	9,42	0,95
CQA (2.000 ng/mL)	6,98	-4,87	5,72	-9,89
<b>Estabilidade em ciclo de congelamento e descongelamento (3 vezes; -80°C até 24°C; n = 5)</b>				
	Precisão (CV%)	Exatidão (EPR %)	Precisão (CV%)	Exatidão (EPR %)
CQB (1,25 ng/mL)	7,47	-9,04	5,61	-3,63
CQM (1.250 ng/mL)	6,71	-6,17	5,46	2,08
CQA (2.000 ng/mL)	2,30	-8,57	2,01	-3,16

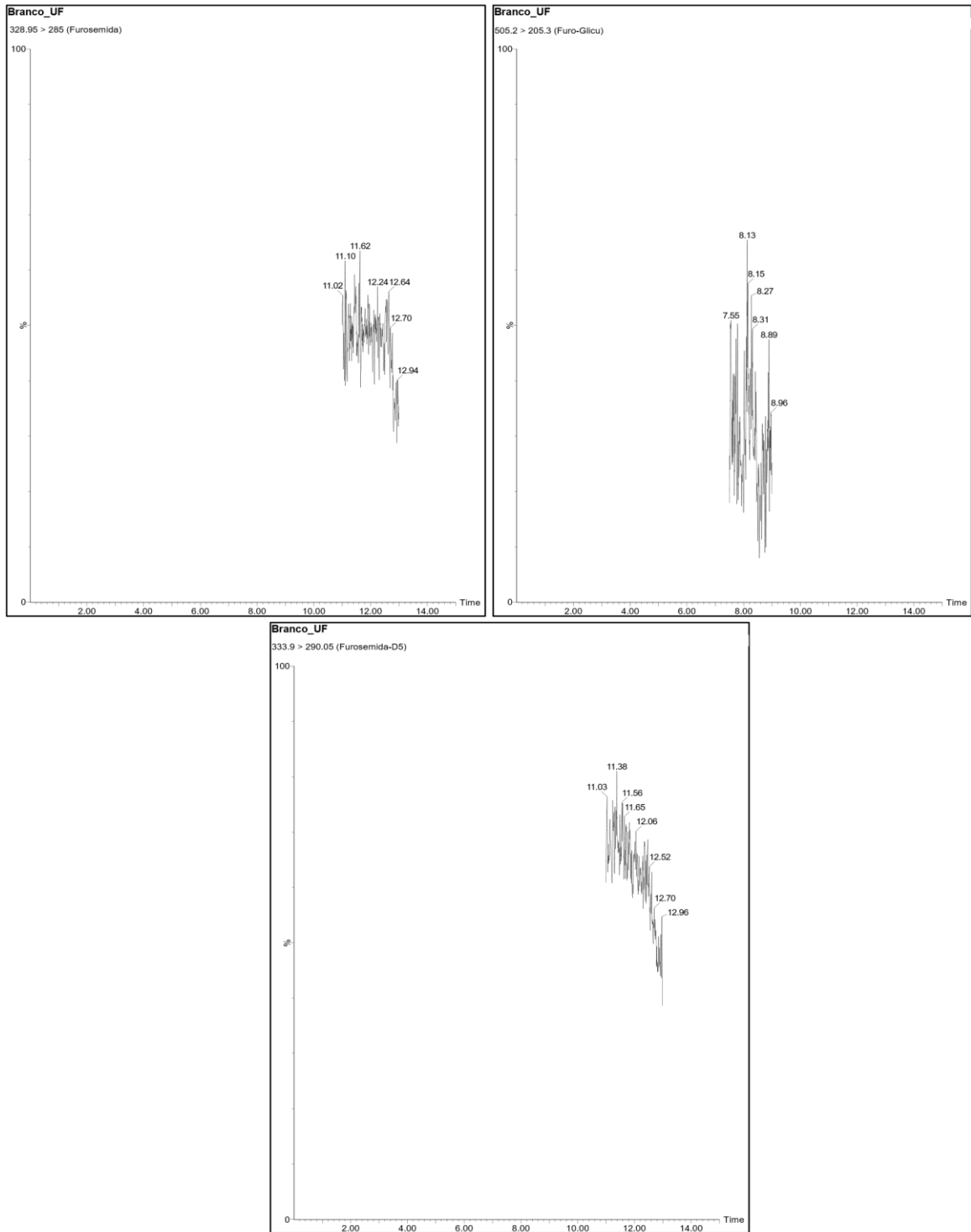
CV: coeficiente de variação [(desvio padrão/concentração média experimental)] \*100, EPR: erro padrão relativo [(concentração média experimental - valor nominal) /valor nominal] \* 100. CQ: controles de qualidade, LIQ: limite inferior de quantificação do método, CQB: controle de qualidade de baixa concentração, CQM: controle de qualidade de média concentração, CQA: controle de qualidade de alta concentração, CQD: controle de qualidade de diluição (CQ diluído em plasma na proporção de 1:10).

#### 4.2 Resultados das validações dos métodos analíticos em plasma ultrafiltrado

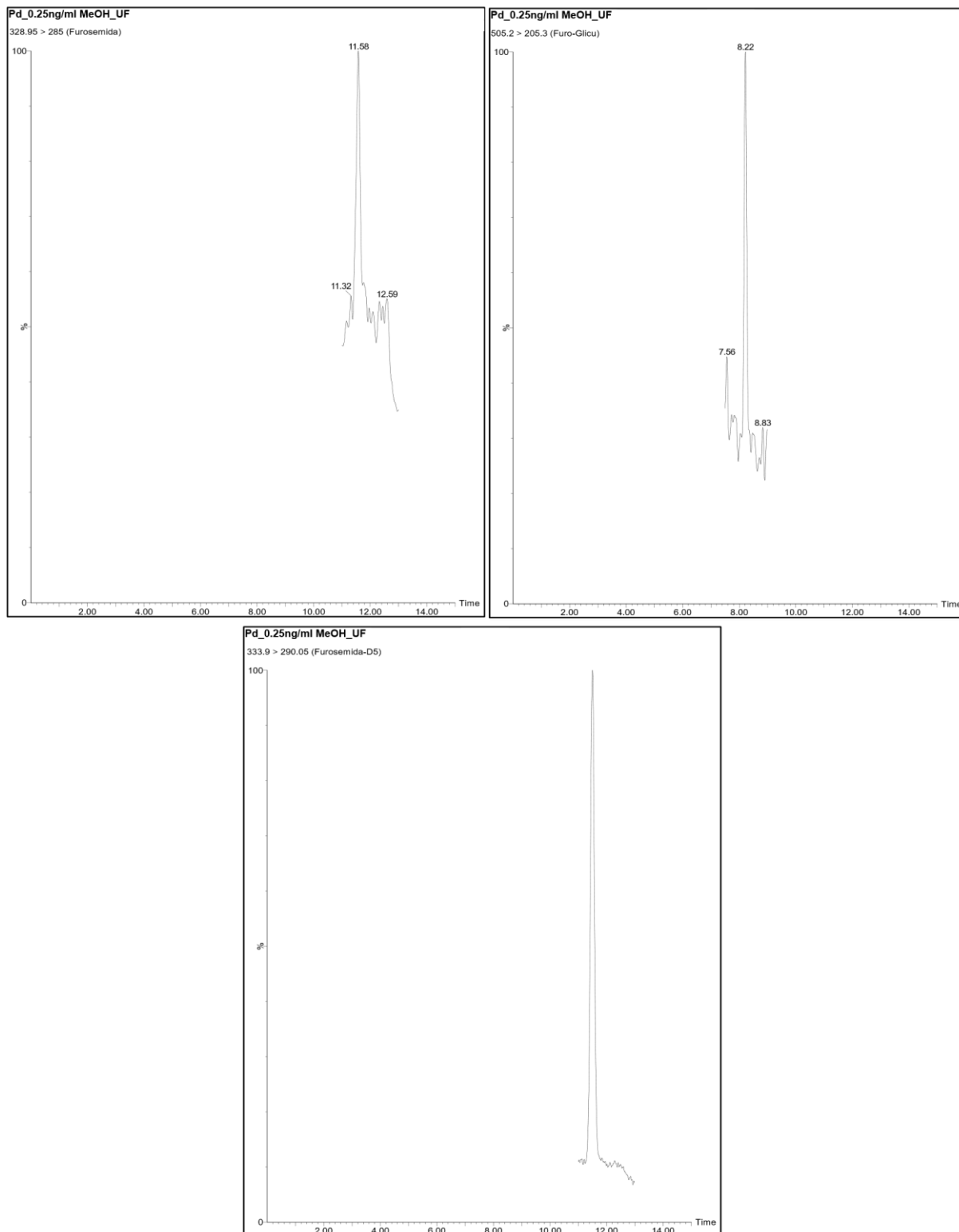
Foram obtidos os cromatogramas por meio da análise de amostra de plasma ultrafiltrado branco indicada na Figura 17, plasma ultrafiltrado enriquecido na concentração do LIQ (0,125

ng/mL) indicada na Figura 18 e amostra de paciente saudável após a administração única oral de 40 mg de FUR (Figura 19).

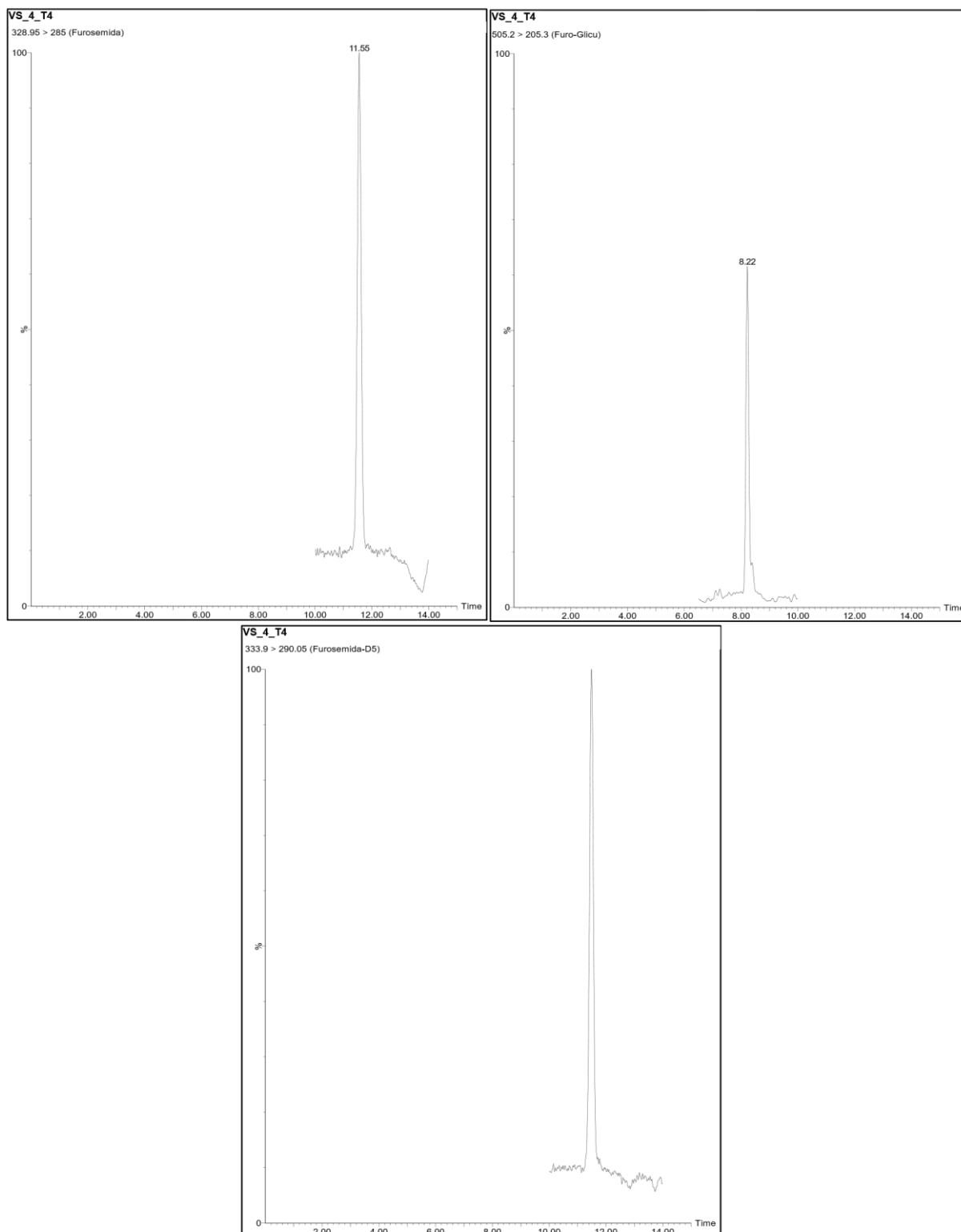
**Figura 17** - Cromatogramas obtidos na análise de plasma ultrafiltrado branco. Analito furosemida (FUR) monitorado na transição 328,95 > 285, glicuronídeo de furosemida monitorado na transição 505,20>205,30 e padrão interno furosemida deuterado (FUR-D5) monitorado na transição 333,9 > 290,05. Tempo de retenção: 8,2 e 11,5 minutos.



**Figura 18** - Cromatogramas obtidos na análise de plasma ultrafiltrado branco enriquecido na concentração do limite inferior de quantificação (LIQ; 0,125 ng/mL). Analito furosemida (FUR) monitorado na transição 328,95 > 285, glicuronídeo furosemida monitorado na transição 505,20>205,30 e padrão interno furosemida deuterado (FUR-D5) monitorado na transição 333,9 > 290,05. Tempo de retenção: 8,2 e 11,5 minutos.



**Figura 19** - Cromatogramas obtidos na análise de amostra de plasma ultrafiltrado de voluntário saudável. Analito furosemida (FUR) monitorado na transição 328,95 > 285, FUR glicuronídeo monitorado na transição 505,20>205,30 e padrão interno FUR deuterado (FUR-D5) monitorado na transição 333,9 > 290,05. Tempo de retenção: 8,2 e 11,5 minutos.



Além disso as tabelas 5 e 6 descrevem os resultados dos parâmetros de validação do método de determinação da FUR e FUR-GLI.

**Tabela 5** - Efeito matriz, linearidade, equação da reta e coeficiente de correlação ( $r^2$ ) do método de determinação de furosemida e de furosemida glicuronídeo em ultrafiltrado.

	Efeito matriz FMN médio (CV%)	Linearidade (ng/mL de matriz)	Equação da reta	$r^2$
Ultrafiltrado de plasma (FUR)	CQB: 3,48 CQM: 5,77 CQA: 5,48	0,125 – 250	$Y = 0,181413x + 0,0112829$	0,990366
Ultrafiltrado de plasma (FUR-GLI)	CQB: 5,17 CQM: 6,24 CQA: 5,75	0,125 – 250 ng/mL	$Y = 0,03139x + 0,002302$	0,992466

**Tabela 6** - Parâmetros de validação do método de determinação de furosemida e furosemida glicuronídeo em ultrafiltrado de plasma.

