



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
Câmpus de Araraquara



**IMPACTO DOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE OCT2 E OCTN1 NA  
DISPOSIÇÃO CINÉTICA DA GABAPENTINA EM PACIENTES  
SUBMETIDOS AO USO CRÔNICO DO FÁRMACO**

MESTRANDA: PRISCILA AKEMI YAMAMOTO

ORIENTADORA: PROFA. DRA. NATÁLIA VALADARES DE MORAES

ARARAQUARA - SP

2015

## RESUMO

A gabapentina (GAB), anticonvulsivante utilizado para o tratamento de epilepsia e dor crônica, possui cinética não linear, não é metabolizada e é eliminada principalmente por excreção renal. Estudos sugerem que a excreção renal da GAB é dependente da secreção ativa via transportador de cátions orgânicos 2 (OCT2) e transportador de cátions orgânicos/ergotioneína 1 (OCTN1). Esses transportadores são expressos na membrana do túbulo proximal dos rins e estão envolvidos na eliminação de compostos endógenos e de vários fármacos. O polimorfismo genético de transportadores de fármacos tem sido estudado para explicar a variabilidade na disposição cinética dos seus substratos. O objetivo do estudo é investigar a influência dos polimorfismos genéticos de OCTN1 e OCT2 e outras possíveis covariáveis na disposição cinética da GAB em pacientes em uso crônico do fármaco. Serão investigados pacientes tratados com GAB atendidos no Hospital Estadual de Américo Brasiliense (HEAB). Amostras de sangue e urina serão coletadas para a análise farmacocinética da GAB, para a análise da creatinina sérica e para a genotipagem. As concentrações plasmáticas de GAB serão avaliadas usando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS). Os parâmetros farmacocinéticos da GAB serão estimados por análise farmacocinética populacional. Os pacientes serão genotipados para os polimorfismos *SLC22A2* c.808G>T e *SLC22A4* c.1507C>T. A partir da análise estatística dos resultados será possível avaliar a contribuição da variabilidade genética e outras variáveis (sexo, idade, clearance de creatinina, índice de massa corpórea) na disposição cinética da GAB.

Palavras-chave: OCT2, OCTN1, gabapentina, farmacogenética, polimorfismo, *SLC22A2*, *SLC22A4*

## ABSTRACT

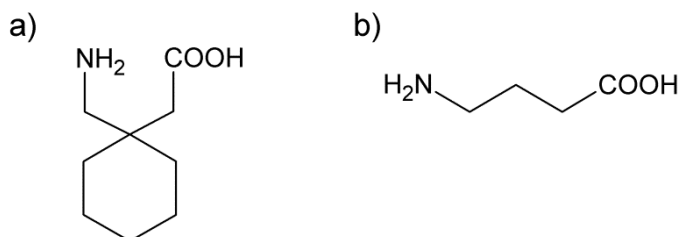
Gabapentin (GAB), an anticonvulsant used for the treatment of epilepsy and chronic pain, has nonlinear kinetics, it is not metabolized and it is mainly eliminated by renal excretion. Studies suggest that the renal excretion of GAB is dependent on active secretion by organic cation transporter 2 (OCT2) and organic cation/ergothioneine transporter 1 (OCTN1). These transporters are expressed at the membrane of the renal proximal tubules and they are involved in the elimination of endogenous compounds and many drugs. The genetic polymorphism of drug transporters has been studied to explain the kinetic disposition variability of their substrates. The aim of this study is to investigate the influence of genetic polymorphisms of OCTN1 and OCT2 and other possible covariates on the kinetic disposition of GAB in patients undergoing GAB chronic treatment. Patients treated with GAB at the Hospital Estadual de Américo Brasiliense (HEAB) will be investigated. Blood and urine samples will be collected to GAB pharmacokinetic analysis, serum creatinine analysis and for genotyping. The plasma concentrations of GAB will be assessed using liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS). The pharmacokinetic parameters of GAB will be estimated by population pharmacokinetics analysis. Patients will be genotyped for the *SLC22A2* c.808G>T and *SLC22A4* c.1507C>T polymorphisms. Based on the statistical analysis of the results it will be possible to evaluate the contribution of the genetic variability and other variates (sex, age, creatinine clearance, body mass index) on the kinetic disposition of GAB.