	Furosemida		Furosemida glicuronídeo	
	Experimentos intra-ensaio (n=5)			
	Precisão (CV%)	Exatidão (EPR %)	Precisão (CV%)	Exatidão (EPR %)
LIQ (0,125 ng/mL)	9,58	7,00	7,56	8,80
CQB (0,25 ng/mL)	4,54	9,87	10,39	2,02
CQM (125 ng/mL)	2,18	-1,72	3,78	1,16
CQA (200 ng/mL)	2,80	-2,76	4,12	4,74
CQD (1:10; 500 ng/mL)	1,42	6,57	2,07	-4,97
Experimentos interensaios (n=3)				
	Precisão (CV%)	Exatidão (EPR %)	Precisão (CV%)	Exatidão (EPR %)
LIQ (0,125 ng/mL)	11,35	1,11	9,71	5,29
CQB (0,25 ng/mL)	7,36	6,79	8,33	1,29
CQM (125 ng/mL)	4,75	-2,22	4,09	1,22
CQA (200 ng/mL)	6,08	-4,80	4,12	3,34
CQD (1:10; 500 ng/mL)	8,48	-2,07	5,18	-4,97
Estabilidade em matriz biológica				
Pós-processamento (15 °C por 21 h; n = 8)				
	Precisão (CV%)	Exatidão (EPR %)	Precisão (CV%)	Exatidão (EPR %)
CQB (0,25 ng/mL)	7,31	6,40	5,34	-8,33
CQM (125 ng/mL)	1,60	-6,00	2,69	1,04
CQA (200 ng/mL)	2,11	-11,14	2,84	1,54
Estabilidade de curta duração (24 °C por 2 h; n = 8)				
CQB (0,25 ng/mL)	11,46	-3,40	5,82	0,75
CQM (125 ng/mL)	3,33	-0,61	5,51	9,75
CQA (200 ng/mL)	3,00	-1,87	2,65	10,57
Estudo de adsorção ao filtro (n=3)				
CQB (0,25 ng/mL)	-	-10,10	-	-2,00
CQM (125 ng/mL)	-	-2,94	-	-3,10
CQA (200 ng/mL)	-	-0,40	-	-0,95

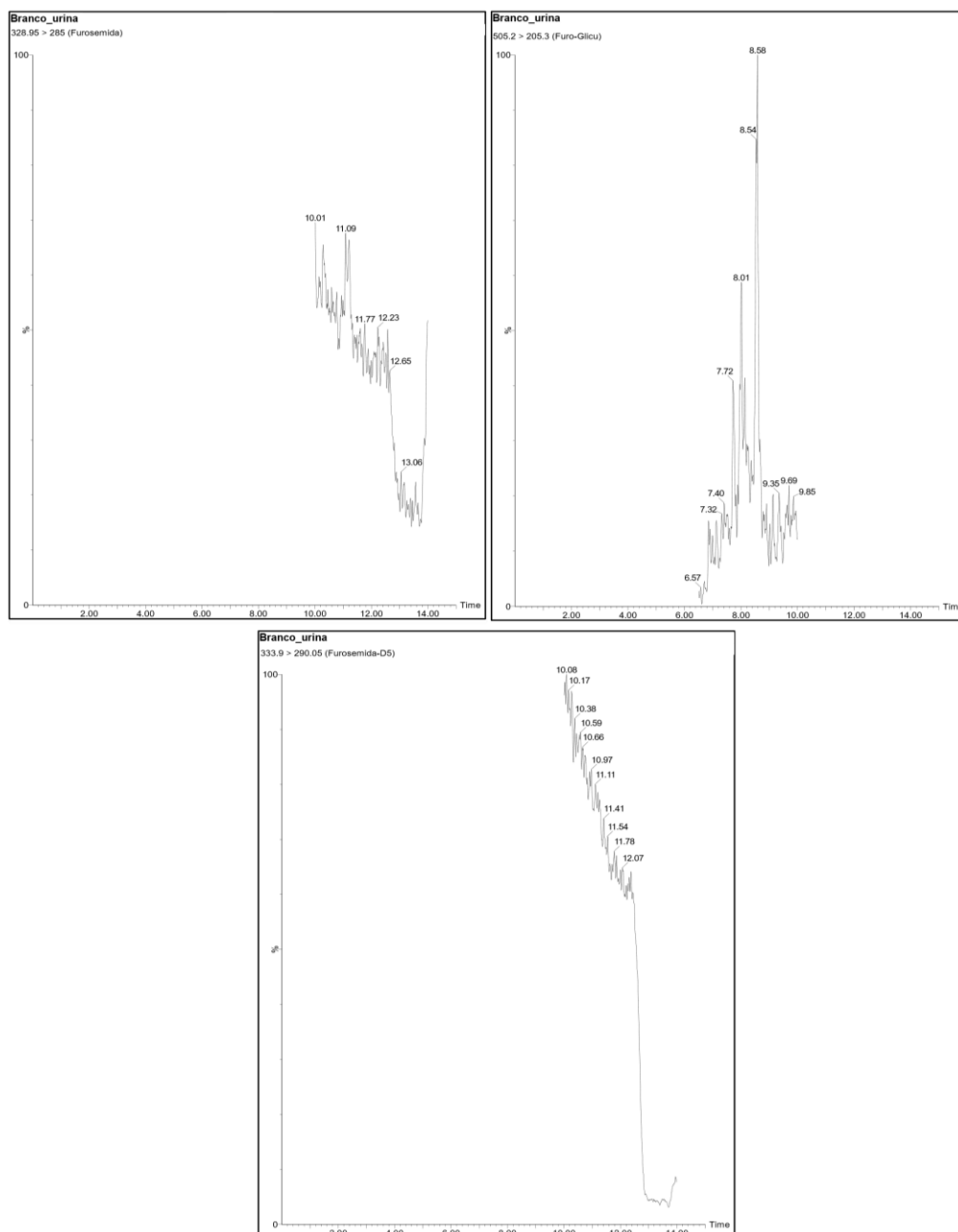
CV: coeficiente de variação [(desvio padrão/concentração média experimental)] \*100, EPR: erro padrão relativo [(concentração média experimental - valor nominal) /valor nominal] \* 100. CQ: controles de qualidade, LIQ: limite inferior de quantificação do método, CQB: controle de qualidade de baixa concentração, CQM: controle de

qualidade de média concentração, CQA: controle de qualidade de alta concentração, CQD: controle de qualidade de diluição (CQ diluído em plasma na proporção de 1:10).

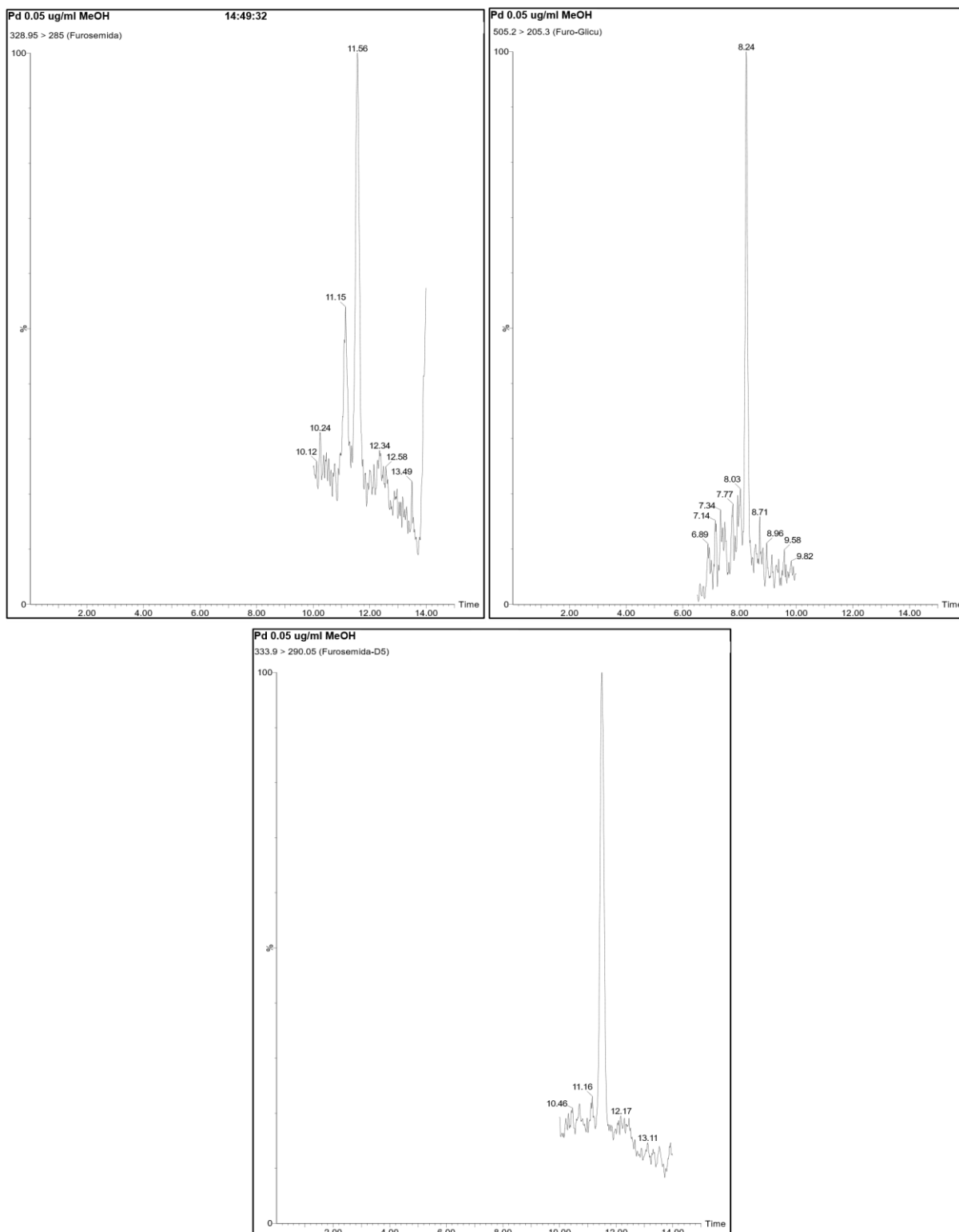
### 4.3 Resultados das validações dos métodos analíticos em urina

Foram obtidos os cromatogramas por meio da análise de amostra de urina branco indicada na Figura 29, urina enriquecido na concentração do LIQ (0,05 µg/mL) indicada na Figura 30 e amostra de paciente saudável após a administração única oral de 40 mg de FUR (Figura 31).

**Figura 20** - Cromatogramas obtidos na análise de urina branco. Analito furosemida (FUR) monitorado na transição 328,95 > 285, glicuronídeo de furosemida monitorado na transição 505,20 > 205,30 e padrão interno furosemida deuterado (FUR-D5) monitorado na transição 333,9 > 290,05. Tempo de retenção: 8,2 e 11,5 minutos.



**Figura 21** - Cromatogramas obtidos na análise de urina branco enriquecida na concentração do limite inferior de quantificação (LIQ; 0,05 µg/mL). Analito furosemida (FUR) monitorado na transição 328,95 > 285, glicuronídeo de furosemida monitorado na transição 505,20>205,30 e padrão interno furosemida deuterado (FURD5) monitorado na transição 333,9 > 290,05. Tempo de retenção: 8,2 e 11,5 minutos.



**Figura 22** - Cromatogramas obtidos na análise de amostra de urina de voluntário saudável. Analito furosemida (FUR) monitorado na transição 328,95 > 285, glicuronídeo de furosemida monitorado na transição 505,20>205,30 e padrão interno furosemida deuterado (FUR-D5) monitorado na transição 333,9 > 290,05. Tempo de retenção: 8,2 e 11,5 minutos.



Além disso as tabelas 7 e 8 descrevem os resultados dos parâmetros de validação do método de determinação da FUR e FUR-GLI.

**Tabela 7 - Efeito matriz, linearidade, equação da reta e coeficiente de correlação (r<sup>2</sup>) do método de determinação de furosemida e de furosemida glicuronídeo em urina.**

	Efeito matriz FMN médio (CV%)	Linearidade (ng/mL de matriz)	Equação da reta	r <sup>2</sup>
Urina (FUR)	CQB: 3,48 CQM: 5,77 CQA: 5,84	50 – 20.000	Y= 1,65188x + 0,0217498	0,997462
Urina (FUR-GLI)	CQB: 5,71 CQM: 6,24 CQA: 5,75	50 – 20.000	Y=0,3334x + 0,00232709	0,997974

**Tabela 8 - Parâmetros de validação do método de determinação de furosemida e furosemida glicuronídeo em urina.**

	Furosemida		Glicuronídeo de furosemida	
	Experimentos intra-ensaio (n=8)			
	Precisão (CV%)	Exatidão (EPR %)	Precisão (CV%)	Exatidão (EPR %)
LIQ (50 ng /mL)	6,10	-4,50	10,13	-8,00
CQB (100n g /mL)	5,14	-1,12	2,84	-6,25
CQM (10.000 ng/mL)	1,40	-4,80	1,66	-2,97
CQA (16.000 ng /mL)	-7,31	-4,27	3,14	-6,30
CQD (1:10; 10.000 ng /mL)	2,10	-4,28	2,41	-2,94
Experimentos inter-ensaios (n=3)				
	Precisão (CV%)	Exatidão (EPR %)	Precisão (CV%)	Exatidão (EPR %)
LIQ (50 ng /mL)	7,03	-5,00	8,40	2,50
CQB (100n g /mL)	2,24	1,00	1,38	2,50
CQM (10.000 ng/mL)	2,21	-2,53	2,43	-0,91
CQA (16.000 ng /mL)	2,67	-4,14	2,89	-1,81
CQD (1:10; 10.000 ng /mL)	3,18	-3,61	2,94	-2,18
Estabilidade em matriz biológica				
Pós-processamento (15 °C por 21 h; n = 8)				
	Precisão (CV%)	Exatidão (EPR %)	Precisão (CV%)	Exatidão (EPR %)
CQB (100n g /mL)	3,87	2,37	8,23	-3,87
CQM (10.000 ng/mL)	1,04	-4,73	1,29	-6,14
CQA (16.000 ng /mL)	1,31	-6,84	1,42	-5,77
Estabilidade de curta duração (24 °C por 2 h; n = 8)				
CQB (100n g /mL)	2,86	1,86	4,74	-2,14
CQM (10.000 ng/mL)	1,81	5,31	1,52	12,79
CQA (16.000 ng /mL)	1,86	-2,20	3,82	2,20
Estabilidade em ciclo de congelamento e descongelamento (3 vezes; -80°C até 24°C; n = 8)				
CQB (100n g /mL)	6,18	7,14	7,91	-0,50
CQM (10.000 ng/mL)	1,40	1,30	1,73	9,11
CQA (16.000 ng /mL)	1,74	-9,76	2,34	-4,04

CV: coeficiente de variação [(desvio padrão/concentração média experimental)] \*100, EPR: erro padrão relativo [(concentração média experimental - valor nominal) /valor nominal] \* 100. CQ: controles de qualidade, LIQ: limite inferior de quantificação do método, CQB: controle de qualidade de baixa concentração, CQM: controle de qualidade de média concentração, CQA: controle de qualidade de alta concentração, CQD: controle de qualidade de diluição (CQ diluído em plasma na proporção de 1:10).

#### 4.4 Impacto da gestação

Foram investigadas 10 participantes durante o segundo ou terceiro trimestre da gestação e 12 participantes não gestantes para avaliar a influência da gravidez na atividade dos transportadores OAT 1 e 3. Nenhuma participante recrutada apresentou efeitos tóxicos após a administração da dose de furosemida.

A tabela 9 apresenta as características demográficas das participantes gestantes e não gestantes saudáveis. Assim como, a tabela 10 indica os parâmetros bioquímicos e hematológicos de ambas as populações. Por fim, a tabela 11 descreve o impacto da gestação na farmacocinética da FUR. As participantes gestantes quando comparadas com as não gestantes apresentam maiores valores medianos (intervalo interquartil) de CL/F (38,17 vs 18,58 L/h) e CL<sub>NR</sub> (31,64 vs 12, 51 L/h) e não mostraram diferenças nos valores de CL<sub>R</sub> (7,85 vs 6,09 L/h), CL<sub>SEC</sub> (7,70 vs 6,05 L/h) e CL<sub>M</sub> (2,47 vs 2,92 L/h).

A figura 23 apresenta os gráficos de concentração plasmática de FUR vs tempo para as participantes não gestantes saudáveis (n = 12) e a figura 24 os gráficos para as participantes gestantes saudáveis (n = 10). Além disso, a figura 25 apresenta os parâmetros farmacocinéticos da FUR que não apresentaram diferença estatística entre as participantes não gestantes (n = 12) e participantes gestantes (n = 10) após dose única de 40 mg de FUR, assim como a figura 26 apresenta os parâmetros farmacocinéticos da FUR que apresentaram diferença estatística entre as participantes. Os dados estão apresentados em mediana (intervalo interquartil).

**Tabela 9** - Características demográficas das participantes gestantes (n=10) e não gestantes saudáveis (n=12). Os dados estão indicados em mediana (intervalo interquartil).

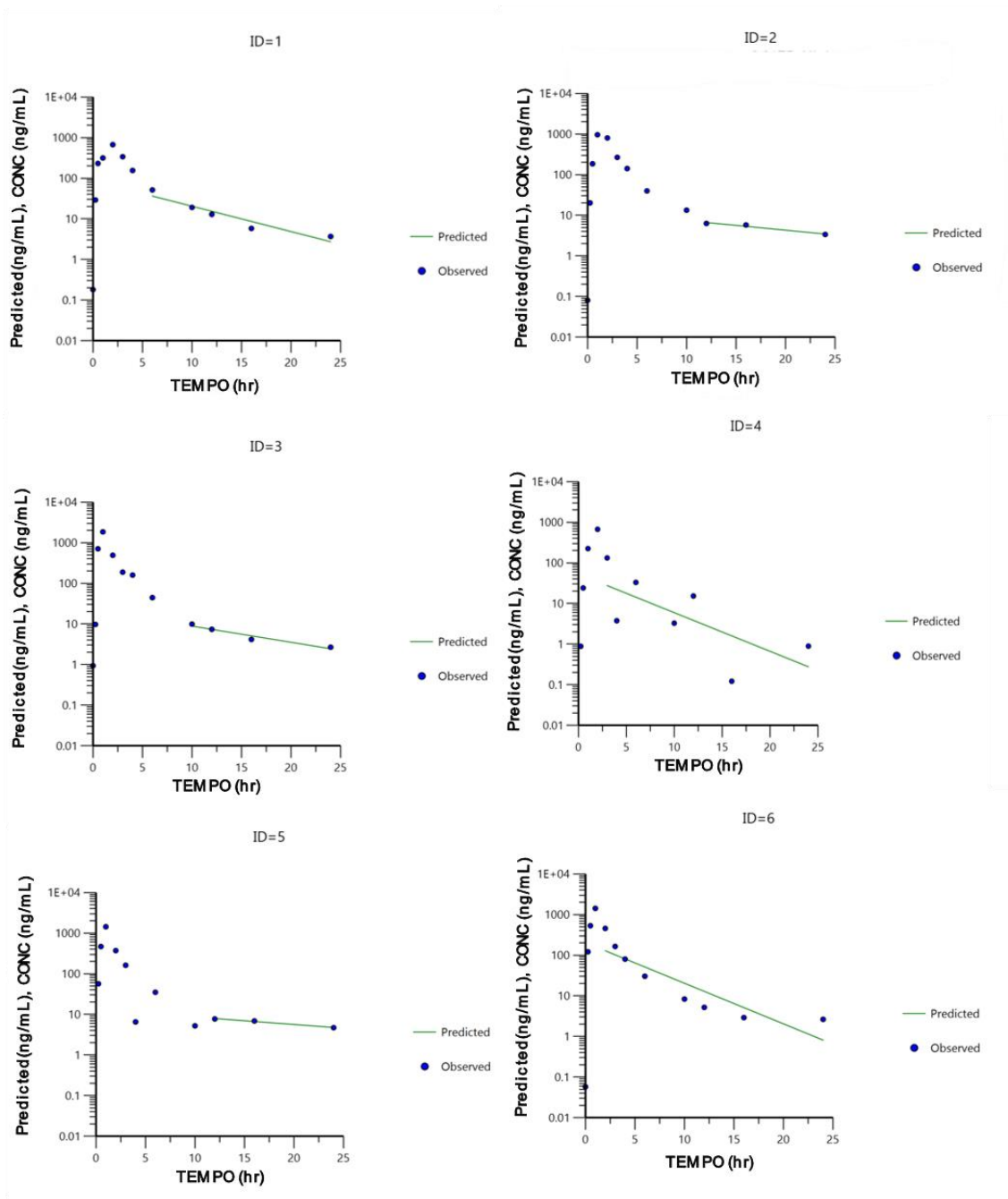
	<b>Gestantes (n=10)</b>	<b>Não Gestantes (n=12)</b>
<b>Idade (anos)</b>	27,01 (21,00 – 31,20)	28,01 (24,00 – 31,71)
<b>Idade gestacional (semanas)</b>	28,70 (22,90 – 37,21)	-
<b>Peso (kg)</b>	75,50 (68,41 – 93,10)	69,20 (57,10 – 78,21)

**Tabela 10** - Parâmetros bioquímicos e hematológicos das participantes gestantes (n=10) e não gestantes saudáveis (n=12). Os dados estão indicados em mediana (intervalo interquartil).

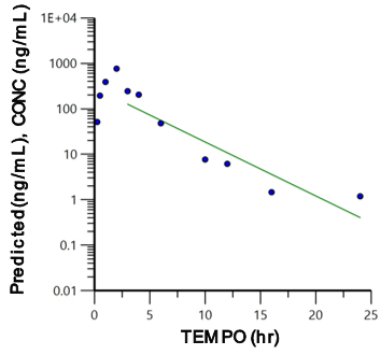
<b>Parâmetros (unidade)</b>	<b>Gestantes (n=10)</b>	<b>Não gestantes (n=12)</b>	
<b>Hematócrito (%)</b>	34,50 (32,71 – 36,50)	40,51 (38,01 – 41,50)	35,4 - 46,3
<b>Hemoglobina (g/L)</b>	11,71 (11,10 – 12,10)	13,30 (12,40 – 13,91)	12,4 - 16,1
<b>Plaquetas (10<sup>3</sup>/μL)</b>	271,50 (218,71 – 279,50)	269,01 (227,01 – 327,01)	203 - 445
<b>Proteínas totais (g/dL)</b>	6,10 (5,78 – 6,32)	6,64 (6,17 – 7,40)	6,1 - 7,9
<b>TGO (U/L)</b>	16,80 (14,41 – 19,22)	17,01 (14,01 – 23,02)	Até 32
<b>TGP (U/L)</b>	14,20 (10,81 – 19,10)	16,01 (13,01 – 22,00)	Até 31
<b>Albumina (g/dL)</b>	3,54 (3,42 – 3,81)	4,37 (3,92 – 4,51)	3,5 - 4,8
<b>Glicemia (mg/dL)</b>	71,60 (64,90 – 77,61)	77,41 (72,80 – 80,31)	70 - 100
<b>Alfa-1-Glicoproteína ácida (mg/dL)</b>	61,80 (45,01 – 76,30)	76,41 (59,40 – 80,01)	50 - 120
<b>Fosfatase alcalina (U/L)</b>	158,10 (118,50 – 175,21)	58,01 (47,90 – 64,31)	65 - 300
<b>Gama-GT (U/L)</b>	27,70 (12,40 – 35,71)	16,00 (10,81 – 20,71)	7,0 - 32
<b>Creatinina sérica (mg/dL)</b>	0,57 (0,47 – 0,65)	0,75 (0,65 – 0,82)	0,6 - 1,1
<b>CL<sub>CR</sub> (L/h)</b>	11,10 (9,59 – 12,60)	7,53 (6,08 – 8,80)	-
<b>Medicamentos em uso</b>	1, 2, 3, 4, 5, 6	-	-

**Notas:** CL<sub>CR</sub>: Clearance de creatinina - avaliado pela equação de Cockcroft-Gault. 1: sulfato ferroso; 2: metamazol; 3: ácido fólico; 4: miconazol (tópico); 5: levotiroxina; 6: heparina.

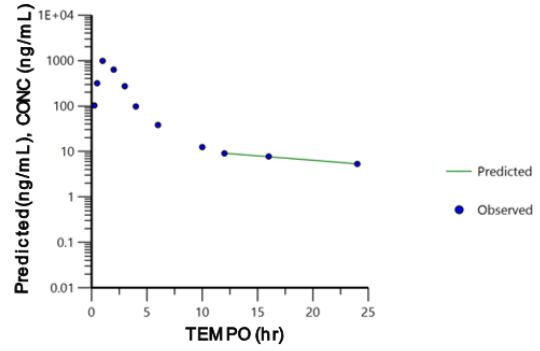
**Figura 23** - Gráficos de concentração plasmática de furosemida vs tempo das participantes não gestantes saudáveis (n=12).



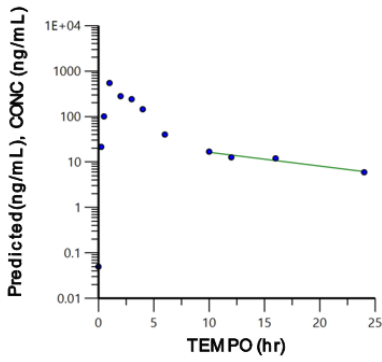
ID=7



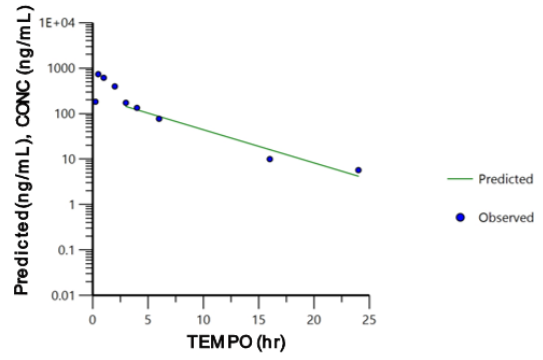
ID=8



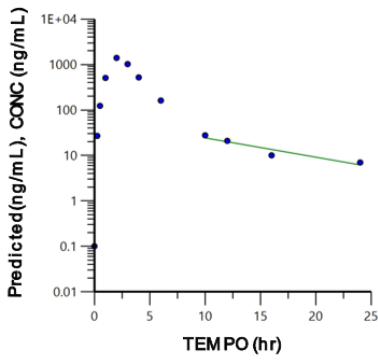
ID=9



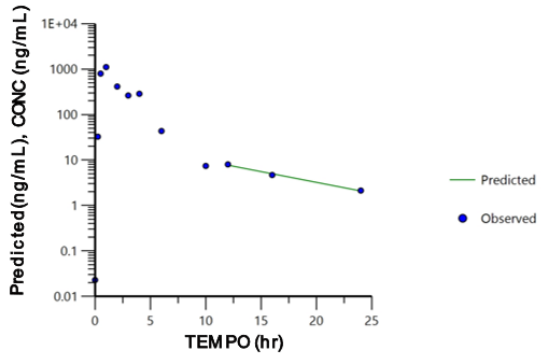
ID=10



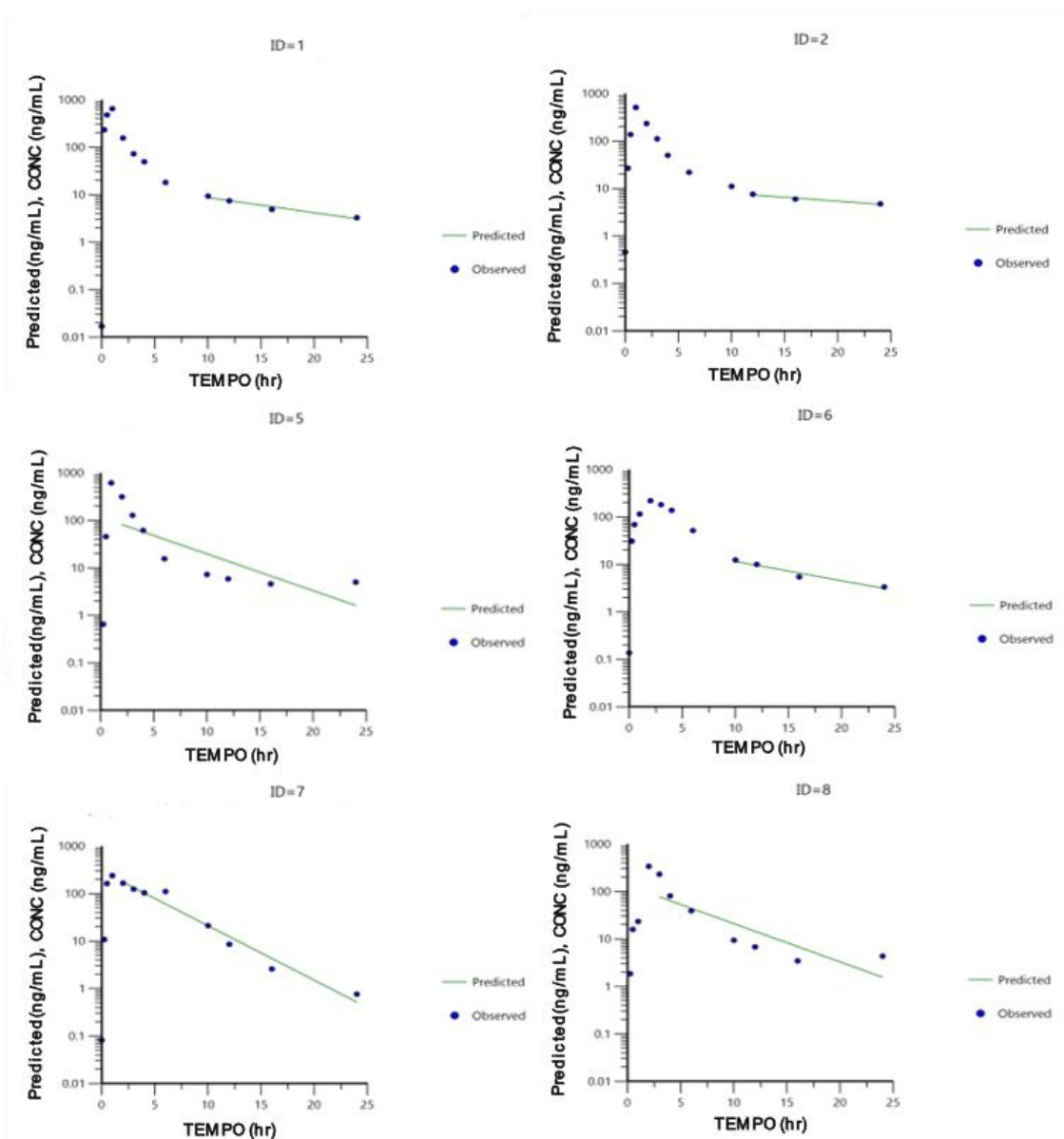
ID=11

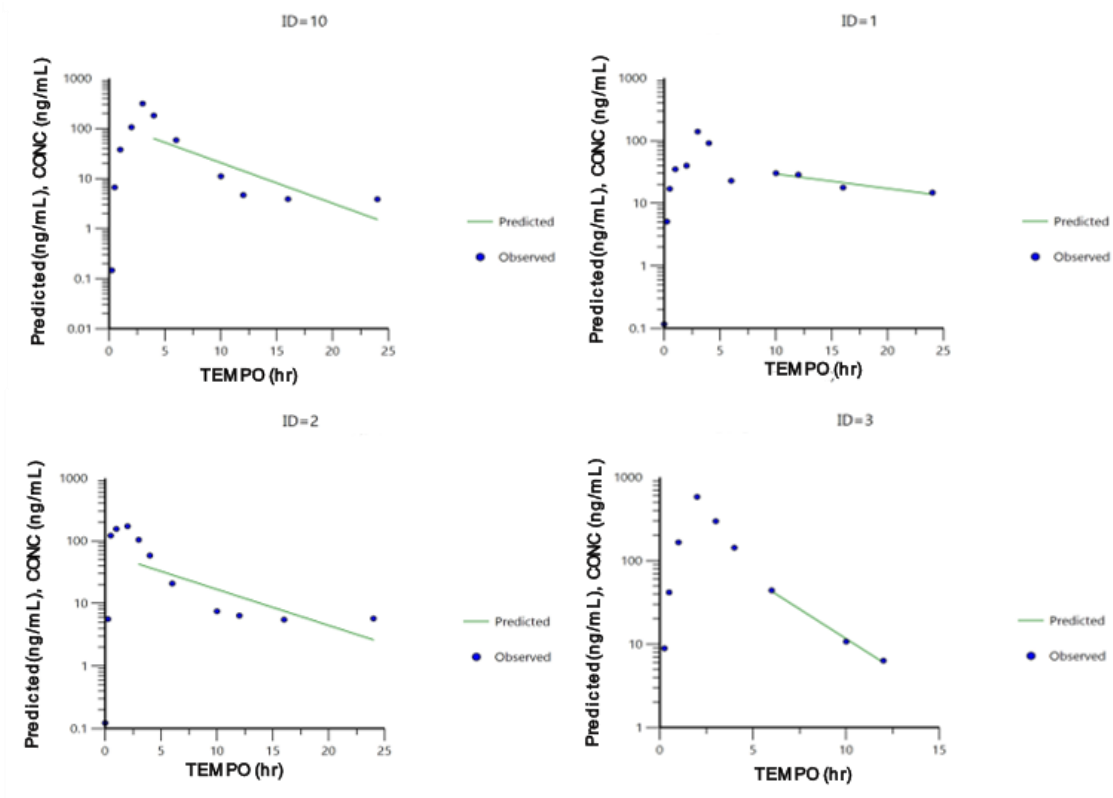


ID=12

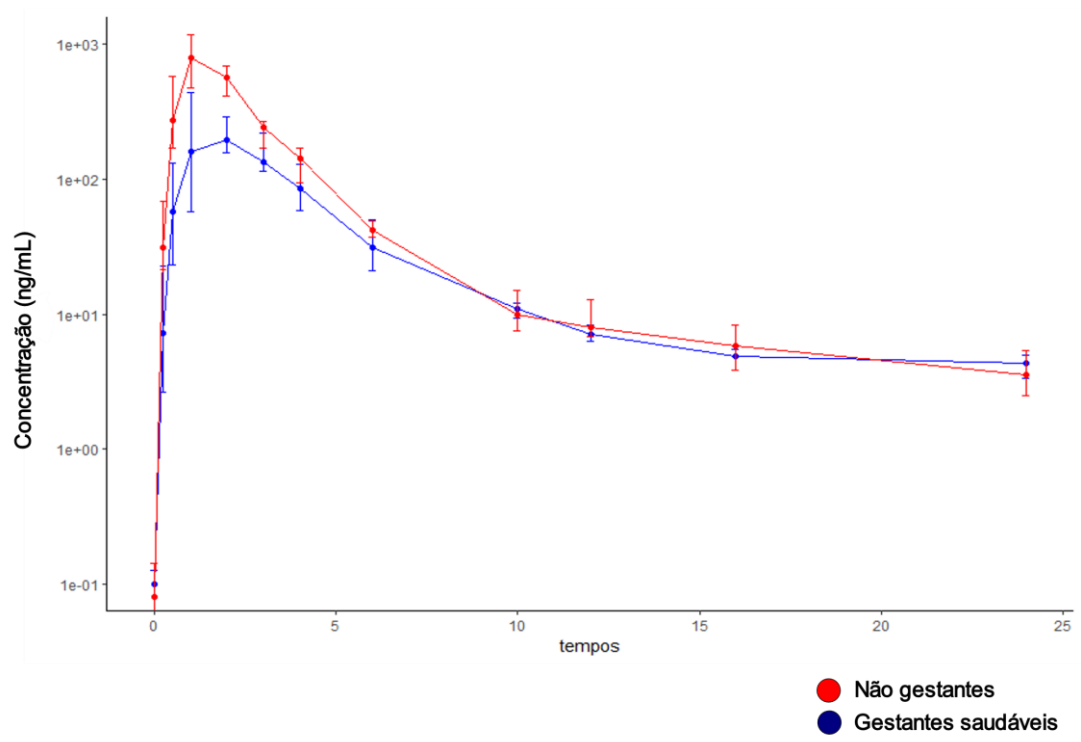


**Figura 24** - Gráficos de concentração plasmática de furosemida vs tempo das participantes gestantes saudáveis (n=10).





**Figura 25** - Gráfico de comparação da concentração plasmática de furosemida vs tempo das participantes gestantes saudáveis com não gestantes. Os dados estão indicados em mediana (intervalo interquartil).