Keywords: OCT2, OCTN1, gabapentin, pharmacogenetics, polymorphisms, *SLC22A2*, *SLC22A4*

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Gabapentina (GAB)

A gabapentina é um anticonvulsivante indicado como monoterapia ou terapêutica adjuvante no tratamento de crises parciais para pacientes com epilepsia, e também é frequentemente indicado para tratamento de dor neuropática (KRASOWSKI e MCMILLIN, 2014; JOHANNESSEN LANDMARK et al., 2015; NEURONTIN, 2015). Apesar da sua semelhança estrutural com o neurotransmissor GABA (ácido  $\gamma$ -aminobutírico) (Figura 1), a GAB parece não interagir com os receptores GABA<sub>A</sub> ou GABA<sub>B</sub> no cérebro ou na medula espinhal (KRASOWSKI e MCMILLIN, 2014). Seu mecanismo de ação não está completamente elucidado. Estudos mostraram que a GAB se liga a subunidade  $\alpha 2\delta$  (alfa-2-delta) dos canais de cálcio voltagem-dependentes interrompendo a entrada de cálcio, o que leva ao bloqueio da formação de uma nova sinapse (DICKENS et al., 2013; KRASOWSKI e MCMILLIN, 2014). Outros mecanismos de ação, entre eles, efeitos em receptores NMDA, canais de sódio, vias monoaminérgicas e no sistema opióide foram propostos para a GAB (CLIVATTI, SAKATA e ISSY, 2009).



**Figura 1.** Estrutura química da gabapentina (a) e do ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) (b).

Uma vez administrada, a GAB é rapidamente absorvida no trato gastrointestinal ( $T_{\text{máx}}$  2-3 horas) (PATSALOS et al., 2008; KRASOWSKI e MCMILLIN, 2014). Su et al. (1995) e Dickens et al. (2013) mostraram que o transporte de GAB em quatro diferentes tipos celulares

(astrócitos, sinaptossomas, células CHO e células endoteliais do cérebro) foi inibido por *L*-fenilalanina, sugerindo o envolvimento do transportador de aminoácidos do tipo L (LAT) na absorção de GAB (SU et al., 1995; DICKENS et al., 2013). A cinética da GAB é não linear e sua biodisponibilidade é variável (a biodisponibilidade diminui com o aumento da dose), o que está provavelmente relacionado com a sua absorção limitada devido à saturação do transportador LAT (STEWART et al., 1993; PATSALOS et al., 2008; STRIANO et al., 2008). A interação com antiácidos contendo alumínio ou magnésio também pode alterar a absorção de GAB reduzindo-a em até 20% (PATSALOS et al., 2008).

A GAB apresenta meia-vida de aproximadamente 5 a 9 horas, baixa ligação a proteínas plasmáticas ( $V_d$  0,9 L/kg) e não é metabolizada em humanos. Sua eliminação é exclusivamente renal na forma inalterada do fármaco. Em função dessa característica, a GAB pode ser um fármaco alternativo para pacientes com disfunção hepática (JOHANNESSEN et al., 2003; JOHANNESSEN e TOMSON, 2006; PATSALOS et al., 2008; CLIVATTI, SAKATA e ISSY, 2009; KRASOWSKI e MCMILLIN, 2014). O fato da GAB não se ligar a proteínas plasmáticas, não ser metabolizada e não induzir enzimas hepáticas microsossomais, justifica a ausência de interação com outros anticonvulsivantes (NEELS et al., 2004).

O clearance renal da GAB ( $Cl_R$ ) ocorre tanto por filtração glomerular, a qual é avaliada pelo clearance de creatinina ( $Cl_{CR}$ ), quanto por secreção tubular mediada por transportadores (URBAN et al., 2008). A filtração glomerular explica apenas parcialmente a variabilidade no  $Cl_R$  da GAB, pois foi observado por Boyd et al. (1999) uma baixa correlação entre o  $Cl_{CR}$  e o  $Cl_R$  da GAB ( $R^2 = 0,234$ ,  $p = 0,0028$ ) (BOYD et al., 1999). Além disso, em estudos farmacocinéticos o  $Cl_R$  da GAB foi maior que o  $Cl_{CR}$  tanto em crianças como em adultos

(URBAN et al., 2008). Tais resultados sugerem a participação do transporte ativo na excreção renal da GAB.

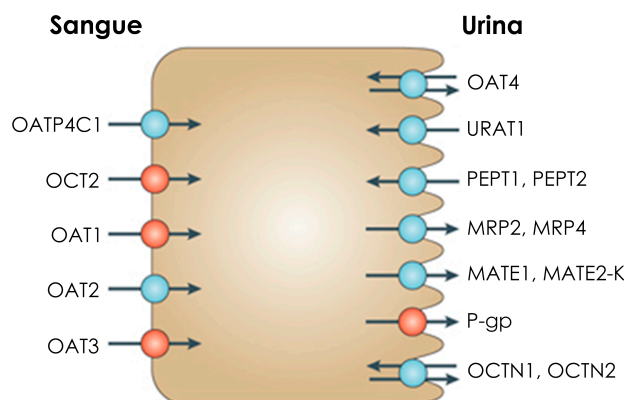
A excreção renal da GAB parece ser dependente dos transportadores de cátions orgânicos OCT2 e OCTN1, os quais são expressos principalmente nos rins. A coadministração de cimetidina, fármaco inibidor de ambos transportadores, reduz o clearance de GAB sugerindo a participação de OCT2 e OCTN1 na excreção renal da GAB (URBAN et al., 2008; LAL et al., 2010).

Estudos clínicos investigaram a dose diária, o sexo e a idade como potenciais covariáveis na razão concentração/dose em pacientes em uso de GAB (ARMIJO et al., 2004; JOHANNESSEN LANDMARK et al., 2015). Não foi observada diferença na razão concentração/dose entre os sexos ( $0,027 \pm 0,03$  em mulheres e  $0,029 \pm 0,03$  em homens). Por outro lado, a razão concentração/dose aumenta com a idade. Pacientes idosos apresentaram uma razão concentração/dose 2 vezes maior que pacientes adultos jovens, o que pode ser explicado pela redução da excreção renal de GAB (ARMIJO et al., 2004; JOHANNESSEN LANDMARK et al., 2015). Sendo assim, os autores sugerem ajustar dose de GAB com base no clearance de creatinina (BLUM et al., 1994; ARMIJO et al., 2004).

## **1.2. Transportador de cations orgânicos 2 (OCT2)**

O transportador de cátions orgânicos 2 (OCT2) é principalmente expresso nos rins e está localizado na membrana basolateral dos túbulos proximais (Figura 2). Ele também pode ser encontrado no intestino delgado, pulmão, placenta, timo, cérebro e ouvido interno (KOEPSELL, 2013). Sua função é mediar a excreção renal de cátions orgânicos e a reabsorção de algumas substâncias endógenas (KOEPSELL, 2013; LAI, 2013). Dentre seus substratos

serotonina, histamina, colina; e fármacos (amantadina, fenformina, cisplatina, cimetidina, ranitidina, metformina, gabapentina e cetirizina) (FUJITA et al., 2006; LAL et al., 2010; KOEPESELL, 2013). O OCT2 é considerado o principal transportador para captação de vários xenobióticos catiônicos da corrente sanguínea para as células do epitélio dos rins (LEABMAN et al., 2002). Portanto, sua inibição pode acarretar em um acúmulo de seus substratos aumentando a concentração plasmática e o risco de efeitos adversos. São inibidores da atividade de OCT2 a desipramina, cimetidina, imipramina, grepafloxacino, mepiperfenidol, *O*-metilisopralina, *N*-1-metilnicotinamida, nicotina, fenioxibenzamina, procainamida, quinidina, trimetoprim, verapamil (FUJITA et al., 2006).