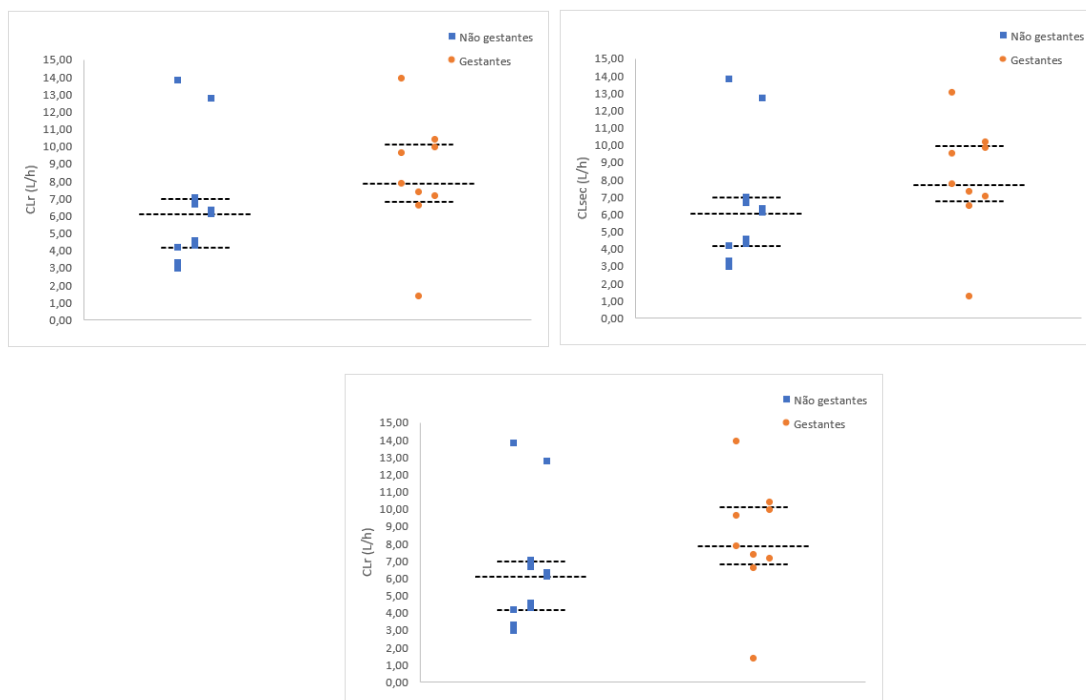


**Tabela 11** - Parâmetros farmacocinéticos da furosemida observados em participantes gestantes (n=10) e não gestantes saudáveis (n=12) após dose única de 40 mg de furosemida. Os dados estão indicados em mediana (intervalo interquartil).

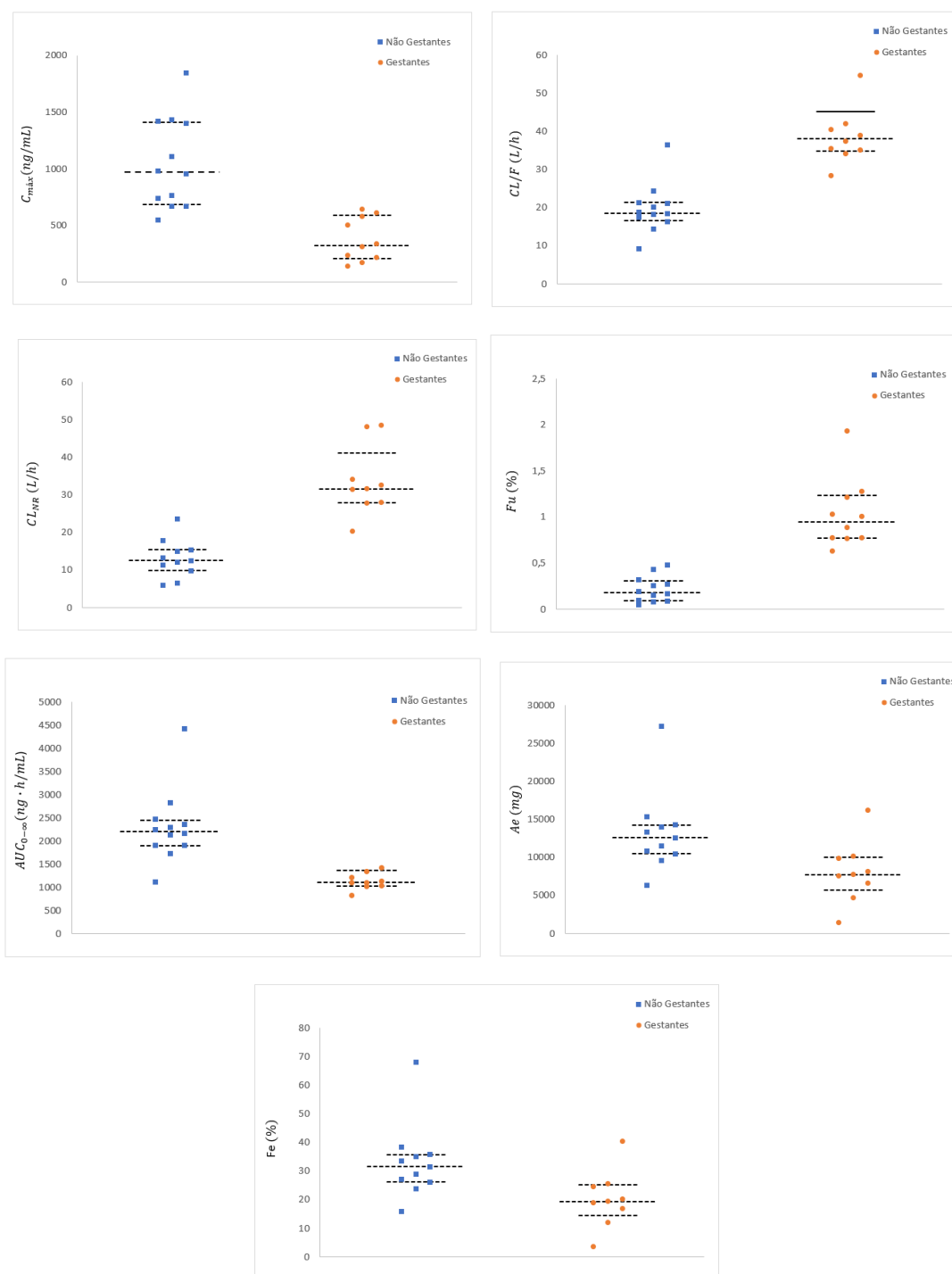
	Gestantes (n=10)	Não gestantes (n=12)	Valor de p
<b>T<sub>max</sub> (h)</b>	2,00 (1,00 - 2,25)	1,00 (1,00 - 2,00)	0,12
<b>C<sub>max</sub> (ng/mL)</b>	325,55 (205,57 - 589,38)	970,36 (686,70 - 1413,31)	< 0,0001
<b>AUC<sub>0-24</sub>(ng.h/mL)</b>	1049,08 (897,10 - 1148,46)	2153,13 (1877,58 - 2417,44)	< 0,0001
<b>AUC<sub>0-∞</sub>(ng.h/mL)</b>	1110,48 (1033,88 - 1362,50)	2200,67 (1904,55 - 2447,74)	< 0,0001
<b>Fu (%)</b>	0,94 (0,77 - 1,23)	0,18 (0,09- 0,31)	< 0,0001
<b>Ae (mg)</b>	7,75 (5,67 - 10,04)	12,61 (10,48 - 14,28)	0,015
<b>Fe (%)</b>	19,39 (14,50 - 25,11)	31,53 (26,21 - 35,71)	0,016
<b>CL/F (L/h)</b>	38,17 (34,83 - 45,17)	18,58 (16,56 - 21,30)	< 0,0001
<b>CL<sub>R</sub> (L/h)</b>	7,85 (6,84 - 10,14)	6,09(4,16 - 6,98)	0,095
<b>CL<sub>SEC</sub> (L/h)</b>	7,70 (6,74 - 9,98)	6,05 (4,15 - 6,96)	0,095
<b>CL<sub>M</sub> (L/h)</b>	2,47 (1,75 - 4,64)	2,92 (1,92 - 3,66)	> 0,9999
<b>CL<sub>NR</sub> (L/h)</b>	31,64 (27,91 - 41,16)	12,51 (9,81 - 15,44)	< 0,0001

T<sub>max</sub>: tempo de observação do C<sub>max</sub>; C<sub>max</sub>: concentração plasmática máxima; AUC<sub>0-24</sub>: área sob a curva concentração plasmática × tempo coletado no intervalo de 0 a 24h; AUC<sub>0-∞</sub>: área sob a curva concentração plasmática × tempo extrapolada ao infinito; Fu: fração livre; Ae: quantidade excretada na urina; Fe: fração da dose eliminada inalterada na urina; CL/F: clearance total aparente; CL<sub>R</sub>: clearance renal; CL<sub>M</sub>: clearance de formação do glicuronídeo de furosemida; CL<sub>NR</sub>: clearance não renal; Grupos avaliados pelo teste de Mann-Whitney (p > 0,05).

**Figura 26** - Parâmetros farmacocinéticos da furosemida que não apresentaram diferença estatística entre as participantes não gestantes (quadrados azuis; n = 12) e participantes gestantes (círculos laranja; n = 10) após dose única de 40 mg de furosemida, mas são importantes. Dados apresentados em mediana (intervalo interquartil). Grupos avaliados pelo teste de Mann-Whitney (p > 0,05).



**Figura 27** - Parâmetros farmacocinéticos da furosemida que apresentaram diferença estatística entre as participantes não gestantes (quadrados azuis; n = 12) e participantes gestantes (círculos laranja; n = 10) após dose única de 40 mg de furosemida. Dados apresentados em mediana (intervalo interquartil). Grupos avaliados pelo teste de Mann-Whitney ( $p > 0,05$ ).



#### 4.5 Impacto da pielonefrite aguda

O hospital local realizou a internação de 69 pacientes gestantes para o tratamento de pielonefrite aguda durante o período do estudo. Porém, muitas pacientes foram excluídas por não aceitarem participar ou por se encaixarem nos critérios de exclusão do estudo. Desta forma, houve a participação de 10 pacientes gestantes em tratamento para pielonefrite aguda na Fase I e 7 na Fase II do estudo. A maioria das pacientes recrutadas apresentaram típicos sintomas de infecção como febre, sinal de Giordano positivo e mal-estar geral. Adicionalmente, apresentaram leucociteúria e nitrito positivo na urina. Nenhuma participante recrutada apresentou efeitos tóxicos após a administração da dose de furosemida.

A tabela 12 apresenta as características demográficas das participantes gestantes com pielonefrite aguda. Assim como, a tabela 13 indica os parâmetros bioquímicos e hematológicos de ambas as ocasiões. A tabela 14 apresenta as concentrações plasmáticas de citocinas observadas em pacientes gestantes diagnosticadas com pielonefrite aguda antes e depois do tratamento. Por fim, a tabela 15 descreve o impacto da pielonefrite aguda na farmacocinética da FUR. As participantes gestantes diagnosticadas com pielonefrite apresentaram menores valores medianos durante a Fase I em comparação com a Fase II no  $CL_R$  (4,08 vs 7,85 L/h),  $CL_{SEC}$  (3,95 vs 7,70 L/h) e  $CL_M$  (0,80 vs 2,47 L/h).

A figura 27 apresenta os gráficos de concentração plasmática de FUR vs tempo para as participantes gestantes diagnosticadas com pielonefrite na Fase I (n = 10) e a figura 28 os das participantes gestantes diagnosticadas com pielonefrite na Fase II (n = 7). Além disso, a figura 29 apresenta os parâmetros farmacocinéticos da FUR que apresentaram diferença estatística entre as participantes diagnosticadas com pielonefrite nas Fases I (n = 10) e II (n = 7) após dose única de 40 mg de FUR. Os dados estão apresentados em mediana (intervalo interquartil).

**Tabela 12** - Características demográficas das participantes gestantes com pielonefrite aguda. Os dados estão indicados em mediana (intervalo interquartil).

Gestantes com Pielonefrite Aguda		
	Fase I (n = 10)	Fase II (n = 7)
Idade (anos)	24,0 (21,0 – 31,5)	24,0 (21,0 – 30,0)
Idade gestacional (semanas)	29,5 (25,7 – 31,5)	31,0 (25,0 – 32,0)
Peso (kg)	82,0 (64,1 – 103)	75,0 (64,8 – 97,1)

**Tabela 13 - Parâmetros bioquímicos e hematológicos das participantes gestantes com pielonefrite aguda fase I (n = 10) e fase II (n = 7). Os dados estão indicados em mediana (intervalo interquartil).**

Parâmetros (unidade)	Gestantes com Pielonefrite Aguda		
	Fase I (n = 10)	Fase II (n = 7)	Valores de referência
Hematócrito (%)	34,0 (32,7 – 36,0)	35,0 (32,0 – 38,0)	35,4-46,3
Hemoglobina (g/L)	11,5 (10,8 – 12,4)	11,8 (10,7 – 12,3)	12,4-16,1
Plaquetas (10 <sup>3</sup> /μL)	218 (187 – 251)	275 (247 – 285)	203-445
Proteínas totais (g/dL)	5,93 (5,74 – 6,18)	6,22 (6,07 – 6,43)	6,1-7,9
TGO (U/L)	17,1 (13,1 – 26,9)	15,8 (14,5 – 17,9)	Até 32
TGP (U/L)	11,7 (8,87 – 29,1)	15,1 (11,3 – 93,0)	Até 31
Albumina (g/dL)	3,55 (3,46 – 3,70)	3,55 (3,47 – 3,82)	3,5-4,8
Glicemia (mg/dL)	76,3 (71,7 – 93,5)	73,7 (70,4 – 85,5)	70-100
Alfa-1-Glicoproteína ácida (mg/dL)	86,8 (62,4 – 128)	72,6 (57,1 – 79,2)	50-120
Fosfatase alcalina (U/L)	177 (124 – 220)	165 (155 – 181)	65-300
Gama-GT (U/L)	14,2 (10,8 – 20,8)	33,0 (21,1 – 40,0)	7,0-32
Creatinina sérica (mg/dL)	0,63 (0,56 – 0,72)	0,58 (0,45 – 0,66)	0,6-1,1
CL <sub>CR</sub> (L/h)	10,5 (7,92 – 12,2)	12,1 (10,1 – 13,0)	-
Medicamentos em uso	1-5, 7-15	2, 3, 5, 6, 11, 14	-