**Figura 2.** Transportadores presentes nos túbulos proximais dos rins (adaptado de (INTERNATIONAL TRANSPORTER CONSORTIUM, 2010). OATP: polipeptídio transportador de ânions orgânicos (OATP4C1); OCT: transportador de cátions orgânicos (OCT2); OAT: transportadores de ânions orgânicos (OAT1, 2, 3); URAT: transportador de urato (URAT1); PEPT: transportadores de peptídeos (PEPT1, 2); MRP: proteínas associadas a resistência a múltiplos fármacos (MRP2, 4); MATE: transportadores de extrusão de múltiplos fármacos e toxinas (MATE1, 2-K); P-gp: glicoproteína-P; OCTN1: transportador de cátions orgânicos/ergotioneína; OCTN2: transportador de cátions orgânicos/carnitina.

Foram descritos vários polimorfismos de base única (SNP, *single nucleotide*

et al., 2002; FUKUSHIMA-UESAKA et al., 2004). Os SNPs não sinônimos com frequência  $\geq$  1% estão representados na Tabela 1, sendo que o *SLC22A2* c.808G>T (A270S) é o único polimorfismo frequentemente encontrado em todos os grupos étnicos (LEABMAN et al., 2002; FUKUSHIMA-UESAKA et al., 2004; KANG et al., 2007).

**Tabela 1.** Polimorfismos do *SLC22A2* e a frequência dos alelos raros em diferentes grupos étnicos

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

CA: caucasianos; AA: africano-americano; AS: asiático-americano; ME: mexicano-americano; rs: número de referência do SNP;

-: frequência não descrita na literatura.

<sup>a</sup>A numeração foi realizada a partir do códon iniciador (ATG) da sequência do cDNA do gene *SLC22A2* (GenBank: NM\_003058)

<sup>b</sup>Fonte: [http://www.nih.gov/jmpj/MPJ6\\_SNPs/html/html/SLC22A2/SnpList.html](http://www.nih.gov/jmpj/MPJ6_SNPs/html/html/SLC22A2/SnpList.html)

[1] LEABMAN et al., 2002; [2] KANG et al., 2007; [3] FUKUSHIMA-UESAKA et al., 2004; [4] WANG et al., 2008

Estudos *in vitro* mostraram uma redução no transporte de MPP<sup>+</sup> ([<sup>3</sup>H]-1-metil-4-fenilpiridina) e TEA (tetraetilamônio), os quais são substratos de OCT2, em células expressando as variantes c.495G>A, c.1198C>T, c.596C>T, c.602C>T e c.808G>T. A variante c.1294A>C apresentou um aumento na captação de MPP<sup>+</sup> (LEABMAN et al., 2002; KANG et al., 2007). Os polimorfismos *SLC22A2* c.586C>T, c.602C>T e c.808G>T influenciam na disposição cinética da metformina, substrato de OCT2, diminuindo o clearance renal do fármaco e elevando a concentração plasmática (CHOI e SONG, 2008; SONG et al., 2008).



Embora os polimorfismos *SLC22A2* c.596C>T e c.602C>T apresentaram alteração na atividade do OCT2 eles são encontrados em frequências que variam de 1 a 2% apenas em populações asiáticas (coreanas e japonesas). Wang et al. (2008) observou que indivíduos homozigotos para o alelo raro (TT) na presença de cimetidina apresentaram uma menor alteração no clearance renal de metformina (12%) do que pacientes que possuem pelo menos um alelo selvagem (26,0 para GT e 42,4% para GG), o que indica que os homozigotos para o alelo raro são menos sensíveis a inibição pela cimetidina (WANG et al., 2008).

### **1.3. Transportador de cátions orgânicos/ergotioneína 1 (OCTN1)**

O transportador de cátions orgânicos/ergotioneína 1 (OCTN1) é um transportador bidirecional e pH-dependente (URBAN et al., 2007; INTERNATIONAL TRANSPORTER CONSORTIUM, 2010). É expresso na borda em escova da membrana apical do túbulo proximal nos rins e participa da reabsorção de zwitteríons e da secreção de cátions orgânicos (KOEPSSELL, 2013; LAI, 2013) (Figura 2). Além disso, o OCTN1 também está presente nos eritrócitos, intestino, baço, coração, músculo esquelético, cérebro, glândulas mamárias, pulmão, timo, próstata, vias aéreas, testículos, olhos, fígado fetal, esperma, células do sistema imunológico (URBAN et al., 2007; KOEPSSELL, 2013).

Substâncias endógenas e substâncias presentes em alimentos como acetilcolina, ergotioneína, glicina-betaína, *L*-carnitina e os fármacos quinidina, pirilamina, verapamil, ipratropio, tiotropio, mitoxantrona, doxorubicina, estaquidrina, betonicina e gabapentina são substratos de OCTN1 (KOEPSSELL, 2013). Vários compostos foram descritos como inibidores de OCTN1, por exemplo, colina, *L*-carnitina, *D*-carnitina, cefaloridina, cimetidina, clonidina, levofloxacino, lidocaína, ofloxacino, procainamida, quinina, quinidina, tetrabutylamônio,

Estudos *in vitro* mostraram a presença de vários SNPs em regiões codificadoras e não codificadoras no gene *SLC22A4*, o qual codifica OCTN1. Na Tabela 2 estão descritos os polimorfismos presentes na região codificadora do gene *SLC22A4*. Tais mutações levam a substituição de aminoácido (SNPs não sinônimos) ou são mutações sem sentido (SNP *nonsense*) podendo acarretar em uma alteração da atividade do transportador (KAWASAKI et al., 2004; PELTEKOVA et al., 2004; URBAN et al., 2007).

**Tabela 2.** Polimorfismos do *SLC22A4* e a frequência dos alelos raros em diferentes grupos étnicos

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

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

<sup>a</sup>A numeração foi realizada a partir do códon iniciador (ATG) da sequência do cDNA do gene *SLC22A4* (GenBank: NM\_003059)

[1] URBAN et al., 2007; [2] KAWASAKI et al., 2004

Dados da literatura mostram que a substituição nos aminoácidos D165G e G462E e a deleção do aminoácido R282Del levam a perda da atividade do OCTN1 *in vitro*. No entanto, a frequência desses polimorfismos em diferentes grupos étnicos é baixa ou não foi relatada (KAWASAKI et al., 2004; URBAN et al., 2007). O polimorfismo c.615G>A (M205I) apresentou uma redução na atividade do transporte *in vitro* de TEA por OCTN1; e os

polimorfismos c.475G>A (V159M) e c.917C>T (T306I) não apresentaram alteração na atividade do transportador (URBAN et al., 2007).

Um estudo realizado por Peltekova et al. (2004) mostrou que o polimorfismo c.1507C>T (L503F) altera a especificidade dos substratos aumentando a afinidade por compostos tetra-alquilamônio e diminuindo a afinidade por *L*-carnitina, colina, cimetidina, lidocaína, N-metilnicotinamida e verapamil (PELTEKOVA et al., 2004). Considerando a elevada frequência desse polimorfismo em europeus-americanos (41,2%), estudos que avaliam o impacto do genótipo de OCTN1 são necessários para compreender a variabilidade interindividual na disposição cinética dos seus substratos.