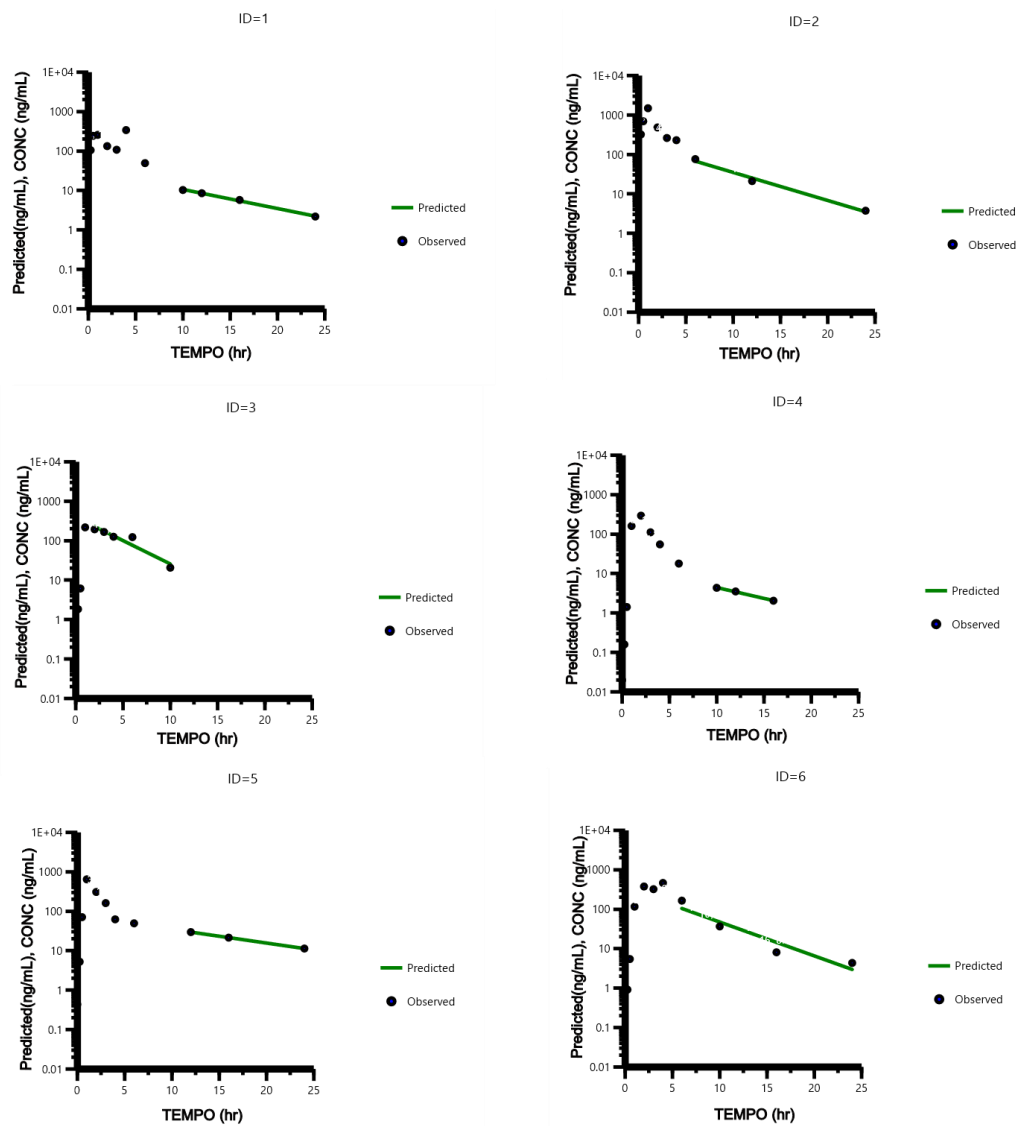
Notas: CL<sub>CR</sub>: Clearance de creatinina - avaliado pela equação de Cockcroft-Gault. 1: sulfato ferroso; 2: metamazol; 3: ácido fólico; 4: miconazol (tópico); 5: levotiroxina; 6: heparina.

**Tabela 14 - Concentrações plasmáticas de citocinas observadas em pacientes gestantes diagnosticadas com pielonefrite aguda antes (Fase I) e depois (Fase II) do tratamento com cefuroxima 750 mg endovenosa. Dados apresentados em mediana (intervalo interquartil).**

Citocinas inflamatórias (pg/mL)	Gestantes com Pielonefrite Aguda – Fase I (n=10)	Gestantes com Pielonefrite Aguda – Fase II (n=7)	Valor de p
IFN-γ	5,68 (3,80 – 8,38)	0,92 (0,73 – 1,91)	0,0001
IL-1β	1,21 (0,60 – 3,21)	1,10 (0,60 – 2,40)	0,9032
IL-2	0,81 (0,68 – 0,98)	0,68 (0,61 – 1,16)	0,9999
IL-4	0,00 (0,00 – 368)	0,00 (0,00 – 650)	0,5566
IL-6	20,40 (5,81 – 73,5)	0,21 (0,11 – 23,7)	0,0398
IL-8	5,04 (0,35 – 47,3)	0,28 (0,15 – 31,4)	0,9515
IL-10	25,40 (18,30 – 77,60)	3,12 (1,53 – 49,7)	0,5416
IL-12p40	4,48 (2,13 – 15,8)	1,34 (1,07 – 17,4)	0,9032
IL-12p70	1,55 (1,00 – 2,26)	1,04 (1,04 – 1,32)	0,3477
MCP-1	779,00 (436,01 – 956,06)	373,32 (277,00 – 403,45)	0,0009
TNF-α	35,90 (22,30 – 52,61)	17,01 (13,30 – 21,42)	0,0009
PCR (mg/dL)	18,70 (12,21 – 43,82)	1,69 (1,09 – 3,32)	0,0012

Nota: IFN: interferon; IL: interleucina; MCP: proteína quimioatraente de monócitos; TNF: fator de necrose tumoral; PCR: proteína C reativa.

**Figura 28** - Gráficos de concentração plasmática de furosemida vs tempo das participantes gestantes com pielonefrite aguda – fase I (n=10).



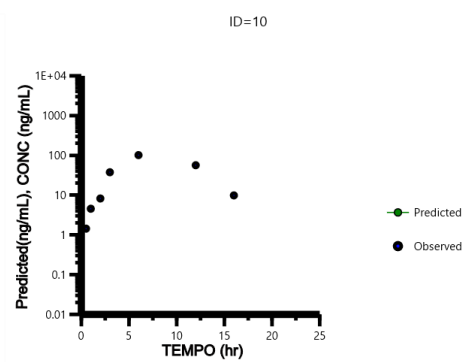
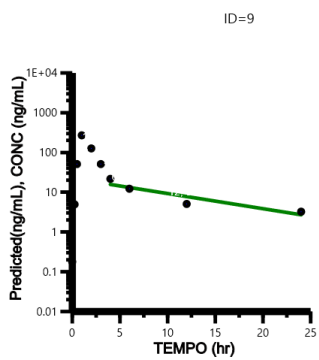
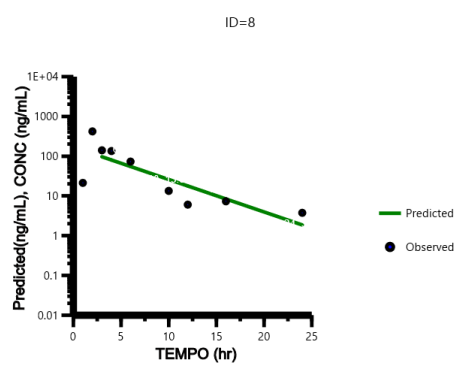
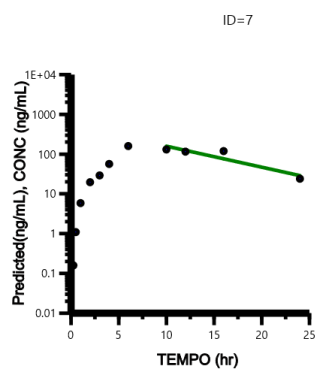
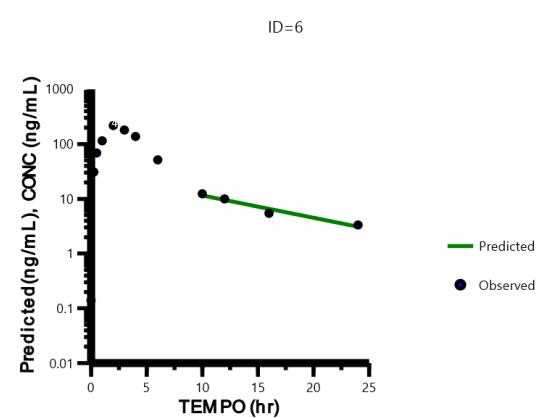
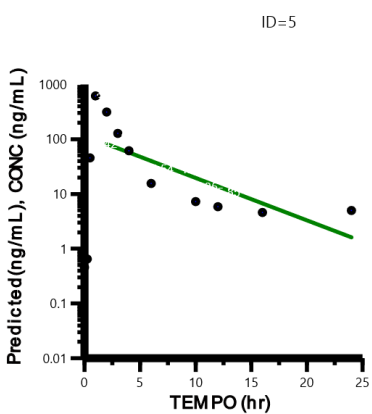
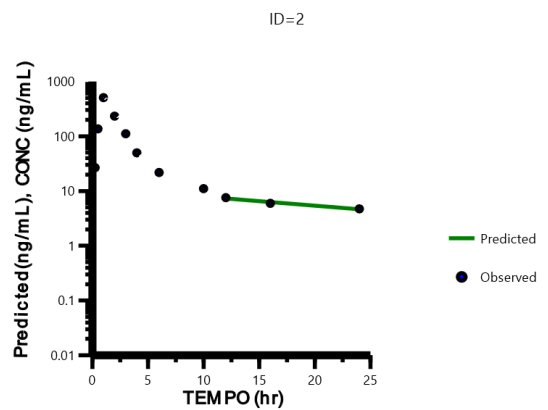
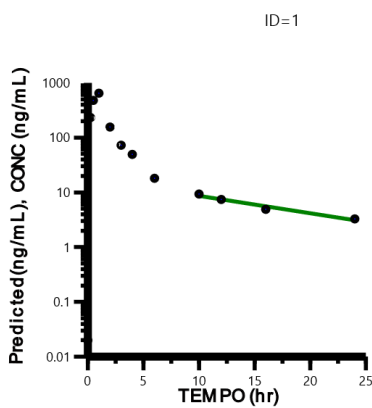
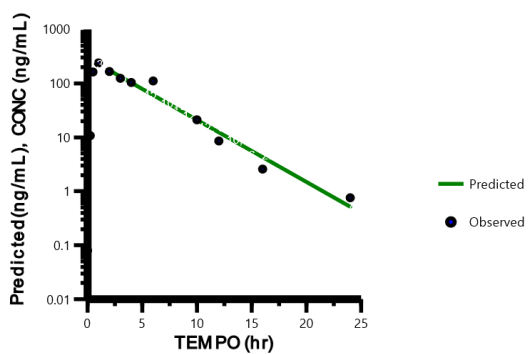


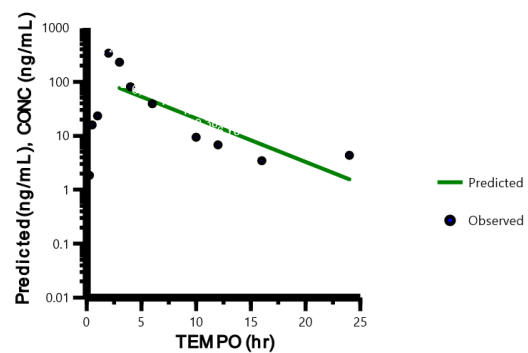
Figura 29 - Gráficos de concentração plasmática de furosemida vs tempo das participantes gestantes com pielonefrite aguda – fase II (n=7).



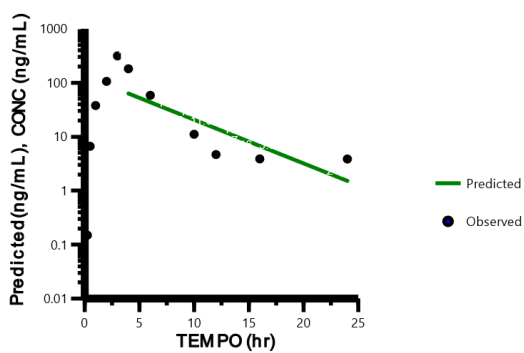
ID=7



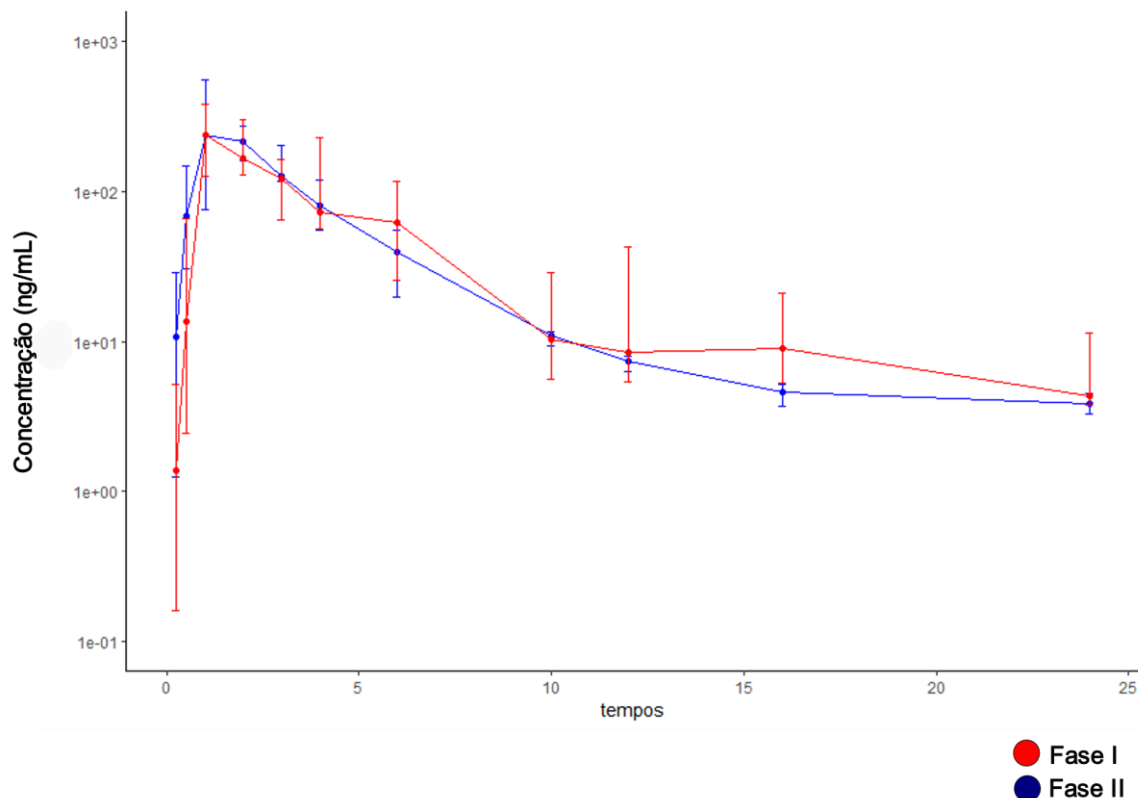
ID=8



ID=10



**Figura 30** - Gráfico de comparação da concentração plasmática de furosemida vs tempo das participantes gestantes com pielonefrite aguda de Fase I e Fase II. Os dados estão indicados em mediana (intervalo interquartil).

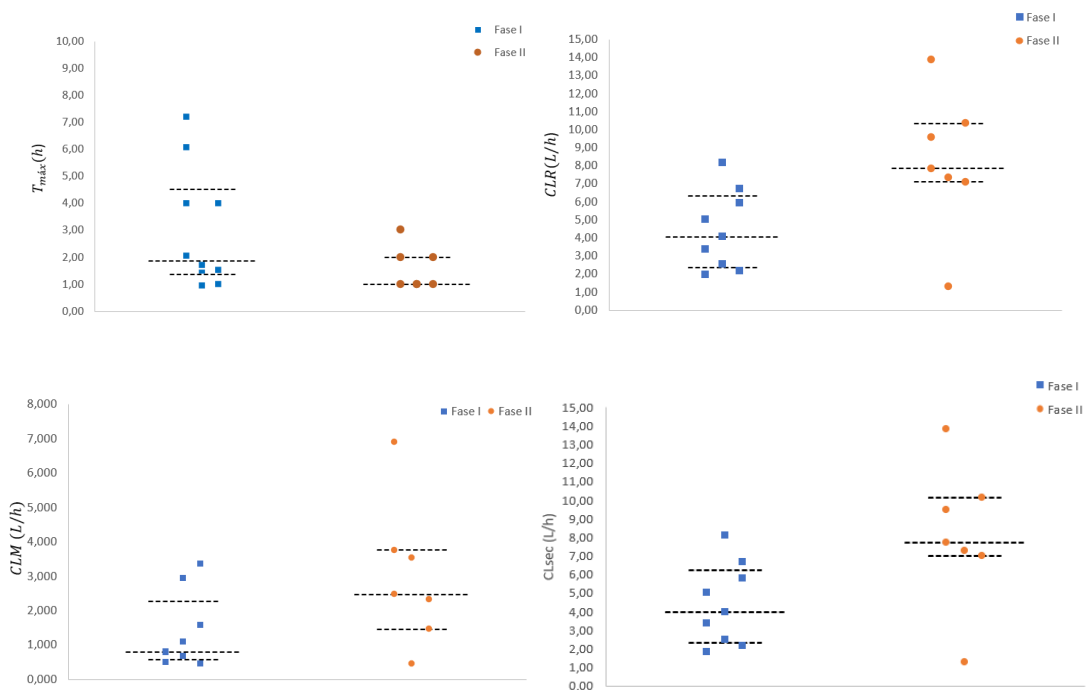


**Tabela 15** - Parâmetros farmacocinéticos da furosemida observados em gestantes com pielonefrite aguda fase I (n = 10) e fase II (n = 7) após dose única de 40 mg de furosemida. Os dados estão indicados em mediana (intervalo interquartil).