## 2. JUSTIFICATIVA

A excreção urinária é a principal forma de eliminação da GAB e dados da literatura sugerem que o clearance renal envolve secreção tubular via transporte mediado por OCT2 e OCTN1. Os genes *SLC22A2* e *SLC22A4* que codificam os transportadores OCT2 e OCTN1, respectivamente, são polimórficos geneticamente. O polimorfismo de base única (SNP) *SLC22A4* c.1507C>T apresenta frequência de 41,2% em europeus americanos e dados da literatura demonstram que a especificidade do transportador por diversos de seus substratos é alterada na presença deste SNP. Por outro lado, o polimorfismo *SLC22A2* c.808G>T, com frequência de 15,7% em caucasianos está relacionado a redução da atividade de OCT2. Tendo em vista que a GAB tem sido descrita como substrato de OCT2 e OCTN1, esperamos que o polimorfismo genético dos transportadores possa explicar, pelo menos parcialmente, a variabilidade na disposição cinética da GAB.

Com o objetivo de investigar a influência da farmacogenética na disposição cinética da

serão investigados quanto a disposição cinética do fármaco e quanto ao genótipo dos SNPs *SLC22A4* c.1507C>T e *SLC22A2* c.808G>T. A partir dos resultados encontrados, buscamos caracterizar o impacto da atividade geneticamente determinada de OCT2 e OCTN1 na relação concentração plasmática/dose de GAB.

### **3. OBJETIVOS**

O presente estudo tem por objetivo avaliar a influência de polimorfismos genéticos de OCTN1 e OCT2 e outras potenciais covariáveis na disposição cinética da GAB em pacientes em uso crônico do fármaco.

#### **3.1. Objetivos específicos**

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

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

*3.1.3. Estimar os parâmetros farmacocinéticos da GAB por análise populacional.*

### **4. CASUÍSTICA E MÉTODOS**

No presente estudo clínico serão investigados pacientes em uso crônico de GAB atendidos no Hospital Estadual de Américo Brasiliense (HEAB). O projeto será submetido a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FCF-UNESP) e desenvolvido sob coordenação clínica do Dr. Edgar Ianhez Júnior do HEAB.

#### **4.1. Aspectos éticos**

Os pacientes serão incluídos no estudo após receberem informações sobre o protocolo clínico, assim como seus possíveis riscos, concordarem em participar do estudo e assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) previamente aprovado pelo CEP da FCF-UNESP. Os pacientes com comprometimento cognitivo diagnosticado pela equipe médica poderão ter seu TCLE assinado pelo seu responsável legal, conforme a norma vigente. Será garantida a liberdade do paciente se recusar a participar ou retirar seu consentimento, em qualquer período da pesquisa, sem penalização alguma ou prejuízo ao seu cuidado e/ou tratamento. Caso haja intercorrências, como aparecimento de efeitos adversos, será garantido o afastamento do paciente do protocolo de pesquisa.

#### **4.2. Critérios de Inclusão**

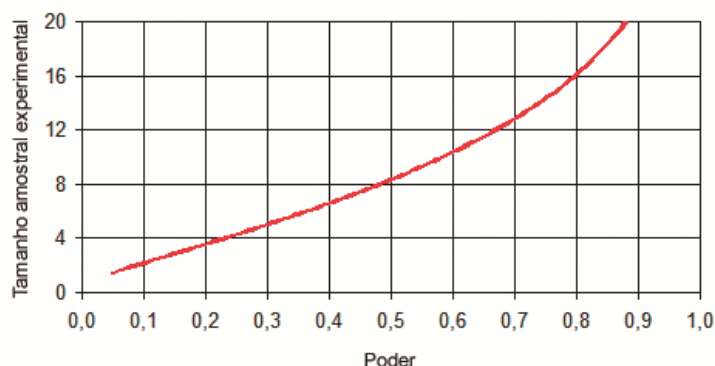
No presente trabalho serão investigados pacientes com idade superior a 18 anos, de ambos os sexos, em uso crônico de GAB quer seja para o tratamento de epilepsia ou para o tratamento de dor crônica atendidos no HEAB. Os pacientes serão incluídos no protocolo clínico uma semana após o início do tratamento com a GAB. Esse período é necessário para que seja atingido o estado de equilíbrio das concentrações plasmáticas de GAB (período superior a 6 meias-vidas do fármaco).