	Gestantes com Pielonefrite Aguda – Fase I (n=10)	Gestantes com Pielonefrite Aguda – Fase II (n=7)	Valor de p
<b>T<sub>max</sub> (h)</b>	1,88 (1,38 – 4,52)	1,00 (1,00 – 2,00)	<b>0,046</b>
<b>C<sub>max</sub> (ng/mL)</b>	315,52 (202,67 – 507,54)	337,81 (238,12 – 613,48)	0,812
<b>AUC<sub>0-24</sub>(ng.h/mL)</b>	1233,11 (857,54 – 2173,32)	1067,10 (988,02 – 1141,87)	0,078
<b>AUC<sub>0-∞</sub>(ng.h/mL)</b>	1459,00 (898,80 – 2653,27)	1128,69 (1091,76 – 1341,61)	0,093
<b>Fu (%)</b>	0,96 (0,74 – 1,24)	0,78 (0,77 – 1,28)	0,812
<b>Ae (mg)</b>	5,63 (4,49 – 6,70)	8,12 (7,56 – 10,21)	0,109
<b>Fe (%)</b>	14,08 (11,23 – 16,77)	20,30 (18,92 – 25,54)	0,109
<b>CL/F (L/h)</b>	29,06 (18,40 – 45,86)	37,48 (35,03 – 40,48)	0,109
<b>CL<sub>R</sub> (L/h)</b>	4,08 (2,36 – 6,35)	7,85 (7,11 – 10,37)	<b>0,046</b>
<b>CL<sub>SEC</sub> (L/h)</b>	3,95 (2,29 – 6,21)	7,70 (6,99 – 10,13)	<b>0,046</b>
<b>CL<sub>M</sub> (L/h)</b>	0,80 (0,58 – 2,24)	2,47 (1,47 – 3,76)	<b>0,078</b>
<b>CL<sub>NR</sub> (L/h)</b>	25,28 (15,88 – 43,10)	31,50 (27,91 – 32,64)	0,375

T<sub>max</sub>: tempo de observação do C<sub>max</sub>; C<sub>max</sub>: concentração plasmática máxima; AUC<sub>0-24</sub>: área sob a curva concentração plasmática × tempo coletado no intervalo de 0 a 24h; AUC<sub>0-∞</sub>: área sob a curva concentração plasmática × tempo extrapolada ao infinito; Fu: fração livre; Ae: quantidade excretada na urina; Fe: fração da dose eliminada inalterada na urina; CL/F: clearance total aparente; CL<sub>R</sub>: clearance renal; CL<sub>M</sub>: clearance de formação do glicuronídeo de furosemida; CL<sub>NR</sub>: clearance não renal; Grupos avaliados pelo teste de Wilcoxon (p > 0,05).

**Figura 31** - Parâmetros farmacocinéticos da furosemida que apresentaram diferença estatística entre as participantes gestantes diagnosticadas com pielonefrite Fase I (quadrados azuis;  $n = 10$ ) e Fase II (círculos laranja;  $n = 7$ ) após dose única de 40 mg de furosemida. Dados apresentados em mediana (intervalo interquartil). Grupos avaliados pelo teste de Wilcoxon ( $p > 0,05$ ).



## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Métodos de validação

O estudo apresenta o desenvolvimento e validação de métodos bioanalíticos de determinação de FUR e seu metabólito FUR-GLI em plasma (utilizando a enzima  $\beta$ -glucuronidase), urina e ultrafiltrado de plasma. Com base nos resultados obtidos, observa-se que os métodos apresentaram os parâmetros de validação (precisão, exatidão, linearidade, seletividade, efeito matriz, efeito residual e estudos de estabilidade) dentro dos limites estabelecidos pela Resolução ANVISA RDC n° 27 de 17 de maio de 2012. Assim, os métodos foram considerados seletivos, visto que a análise de diferentes amostras de plasma, plasma hemolisado ou lipêmico, de ultrafiltrado de plasma e urina não evidenciaram a interferência de componentes endógenos nos tempos de retenção dos analitos ou padrão interno. Além disso, o método apresentou efeito residual desprezível, sendo que as amostras de matrizes branco analisadas imediatamente após as amostras fortificadas na concentração do LSQ não apresentaram interferentes. Ademais, a influência do efeito matriz foi desconsiderada, visto que os métodos apresentaram FMN menores que 15% (tabelas 3, 5 e 7). Adicionalmente, os métodos foram considerados precisos, exatos e estáveis nas três modalidades avaliadas (após 3 ciclos de congelamento a  $-80^{\circ}\text{C}$  e descongelamento a  $4^{\circ}\text{C}$ , 6 h na bancada a  $22^{\circ}\text{C}$  e 24 h

após o processamento sendo que todas as amostras foram mantidas a 12 °C), dado que os estudos apresentaram coeficientes de variação e erro padrão relativo menores que 15% (tabelas 4, 6 e 8). Por fim, o método demonstrou pelo estudo de adsorção ao filtro de ultrafiltrado que a FUR não se adere ao filtro resultando na confiabilidade dos valores observados (Tabela 6).

O estudo possui métodos de preparos de amostras relativamente simples e rápido, visto que para plasma se utilizou de extração líquido-líquido em meio ácido com éter metil-terc-butílico como solvente resultando em uma ausência de efeito matriz (coeficientes de variação dos valores de FMN < 15%; Tabela 7). Sendo, assim, um método de preparo vantajoso em relação à extração em fase sólida como método de preparo empregado em alguns estudos (BARANOWSKA; WILCZEK; BARANOWSKI, 2010). Já para as análises de amostra de urina se utilizou apenas solventes simples (solução aquosa de ácido fórmico e acetonitrila) e agitação como procedimento resultando em uma ausência de efeito matriz (coeficientes de variação dos valores de FMN < 15%; Tabela 12). Sendo, assim, um método de preparo vantajoso em relação a outros métodos utilizados em estudos que empregaram extração líquido - líquido como método de preparo (ABOU-AUDA et al., 1998; DEVENTER; DELBEKE; VAN EENOO, 2002; DEVENTER; VAN EENOO; DELBEKE, 2005).

Realizou-se a análise da FUR em plasma na coluna RP-select B e foi utilizado a fase móvel de forma isocrática com uma composição simples de solventes (solução aquosa de ácido fórmico e acetonitrila) e sem a necessidade de utilização de solução tampão. Desta forma, obteve-se 7 minutos como tempo total de corrida cromatográfica, sendo um tempo análogo ou menor ao tempo de corrida reportado por outros estudos que realizaram a determinação de FUR em plasma (ABOU-AUDA et al., 1998). Já a análise da FUR em urina foi realizada na mesma coluna, porém empregando fase móvel em modo de gradiente utilizando uma composição de solventes simples (solução aquosa de ácido fórmico e acetonitrila adicionado de ácido fórmico) e sem a necessidade de utilização de solução tampão. Além disso, obteve-se 15 minutos como tempo total de corrida cromatográfica, sendo um tempo análogo ou menor ao tempo de corrida cromatográfica reportado por outros estudos que realizaram a determinação de FUR (DEVENTER; DELBEKE; VAN EENOO, 2002; DEVENTER; VAN EENOO; DELBEKE, 2005).

Os métodos de determinação de FUR e seu metabólito FUR-GLI desenvolvidos possuem valores de LIQ menores (0,50 ng/mL de plasma, 0,12 ng/mL de ultrafiltrado de plasma e 50 ng/mL de urina) ou semelhantes a outros estudos, os estudos que empregaram

HPLC-MS/MS para a determinação de FUR em matrizes biológicas apresentaram valores de LIQ variando de 0,90 – 50 ng/mL de plasma e próximos de 50 ng/mL de urina, (ABDELHAMID, et al., 2000; THIEME et al., 2001; SIMONSEN et al., 2010; SORA et al., 2010 STOPFER et al., 2016; VEDAR et al., 2021).

Poucos estudos apresentam a determinação do FUR-GLI em plasma e urina. Um estudo utilizando o sistema HPLC-UV, empregando coluna C18 e fase móvel em modo gradiente constituída de acetonitrila e ácido ortofosfórico 0,5% (pH 2,1) e utilizando precipitação de proteína como preparo de amostra, determinou o fármaco inalterado e seu metabólito, simultaneamente, tanto em urina quanto em plasma (VREE; VAN DEN BIGGELAAR-MARTEA; VERWEY-VAN WISSEN, 1994). O presente estudo determinou o FUR-GLI de forma indireta em plasma devido a não separação cromatográfica completa da FUR e pela redução do sinal analítico no detector MS/MS quando comparada a FUR, consequentemente iria resultar em um LIQ insuficiente, da mesma forma que foi observado efeito matriz na precipitação de proteínas e a extração em fase sólida resultou em baixos valores de recuperação. Porém, o estudo descreve métodos de determinação direta de FUR-GLI em urina e ultrafiltrado de plasma, assim como da FUR e seu metabólito de maneira indireta em plasma através de hidrólise enzimática, empregando HPLC-MS/MS pela primeira vez. Além disso, apresenta um baixo LIQ, um volume de amostra baixo e tempo de corrida aceitável.

## **5.2 Impacto da gestação**

O estudo teve como objetivo quantificar o impacto da gestação na atividade dos transportadores de ânions orgânicos (OAT) 1 e 3 utilizando a FUR como fármaco marcador (STOPFER et al., 2016; FDA, 2022). Assim, o impacto foi investigado através de dois grupos independentes: participantes gestantes (n = 10) e não gestantes (n = 12). As participantes gestantes encontravam-se no segundo ou terceiro trimestre da gestação (8 das 10 no terceiro trimestre de gestação), ou seja, os dados foram colhidos no momento que as alterações fisiológicas estão acentuadas (no final da gravidez) (ANDERSON, 2005, TASNIF; MORADO; HEBERT, 2016; KAZMA et al., 2020).

Desta forma, as participantes gestantes quando comparadas com as não gestantes apresentam maiores valores medianos (intervalo interquartil) de CL/F 38,17 (34,83 – 45,17) vs 18,58 (16,56 – 21,30) L/h e CL<sub>NR</sub> 31,64 (27,91 – 41,16) vs 12, 51 (9,81 – 15,44) L/h, assim como valores menores de C<sub>max</sub> 325,55 (205,57 – 589,38) vs 970,36 (686,70 – 1413,31) ng/mL, AUC<sub>0-∞</sub> 1110,48 (1033,88 – 1362,50) vs 2200,67 (1904,55 – 2447,74) ng×h/mL, Ae

7,75 (5,67 – 10,04) vs 12,61 (10,48 – 14,28) mg e Fe 19,39 (14,50 – 25,11) vs 31,53 (26,21 – 35,71) %. Além disso, não foi observada diferença nos valores de  $CL_R$ . Desta forma, os resultados sugerem que a eliminação renal da FUR não foi alterada pela gestação, visto que não se observou diferença no  $CL_R$ . Ademais, apesar da diferença estatística, os dois grupos apresentaram  $F_u < 0,9\%$ . Considerando que a FUR está quase totalmente ligada às proteínas plasmáticas, sua eliminação através da urina por filtração glomerular é pouco significativa. Em relação ao  $CL_M$  também não foi observada diferença entre os dois grupos, um dado compatível com a literatura considerando que a FUR é eliminada principalmente por excreção biliar e o metabólito FUR-GLI foi analisado somente em amostras de urina. Portanto, como as participantes gestantes quando comparadas com as não gestantes não mostraram diferenças nos valores medianos de  $CL_R$  (7,85 vs 6,09 L/h),  $CL_{SEC}$  (7,70 vs 6,05 L/h) e  $CL_M$  (2,47 vs 2,92 L/h), os resultados sugerem que a eliminação renal da FUR não foi alterada pela gravidez, e portanto, a atividade de influxo dos OAT 1 e 3 não estão alteradas durante o terceiro trimestre da gestação.

Um estudo recente de modelagem e simulação reuniu os dados dos estudos da amoxicilina e tenofovir e outros com o objetivo de identificar o impacto da gestação na atividade dos OATs 1, 2 e 3 durante os três meses de gestação construindo um algoritmo capaz de simular as concentrações de outros substratos, o que possibilita ajustes de doses nesta população. Peng e colaboradores (2021) reportam aumento (de 2 a 3 vezes) das atividades dos OATs 1 e 3 no primeiro e segundo trimestres da gestação, mas não no terceiro trimestre, quando comparados com períodos pós-parto ou não gestantes. Desta forma, o estudo corrobora com os resultados encontrados no presente estudo com dados oriundos de gestantes no terceiro trimestre da gestação. Porém, os autores assumiram algumas condições no estudo para as simulações, como a não alteração no  $CL_{NR}$  durante a gravidez, sendo o oposto do observado pelo presente estudo, visto que os resultados sugerem aumento do  $CL_{NR}$  na gestação. Sugerindo, assim, que o modelo desenvolvido pode não ter capacidade de simular as concentrações de FUR com exatidão aceitável.

Porém a influência da gravidez na atividade dos OATs 1 e 3 ainda é controversa, visto que o estudo realizado por Andrew e colaboradores (2007) relativo ao impacto da gestação na farmacocinética da amoxicilina (antibiótico eliminado majoritariamente por eliminação renal via OAT 3) (BOCCI; OPREA; BENET, 2022; PENG; LADUMOR; UNADKAT, 2021) relata aumento ( $\approx 40\%$ ) no  $CL_{SEC}$  da amoxicilina durante o segundo e terceiro trimestres da gestação, o que sugere a diminuição da reabsorção tubular ou o aumento na atividade do OAT 3.

### 5.3 Impacto da pielonefrite aguda

O estudo investigou a interação fármaco-doença utilizando a FUR como fármaco marcador (STOPFER et al., 2016; FDA, 2022) em gestantes com pielonefrite avaliadas antes (Fase I) e após o tratamento com antibióticos (Fase II). A Fase I corresponde a 10 pacientes na presença da inflamação sistêmica e a Fase II corresponde a 7 pacientes após o tratamento (remissão de sintomas, controle da infecção e redução da inflamação). A fim de obter o pareamento completo entre as fases, o retorno da paciente para a segunda fase do protocolo foi realizado o mais rapidamente possível com a finalidade de que as gestantes estivessem no mesmo trimestre de gestação.

Comparando as concentrações de citocinas entre as Fases I e II é possível observar valores (intervalo interquartil) maiores na Fase I para MCP-1 779,00 (436,01 – 956,06) vs 373,32 (277,00 – 403,45) pg/mL, TNF- $\alpha$  35,90 (22,30 – 52,61) vs 17,01 (13,30 – 21,42) pg/mL, IFN- $\gamma$  5,68 (3,80 – 8,38) vs 0,92 (0,73 – 1,91) pg/mL e IL-6 20,40 (5,81 – 73,5) vs 0,21 (0,11 – 23,7) pg/mL, assim tendo valores de 2-100 vezes maiores que na Fase II. Já em relação a proteína C reativa (PCR), a Fase I também apresentou valores maiores (18,70 (12,21 – 43,82) vs 1,69 (1,09 – 3,32) mg/dL), sendo até 10 vezes maiores que a Fase II.

O estudo é a primeira descrição do perfil de citocinas relacionadas a pielonefrite aguda em gestantes, visto que outros estudos foram conduzidos em mulheres não gestantes diagnosticadas com pielonefrite aguda, sendo que esses estudos demonstram concentrações de algumas citocinas avaliadas no estudo semelhantes ou maiores (HEDGES et al., 1992; JACOBSON et al., 1994; HORCAJADA et al., 2004).

Um estudo em hepatócito humano analisou os efeitos da IL-6 e TNF-  $\alpha$  na expressão de DMET (*Drug Metabolism Enzymes and Transporters*). O estudo realizou o tratamento com 100 a 10.000 pg/mL de IL-6 e TNF-  $\alpha$  (LE VEE et al., 2009), sendo que as maiores concentrações observadas nesse estudo estão nessa faixa de concentração. Após exposição de 48h de ambos resultou na redução da expressão de RNA mensageiro (mRNA) de vários transportadores *Na<sup>+</sup>-taurocholate cotransporting polypeptide* (NTCP), *Organic anion transporting polypeptide* (OATP)2B1, OATP1B1, OATP1B3, *organic cation transportes* (OCT) 1 e OAT 2 (LE VEE et al., 2009). Além disso, a exposição a IL-6 também resultou na redução de mRNA de os *multidrug resistance mutation* (MDR)1, *multidrug resistance-associated protein* (MRP) 2, MRP4 e *breast cancer resistance protein* (BCRP) (LE VEE et al., 2009). Ademais, este tratamento também reduziu a atividade dos transportadores NTCP, OATP2B1, OATP1B1, OATP1B3 e OCT1 empregando fármacos marcadores de atividade

para estudos *in vitro* (LE VEE et al., 2009). Entretanto, um outro estudo com hepatócitos humanos observou a redução de mRNA de BCRP, MRP3 e OATPs quando foram tratados com IL-1 $\beta$  na concentração de 1.000 pg/mL por 24 h (LE VEE et al., 2007).

As participantes gestantes diagnosticadas com pielonefrite apresentam menores valores medianos (intervalo interquartil) durante a Fase I em comparação com a Fase II no no CL<sub>R</sub> (4,08 vs 7,85 L/h), CL<sub>SEC</sub> (3,95 vs 7,70 L/h) e CL<sub>M</sub> (0,80 vs 2,47 L/h). Desta forma, os resultados sugerem que a inflamação avaliada pela pielonefrite aguda, reduziu a atividade *in vivo* dos OAT 1 e 3 em aproximadamente 50%.

Um estudo em modelos de lesão renal de ratos por isquemia e reperfusão demonstra a diminuição de atividade ou expressão dos OAT 1 e 3, os autores descartam a inflamação como mecanismo de regulação de seu modelo (SCHNEIDER et al., 2015). Porém outros estudos clínicos reforçam a hipótese de a inflamação estar envolvida na regulação da atividade de transportadores de fármacos. Um estudo que investigou a atividade do OATP1B1 em mulheres portadoras de lúpus eritematoso sistêmico empregando atorvastatina observou concentrações maiores de citocinas IL-10, MCP-1 e TNF- $\alpha$  nas pacientes com a doença autoimune não controlada quando comparadas com as participantes saudáveis (CESTARI et al., 2020). Já um outro estudo que investigou a atividade do OATP1B1 em pacientes com artrite reumatoide em tratamento empregando a fluvastatina como probe observou concentrações maiores de citocinas IL-6, IL-8, IL-10, MCP-1 e TNF-  $\alpha$  nas pacientes com a doença autoimune quando comparadas a indivíduos saudáveis (CARIS et al., 2020). Ambos os estudos, observaram a diminuição do CL/F e Vd/F nos grupos inflamados e os autores atribuíram essa diminuição à redução da atividade de influxo do OATP1B1.

## 6. CONCLUSÃO

1. Os métodos desenvolvidos de determinação de FUR e seu metabólito FUR-GLI em matrizes biológicas (plasma, ultrafiltrado de plasma e urina) empregando HPLC-MS/MS apresentaram parâmetros de validação dentro dos limites estabelecidos pela Resolução ANVISA RDC n° 27 de 17 de maio de 2012, assim apresentam sensibilidade e limites de confiança adequados para estudos de farmacocinética, possibilitando a quantificação de FUR e FUR-GLI após a administração de dose oral única de 40 mg em até 24 h.
2. As participantes gestantes no terceiro trimestre apresentaram maiores valores de  $CL/F$  e  $CL_{NR}$  da FUR quando comparadas com participantes não gestantes. Além disso, não mostraram diferenças nos valores de  $CL_R$  (7,85 vs 6,09 L/h),  $CL_{SEC}$  (7,70 vs 6,05 L/h) e  $CL_M$  (2,47 vs 2,92 L/h), sugerindo que a eliminação renal da FUR não foi alterada pela gravidez, e portanto, a atividade de influxo dos OAT 1 e 3 não estão alteradas durante o terceiro trimestre da gestação. Porém, sugere que outra via de eliminação e/ou absorção pode estar alterada, visto que apresenta um aumento de aproximadamente de 50% no  $CL/F$  e 40% no  $CL_{NR}$ .
3. As participantes gestantes diagnosticadas com pielonefrite apresentaram menores valores medianos durante a Fase I em comparação com a Fase II no  $CL_R$  4,08 vs 7,85 L/h,  $CL_{SEC}$  3,95 vs 7,70 L/h e  $CL_M$  0,80 vs 2,47 L/h, sugerindo que a inflamação avaliada pela pielonefrite aguda, reduziu a atividade in vivo dos OAT 1 e 3 em aproximadamente 50%.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-HAMID, M.E. High-performance liquid chromatography–mass spectrometric analysis of furosemide in plasma and its use in pharmacokinetic studies. *Il Farmaco*, vol. 55, n. 6-7, p. 448-454, 2000.

ABDULJALIL K. *et al.* Prediction of maternal and fetoplacental concentrations of cefazolin, cefuroxime, and amoxicillin during pregnancy using bottom-up physiologically based pharmacokinetic models. *Drug Metabolism and Disposition*, v. 50, n. 4, p. 386-400, 2022.

ABOU-AUDA, H.S. *et al.* High-performance liquid chromatographic determination of furosemide in plasma and urine and its use in bioavailability studies. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, vol. 710, n. 1-2, p. 121-128, 1998.

AITKEN, A.E.; RICHARDSON, T.A.; MORGAN, E.T. Regulation of drug-metabolizing enzymes and transporters in inflammation. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, vol. 46, no. 1, p. 123-149, Feb. 2006.

ANDERSON G.D. Pregnancy-Induced changes in pharmacokinetics. *Clinical Pharmacokinetics*, v. 44, n. 10, p. 989-1008, 2005.

ANDERSON, P.O.; MOMPHER, J.D. Clinical lactation studies and the role of pharmacokinetic modeling and simulation in predicting drug exposures in breastfed infants. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*, vol. 47, no. 4, p. 295-304, 2020.

ANDREW, M. A. *et al.* Amoxicillin pharmacokinetics in pregnant women: modeling and simulations of dosage strategies. *Clinical Pharmacology e Therapeutics*, v. 81, n. 4, p. 547-556, 2007.

BARANOWSKA, I.; WILCZEK, A.; BARANOWSKI, J. Rapid UHPLC method for simultaneous determination of vancomycin, terbinafine, spironolactone, furosemide and their metabolites: application to human plasma and urine. *Analytical Sciences*, vol. 26, n. 7, p. 755-759, 2010.

BENET, L.Z.; HOENER, B. Changes in plasma protein binding have little clinical relevance. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, v. 71, n. 3, p. 115-121, 2002.

BOCCI, G.; OPREA, T.I.; BENET, L.Z. State of the art and uses for the biopharmaceutics drug disposition classification system (BDDCS): new additions, revisions, and citation references. *The AAPS Journal*, v. 24, n. 2, 2022.

BOLES PONTO, L.L.; SCHOENWALD, R.D. Furosemide (frusemide). *Clinical Pharmacokinetics*, vol. 18, n. 5, p. 381-408, 1990.

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

CESTARI, R.N. *et al.* Systemic lupus erythematosus activity affects the sinusoidal uptake transporter OATP1B1 evaluated by the pharmacokinetics of atorvastatin. *Clinical and Translational Science*, vol. 13, no. 6, p. 1227-1235, 2020.

CHAPA, R. *et al.* Contribution of uptake and efflux transporters to oral pharmacokinetics of furosemide. *ACS Omega*, vol. 5, n. 51, p. 32939-32950, 2020.

COLOMBO, A.C.; RODRIGUES, M.L. Fungal colonization of the brain: anatomopathological aspects of neurological cryptococcosis. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, vol. 87, p. 1293-1309, 2015.

CRESSMAN, A.M.; PETROVIC, V.; PIQUETTE-MILLER, M. Inflammation-mediated changes in drug transporter expression/activity: implications for therapeutic drug response. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, vol. 5, no. 1, p. 69-89, 2012.

CONSTANTINE M.M. Physiologic and pharmacokinetic changes in pregnancy. *Frontiers in Pharmacology*, v. 5, p. 65, 2014.

DEVENTER, K.; DELBEKE, F. T.; VAN EENOO, P. Screening for 18 diuretics and probenecid in doping analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*, vol. 16, n. 8, p. 529-535, 2002.

DEVENTER, K.; VAN EENOO, P.; DELBEKE, F. T. Simultaneous determination of beta-blocking agents and diuretics in doping analysis by liquid chromatography/mass spectrometry with scan-to-scan polarity switching. *Rapid Communications in Mass*

*Spectrometry: An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up-to-the-Minute Research in Mass Spectrometry*, v. 19, n. 2, p. 90-98, 2005.

DUARTE, G. *et al.* Infecção urinária na gravidez. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, vol. 30, no. 2, 2008.

EKE A. C. *et al.* Optimizing pharmacology studies in pregnant and lactating women using lessons from HIV: a consensus statement. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, v. 110, n. 1, p. 36-48, 2021.

EL-SAHARTY, Y. S. Simultaneous high-performance liquid chromatographic assay of furosemide and propranolol HCL and its application in a pharmacokinetic study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 33, n. 4, p. 699-709, 2003.

EVERS, R. *et al.* Disease-Associated changes in drug transporters may impact the pharmacokinetics and/or toxicity of drugs: a white paper from the international transporter consortium. *Clinical Pharmacology e Therapeutics*, vol. 104, no. 5, p. 900-915, 2018.

FARDEL, O.; LE VÉE, M. Regulation of human hepatic drug transporter expression by pro-inflammatory cytokines. *Expert Opinion on Drug Metabolism e Toxicology*, vol. 5, no. 12, p. 1469-1481, 2009.

FDA, Food and Drug Administration. Drug Development and Drug Interactions: Table of Substrates, Inhibitors and Inducers. Disponível em: <https://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/DevelopmentResources/DrugInteractionsLabeling/ucm093664.htm> Acesso em: 28 set 2022.

GONÇALVES, P.V.B. *et al.* A pilot study of the maternal-fetal pharmacokinetics of furosemide in plasma, urine, and amniotic fluid of hypertensive parturient women under cesarean section. *The Journal of Clinical Pharmacology*, vol. 60, n. 12, p. 1655-1661, 2020.

HEDGES, S. *et al.* Comparison of urine and serum concentrations of interleukin-6 in women with acute pyelonephritis or asymptomatic bacteriuria. *Journal of Infectious Diseases*, vol. 166, no. 3, p. 653-656, 1992.

HORCAJADA, J.P. *et al.* Evaluation of inflammatory and renal-injury markers in women treated with antibiotics for acute pyelonephritis caused by escherichia coli. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, vol. 11, no. 1, p. 142-146, 2004.

HUANG, X. *et al.* Everything we always wanted to know about furosemide but were afraid to ask. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, v. 310, n. 10, p. F958-F971, 2016.

HUO X, LIU, K. Renal organic anion transporters in drug–drug interactions and diseases. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 112, p. 8-19, 2018.

JACOBSON, S.H. *et al.* Interleukin-6 and Interleukin-8 in serum and urine in patients with acute pyelonephritis in relation to bacterial-virulence-associated traits and renal function. *Nephron*, vol. 67, no. 2, p. 172-179, 1994.

JIM, B.; GAROVIC, V.D. Acute kidney injury in pregnancy. *Seminars in Nephrology*, vol. 37, no. 4, p. 378-385, 2017.

KAZMA J.M. *et al.* Anatomical and physiological alterations of pregnancy. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*, v. 47, n. 4, p. 271-285, 2020.

KERDPIN, O. *et al.* In vitro characterisation of human renal and hepatic frusemide glucuronidation and identification of the UDP-glucuronosyltransferase enzymes involved in this pathway. *Biochemical Pharmacology*, vol. 76, n. 2, p. 249-257, 2008.

LANCHOTE, V.L. *et al.* Impact of visceral leishmaniasis and curative chemotherapy on cytochrome P450 activity in Brazilian patients. *British Journal of Clinical Pharmacology*, vol. 80, no. 5, p. 1160-1168, 2015.

LINDSTRÖM, B.; MOLANDER, M. Gas chromatographic determination of furosemide in plasma using an extractive alkylation technique and an electron capture detector. *Journal of Chromatography A*, v. 101, n. 1, p. 219-221, 1974.

LE VEE, M. *et al.* Down-Regulation of Organic Anion Transporter Expression in Human Hepatocytes Exposed to the Proinflammatory Cytokine Interleukin 1 $\beta$ . *Drug Metabolism and Disposition*, vol. 36, no. 2, p. 217-222, 2007.

LE VEE, M. *et al.* Regulation of drug transporter expression in human hepatocytes exposed to the proinflammatory cytokines tumor necrosis factor- $\alpha$  or interleukin-6. *Drug metabolism and disposition*, v. 37, n. 3, p. 685-693, 2009.

LIPTROTT, N.J.; OWEN, A. The role of cytokines in the regulation of drug disposition: extended functional pleiotropism? *Expert Opinion on Drug Metabolism e Toxicology*, vol. 7, no. 3, p. 341-352, 2011.

MARGALHO, C. *et al.* Determination of furosemide in whole blood using SPE and GC-EI-MS. *Journal of Analytical Toxicology*, vol. 29, n. 5, p. 309-313, 2005.

MATTISON, Donald; HALBERT, Lee-Ann. Clinical pharmacology during pregnancy. *Academic Press*, 2013. Disponível em: <https://docplayer.net/87723972-Clinical-pharmacology-during-pregnancy.html>. Acesso em: 26 jul. 2023.

MIZUMA T. *et al.* Photoinduced covalent binding of frusemide and frusemide glucuronide to human serum albumin. *British Journal of Clinical Pharmacology*, v. 48, n. 1, p. 79-87, 1999.

MILLS, C.D. *et al.* Quantification of furosemide from serum and tissues using high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, vol. 701, n. 1, p. 65-70, 1997.

MORGAN, Et. Impact of infectious and inflammatory disease on cytochrome p450-mediated drug metabolism and pharmacokinetics. *Clinical Pharmacology e Therapeutics*, vol. 85, no. 4, p. 434-438, 2009.

NAGUIB, I.A. *et al.* Development and validation of HPTLC and green HPLC methods for determination of furosemide, spironolactone and canrenone, in pure forms, tablets and spiked human plasma. *Biomedical Chromatography*, vol. 32, n. 10, p. e4304, 2018.

PARVE M.M. *et al.* Inhibitory interaction potential of 22 antituberculosis drugs on organic anion and cation transporters of the SLC22A family. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 60, n. 11, p. 6558-6567, 2016.

PENG, J.; LADUMOR, M. K.; UNADKAT, J.D. Prediction of pregnancy-induced changes in secretory and total renal clearance of drugs transported by organic anion transporters. *Drug Metabolism and Disposition*, v. 49, n. 10, p. 929-937, 2021.

QUINNEY S.K., BONATE P. L. A pharmacometrician's role in enhancing medication use in pregnancy and lactation. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*, v. 47, n. 4, p. 267-269, 2020.

RIVA, E. et al. Pharmacokinetics of furosemide in gestosis of pregnancy. *European Journal of Clinical Pharmacology*, vol. 14, no. 5, p. 361-366, 1978.

ROWLAND M, TOZER, T. *Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics: concepts and applications*. 4ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott William & Wilkins, 2011.

SALEH, P. et al. Acute pyelonephritis in pregnancy and the outcomes in pregnant patients. *Archives of Clinical Infectious Diseases*, vol. 10, no. 3, 2015.

SCHNEIDER, R. et al. Oat1/3 restoration protects against renal damage after ischemic AKI. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, vol. 308, no. 3, p. F198-F208, 2015.

SEIFERT, S.M. et al. Inflammation and pharmacokinetics: potential implications for HIV-infection. *Expert Opinion on Drug Metabolism e Toxicology*, vol. 13, no. 6, p. 641-650, 2017.

SHEN, H. et al. Evidence for the validity of pyridoxic acid (PDA) as a plasma-based endogenous probe for OAT1 and OAT3 function in healthy subjects. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 368, no. 1, p. 136-145, 2019.

SIMONSEN, K. W. et al. Screening and quantitative determination of twelve acidic and neutral pharmaceuticals in whole blood by liquid-liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*, vol. 34, n. 7, p. 367-373, 2010.

SNEDDEN, W.; SHARMA, J. N.; FERNANDEZ, P.G. A sensitive assay method of furosemide in plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *Therapeutic Drug Monitoring*, vol. 4, n. 4, p. 381-384, 1982.

SORA, D.I. et al. Analytical issues in HPLC/MS/MS simultaneous assay of furosemide, spironolactone and canrenone in human plasma samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 52, n. 5, p. 734-740, 2010.

STOPFER, P. *et al.* Pharmacokinetic Evaluation of a Drug Transporter Cocktail Consisting of Digoxin, Furosemide, Metformin, and Rosuvastatin. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, v. 100, n. 3, p. 259–267, 2016.

TASNIF Y., MORADO J., HEBERT MF. Pregnancy-related pharmacokinetic changes. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, v. 100, n. 1, p. 53-62, 2016.

THIEME, D. *et al.* Screening, confirmation and quantitation of diuretics in urine for doping control analysis by high-performance liquid chromatography–atmospheric pressure ionisation tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, vol. 757, n. 1, p. 49-57, 2001.

VEDAR, C. *et al.* Development, validation, and implementation of an UHPLC–MS/MS method for the quantitation of furosemide in infant urine samples. *Biomedical Chromatography*, vol. 36, n. 3, 28 2021.

VREE, T. B.; VAN DEN BIGGELAAR-MARTEA, M.; VERWEY-VAN WISSEN, C. P. W. G. M. Determination of furosemide with its acyl glucuronide in human plasma and urine by means of direct gradient high-performance liquid chromatographic analysis with fluorescence detection Preliminary pharmacokinetics and effect of probenecid. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, vol. 655, n. 1, p. 53-62, 1994.

WRIGHT, T. M. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Frontiers in Bioscience*, vol. 2, no. 4, p. d12-26, 1997.

# ANEXOS

## ANEXO A - Parecer de aprovação do CEP/FCFRP – USP



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



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Impacto da pielonefrite na atividade dos transportadores de ânions orgânicos (OAT) 1 e 3 em gestantes: uma abordagem quantitativa da farmacologia dos sistemas

**Pesquisador:** Jhohann Richard de Lima Benzi

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 06827219.5.0000.5403

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

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.416.986

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma proposta nova de um estudo clínico com mulheres gestantes com pielonefrite, o qual compõe do projeto de doutorado do pós-graduando com formação em Farmácia. A etapa clínica do projeto de pesquisa será desenvolvida no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, tendo esta instituição como coparceira do estudo; e a etapa analítica será realizada no Laboratório de Farmacocinética Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. A pesquisa consta da investigação da influência da pielonefrite, infecção bacteriana com importante componente inflamatório, na farmacocinética da furosemida (FUR), fármaco modelo para estudo da atividade dos transportadores de ânions orgânicos OAT 1 e 3. A investigação do papel dos OAT 1 e 3 na terapia farmacológica, bem como fatores que influenciam suas atividades e/ou expressão, tem sido recomendada devido à sua importante contribuição na excreção renal de fármacos. Na primeira fase do estudo, as gestantes (n = 10) com pielonefrite com indicação de tratamento com cefuroxima (CER), receberão CER endovenosa (ev) 750 mg/8/8h. Após a infusão inicial da CER, as gestantes receberão dose única oral de FUR 40 mg. Após o tratamento com a CER ev e ao apresentar melhora do quadro infeccioso as gestantes receberão alta hospitalar, conforme protocolo do hospital local e continuarão o tratamento com CER oral 250 mg/8/8h de 10-14 dias. Na segunda fase do estudo, as gestantes ainda durante o tratamento com CER oral, receberão

**Endereço:** Avenida do Café s/nº

**Bairro:** Monte Alegre

**CEP:** 14.040-903

**UF:** SP

**Município:** RIBEIRAO PRETO

**Telefone:** (16)3315-4213

**Fax:** (16)3315-4892

**E-mail:** cep@fcrp.usp.br



Continuação do Parecer: 3.416.986

dose única oral de FUR 40 mg. Adicionalmente, será investigada a atividade dos OAT 1 e 3, bem como os biomarcadores endógenos (BE) taurina e 6-hidrocortisol, em gestantes saudáveis. Na primeira fase do estudo, gestantes saudáveis (n = 10) receberão dose única oral de FUR 40 mg. Após período de wash-out (7 dias), as gestantes receberão dose única de probenecida 750 mg (inibidor de OAT renais) e após 2h, dose única oral de FUR 40 mg. Nos dois protocolos, amostras seriadas de sangue e urina serão colhidas até 24h após administração da FUR. As concentrações dos fármacos FUR e CER e dos BE taurina e 6-hidrocortisol serão determinadas nas amostras biológicas por LC-MS/MS. Na segunda etapa do trabalho, será investigada a participação dos OAT 1 e 3, bem como a influência de citocinas pro-inflamatórias, no transporte da CER in vitro. Os dados obtidos serão incorporados a modelos PBPK, com o objetivo que se possa prever concentrações plasmáticas de outros substratos de OAT 1 e 3 em gestantes, com propriedades físico-químicas semelhantes às da CER. Os custos para o desenvolvimento deste projeto serão subsidiados por dois projetos com fomento.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário:

Avaliar a influência da pielonefrite na atividade dos transportadores OAT 1 e 3 em estudos in vitro, in silico (modelos PBPK) e clínico durante o segundo e terceiro trimestres da gestação, empregando furosemida como fármaco marcador e taurina e 6-hidrocortisol como biomarcadores endógenos.

Objetivos Secundários:

- Desenvolver e validar método de determinação de furosemida e cefuroxima em plasma e urina humana, empregando cromatografia líquida de ultra eficiência com detecção por espectrometria de massas (UPLC-MS/MS).
- Desenvolver e validar método de determinação dos biomarcadores endógenos taurina e 6-hidrocortisol em plasma e urina, empregando UPLC-MS/MS.
- Avaliar as concentrações plasmáticas das citocinas INF-, TNF-, IL-6, IL-8 e da proteína C reativa nas gestantes com diagnóstico de pielonefrite antes e após o tratamento com cefuroxima.
- Avaliar a atividade dos OAT 1 e 3 em gestantes com pielonefrite e gestantes saudáveis empregando a furosemida como fármaco marcador.
- Validar os biomarcadores endógenos taurina e 6-hidrocortisol como marcadores de atividade de OAT 1 e 3, respectivamente, com a utilização do inibidor probenecida em gestantes saudáveis.

**Endereço:** Avenida do Café s/nº

**Bairro:** Monte Alegre

**CEP:** 14.040-903

**UF:** SP

**Município:** RIBEIRAO PRETO

**Telefone:** (16)3315-4213

**Fax:** (16)3315-4892

**E-mail:** cep@fcfrp.usp.br



Continuação do Parecer: 3.416.986

- Descrever a popPK da cefuroxima em gestantes com pielonefrite.
- Desenvolver estudos in vitro para caracterização da participação de OAT e avaliação da influência de interleucinas inflamatórias no transporte tubular da cefuroxima.
- Desenvolver estudos in silico empregando modelos PBPK com incorporação dos estudos in vitro com transportadores.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os riscos são mencionados por meio de inconvenientes da pesquisa. E são: - a picada da agulha para coleta de sangue (na qual será realizada apenas uma vez para inserção de torneira multi-vias); - a necessidade de internação na Unidade de Pesquisa Clínica em um dia para as pacientes no final do tratamento para pielonefrite e em dois dias diferentes para pacientes saudáveis; - A administração de furosemida (40 mg) em dose única, em gestantes com pielonefrite, no início e no final do tratamento com cefuroxima e administração de furosemida e probenecida (750 mg), em doses únicas, em gestantes saudáveis. Estes medicamentos não fazem parte do tratamento, e serão utilizados para o estudo da atividade e inibição dos OATs renais. Ambos os medicamentos são utilizados em gestantes na clínica de forma segura (GUTMAN et al., 2012; VIGIL-DE GRACIA; DOMINGUEZ; SOLIS, 2014; 2014; HORTABAAS et al., 2017; COMUNIÁN-CARRASCO, PEÑA-MARTÍ & MARTÍ-CARVAJAL, 2018). Ademais, os principais efeitos adversos da furosemida (hipotensão, vertigem e aumento no volume urinário) e da probenecida (vertigem, náusea e vômito) são mais comumente observados em administrações múltiplas, diferentemente do proposto pelo estudo.

Quanto aos benefícios foi descrito que não haverá qualquer benefício direto aos pacientes estudados. Entretanto, a participação fomentará o conhecimento sobre o impacto de doenças infecciosas durante a gestação, utilizando o medicamento furosemida como fármaco modelo. Não haverá qualquer benefício financeiro pela participação na pesquisa.

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se da apresentação da segunda versão do projeto para apreciação ética. A pesquisa tem relevância clínica para a área da saúde. O projeto tem fundamentação teórica e desenho metodológico adequado para o alcance dos objetivos. Do ponto de vista ético, atende as recomendações para desenvolvimento de pesquisa com seres humanos e os pesquisadores apresentam, nesta segunda versão, as respostas às pendências apontadas na primeira análise.

#### **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

**Endereço:** Avenida do Café s/nº  
**Bairro:** Monte Alegre **CEP:** 14.040-903  
**UF:** SP **Município:** RIBEIRAO PRETO  
**Telefone:** (16)3315-4213 **Fax:** (16)3315-4892 **E-mail:** cep@fcrp.usp.br



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



Continuação do Parecer: 3.416.986

Os pesquisadores apresentaram na primeira versão em janeiro/2019: 1) declaração de autorização de infraestrutura necessária para realização da pesquisa do Departamento de Análises Clínicas Toxicológicas e Bromatológicas da FCFRP-USP. 2) Declaração de Ciência e Compromisso Ético do pesquisador médico, integrante da equipe. 3) Declaração de Ciência e Compromisso Ético dos demais pesquisadores integrantes da equipe. 4) TCLE das gestantes saudáveis e TCLE das gestantes com pielonefrite 5) Folha de Rosto. 6) Projeto de pesquisa. 7) Informações do projeto inseridos na Plataforma Brasil. 8) Orçamento detalhado. 9) Autorização para acesso ao prontuário do paciente do HCRP - Serviço de arquivo médico. 10) Ofício de encaminhamento do projeto para análise pelo Comitê do HCFMRP-USP em impresso da Unidade de Pesquisa Clínica da referida instituição. 11) Ofício do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da FMRP-USP, concordando com a realização da pesquisa.

Os pesquisadores apresentaram na segunda versão em maio/2019: 1) Carta resposta ao CEP. 2) Projeto detalhado modificado. 3) TCLE das gestantes saudáveis e TCLE das gestantes com pielonefrite modificados. 4) informações básicas do projeto.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O projeto tem relevância, está estruturado e os apontamentos feitos na primeira análise ética foram atendidos e estão descritos na íntegra na carta resposta do pesquisador:

- identificar os “outros estados de doenças” e todos os “fármacos que interagem com a furosemida, cefuroxima” e probenecida (incluir este último, pois não consta no projeto), bem como os “fármacos inibidores/indutores de OAT 1 e/ou 3”, citados nos critérios de exclusão do protocolo clínico na seleção das gestantes. Atendido

-identificar os pesquisadores responsáveis pela coleta de dados com as gestantes. Atendido

-inserir os riscos e benefícios da pesquisa no projeto, pois consta somente na plataforma. Atendido

-apresentar declaração de atendimento do médico membro da equipe de pesquisa, em caso de intercorrências no protocolo. Atendido

**Endereço:** Avenida do Café s/nº  
**Bairro:** Monte Alegre **CEP:** 14.040-903  
**UF:** SP **Município:** RIBEIRAO PRETO  
**Telefone:** (16)3315-4213 **Fax:** (16)3315-4892 **E-mail:** cep@fcrp.usp.br



Continuação do Parecer: 3.416.986

- fazer uma análise cuidadosa do uso de outros medicamentos, por conta de interações medicamentosas.

Atendido

- prever os riscos do uso da furosemida em pacientes com pré-eclâmpsia e perfusão placentária baixa.

Atendido

-rever e adequar o TCLE conforme as indicações a seguir:

TCLE das gestantes com pielonefrite Atendido

1 – inserir de forma clara os riscos e os benefícios da pesquisa.

2 - inserir informações de endereço e horários de funcionamento do CEP em questão.

3 – É necessário descrever quais são os riscos conhecidos para a mulher e para o feto, e as contraindicações do uso da Furosemida na gravidez.

TCLE das gestantes saudáveis Atendido

1 – inserir de forma clara os riscos e os benefícios da pesquisa.

2 - inserir informações de endereço e horários de funcionamento do CEP em questão.

3 – É necessário descrever quais são os riscos conhecidos para a mulher e para o feto, e as contraindicações do uso da Furosemida e da Probenecida na gravidez.

Protocolo aprovado.

#### **Considerações Finais a critério do CEP:**

Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP/USP) em sua 188ª reunião ordinária. Em atendimento às Resoluções vigentes, deverá ser encaminhado ao CEP/FCFRP, através da Plataforma Brasil, o relatório final da pesquisa conforme modelo de Relatório aprovado pelo CEP, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção da mesma. Informamos que, de acordo com a Resolução 466/12, item IV.5, letra d, o TCLE deve “ser elaborado em duas vias, rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela (s) pessoa (s) por ele delegada (s), devendo as páginas de assinaturas estar na mesma folha”. O TCLE deve ser apresentado ao participante da pesquisa em documento impresso frente e verso e as assinaturas não devem ficar em folhas separadas do texto do TCLE. Cabe ao pesquisador responsável manter

**Endereço:** Avenida do Café s/nº

**Bairro:** Monte Alegre

**CEP:** 14.040-903

**UF:** SP

**Município:** RIBEIRAO PRETO

**Telefone:** (16)3315-4213

**Fax:** (16)3315-4892

**E-mail:** cep@fcfrp.usp.br



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



Continuação do Parecer: 3.416.986

os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1278345.pdf	20/05/2019 19:18:09		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_JRLB_versao_2.pdf	20/05/2019 19:17:56	Jhohann Richard de Lima Benzi	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Carta_resposta_JRLB.pdf	20/05/2019 19:16:46	Jhohann Richard de Lima Benzi	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	JRLB_TCLE_pielonefrite_saudaveis_Versao_2.pdf	20/05/2019 19:16:35	Jhohann Richard de Lima Benzi	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	JRLB_TCLE_pielonefrite_doentes_Versao_2.pdf	20/05/2019 19:15:36	Jhohann Richard de Lima Benzi	Aceito
Outros	SAMEJRLB.pdf	16/01/2019 11:45:50	Jhohann Richard de Lima Benzi	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	autorizacaodainfraestrutura.pdf	11/01/2019 16:38:04	Jhohann Richard de Lima Benzi	Aceito
Outros	UPC.pdf	11/01/2019 16:35:02	Jhohann Richard de Lima Benzi	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacaodepartamento.pdf	11/01/2019 16:30:27	Jhohann Richard de Lima Benzi	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termoderesponsabilidade2.pdf	11/01/2019 16:24:02	Jhohann Richard de Lima Benzi	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termoderesponsabilidade.pdf	11/01/2019 16:23:51	Jhohann Richard de Lima Benzi	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	11/01/2019 16:23:11	Jhohann Richard de Lima Benzi	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto.pdf	11/01/2019 16:22:57	Jhohann Richard de Lima Benzi	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Endereço:** Avenida do Café s/n°  
**Bairro:** Monte Alegre **CEP:** 14.040-903  
**UF:** SP **Município:** RIBEIRAO PRETO  
**Telefone:** (16)3315-4213 **Fax:** (16)3315-4892 **E-mail:** cep@fcfrp.usp.br



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



Continuação do Parecer: 3.416.986

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

RIBEIRAO PRETO, 26 de Junho de 2019

---

**Assinado por:**

**Cleni Mara Marzocchi Machado  
(Coordenador(a))**

**Endereço:** Avenida do Café s/nº

**Bairro:** Monte Alegre

**CEP:** 14.040-903

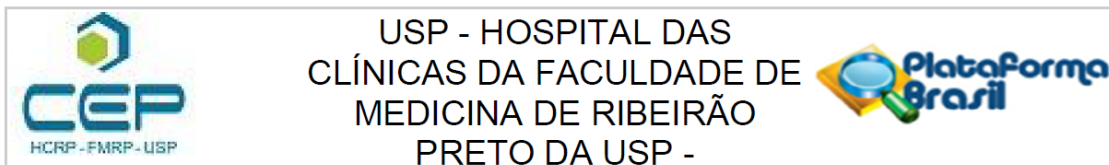
**UF:** SP **Município:** RIBEIRAO PRETO

**Telefone:** (16)3315-4213

**Fax:** (16)3315-4892

**E-mail:** cep@fcfrp.usp.br

## ANEXO B - Parecer de aprovação do CEP/HCFMRP – USP



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Impacto da pielonefrite na atividade dos transportadores de ânions orgânicos (OAT) 1 e 3 em gestantes: uma abordagem quantitativa da farmacologia dos sistemas

**Pesquisador:** Jhohann Richard de Lima Benzi

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 06827219.5.3001.5440

**Instituição Proponente:** Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP -

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.454.432

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de pesquisa da instituição proponente UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO. O HCFMRP\_USP será uma coparticipante da pesquisa.

#### Objetivo da Pesquisa:

De acordo com o parecer da instituição proponente.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

De acordo com o parecer da instituição proponente.

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

De acordo com o parecer da instituição proponente.

#### Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória foram anexados na Plataforma Brasil e estão de acordo com as normas éticas vigentes. Apresentou carta de anuência do responsável pelo local de coleta no HCFMRP-USP.

#### Recomendações:

Não há.

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  
PRETO DA USP -



Continuação do Parecer: 3.454.432

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O CEP tomou ciência e concorda com o parecer da instituição proponente, e aprova o HCFMRP-USP como coparticipante da pesquisa.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

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

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_JRLB_versao_2.pdf	20/05/2019 19:17:56	Jhohann Richard de Lima Benzi	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	JRLB_TCLE_pielonefrite_saudaveis_Versao_2.pdf	20/05/2019 19:16:35	Jhohann Richard de Lima Benzi	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	JRLB_TCLE_pielonefrite_doentes_Versao_2.pdf	20/05/2019 19:15:36	Jhohann Richard de Lima Benzi	Aceito
Outros	SAMEJRLB.pdf	16/01/2019 11:45:50	Jhohann Richard de Lima Benzi	Aceito
Outros	UPC.pdf	11/01/2019 16:35:02	Jhohann Richard de Lima Benzi	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

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  
PRETO DA USP -



Continuação do Parecer: 3.454.432

RIBEIRAO PRETO, 15 de Julho de 2019

---

**Assinado por:**  
**Luis Vicente Garcia**  
**(Coordenador(a))**

**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