#### **4.3. Critérios de Exclusão**

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

#### 4.4. Cálculo do tamanho amostral

O cálculo do tamanho amostral foi obtido através do programa *Power and Sample Calculation* versão 3.1.2 (DUPONT e PLUMMER JR, 1997) com base na variabilidade da concentração de GAB no plasma previamente estudada em voluntários sadios (GORDI et al., 2008). Neste estudo a média  $\pm$  desvio padrão da concentração mínima de GAB no estado de equilíbrio foi  $1849 \pm 658$  ng/mL após a administração de 1800 mg, uma vez ao dia. Nossa hipótese de trabalho é a de que o polimorfismo genético *SLC22A2* c.808G>T irá elevar em pelo menos 30% a concentração de GAB no plasma em portadores de pelo menos um alelo raro. Tal polimorfismo foi escolhido para o cálculo do tamanho amostral por apresentar menor frequência alélica do que *SLC22A4* c.1507C>T. Para o cálculo do tamanho amostral fixou-se o nível de significância em 5%, poder de 0,80, e diferença entre as médias de concentração da GAB no plasma em 30%. A Figura 3 mostra a variação do poder do teste de acordo com o tamanho amostral do grupo experimental. Como pode ser observada, a inclusão de 16 pacientes no grupo experimental, constituído por pacientes portadores de pelo menos um alelo raro, irá acarretar em poder do teste acima de 80%. Tendo em vista que a frequência do polimorfismo c.808G>T é de aproximadamente 15,7% na população caucasiana (LEABMAN et al., 2002), e assumindo frequência alélica similar na nossa população, será necessária a inclusão de 55 pacientes em uso de GAB no total. Considerando o total de 55 pacientes incluídos no estudo e com base na frequência alélica do polimorfismo c.808G>T, esperamos incluir 16 pacientes no grupo experimental e 39 pacientes no grupo controle.



**Figura 3.** Estudo do tamanho amostral (grupo experimental) em relação ao poder do teste (*Power and Sample Calculation* versão 3.1.2).

#### 4.5. Protocolo Clínico

O estudo será desenvolvido em pacientes em uso crônico de GAB atendidos no HEAB. O protocolo clínico será realizado uma vez que o estado de equilíbrio para a GAB for alcançado. Após concordarem em participar do estudo e assinarem o TCLE, os pacientes serão submetidos a 3 coletas de amostras, as coletas serão realizadas pelo próprio pesquisador após o devido treinamento. As características antropométricas (peso corporal e altura), variáveis demográficas (idade, sexo), bem como informações referentes a comorbidades, e o uso crônico de outros medicamentos e seus regimes posológicos serão obtidas a partir dos dados do prontuário dos pacientes (Figura 4).

##### 4.5.1. Primeira coleta

Será realizada antes da administração do fármaco. Serão coletadas as seguintes amostras:

a) sangue venoso em tubo contendo heparina (6 mL) para análise da concentração plasmática de GAB;

b) sangue venoso em tubos contendo EDTA (8 mL) para a genotipagem dos polimorfismos de OCT2 e OCTN1;

c) sangue venoso em tubo sem anticoagulante (4 mL) para a determinação de creatinina sérica;

d) urina no intervalo entre as doses de GAB.

A determinação de creatinina sérica será solicitada e realizada pelo HEAB apenas quando dados de creatinina sérica dos últimos 30 dias não estiverem disponíveis no prontuário do paciente.

O clearance de creatinina será determinado pela equação de Cockcroft e Gault corrigida pela superfície corporal (SC) de 1,73 m<sup>2</sup> (NATIONAL KIDNEY FOUNDATION, 2002).

$$\text{Clearance de creatinina} = \frac{(140 - \text{idade}) \times \text{peso}}{72 \times \text{creatinina sérica}} \times \frac{1,73}{SC}$$

#### 4.5.2. Segunda coleta

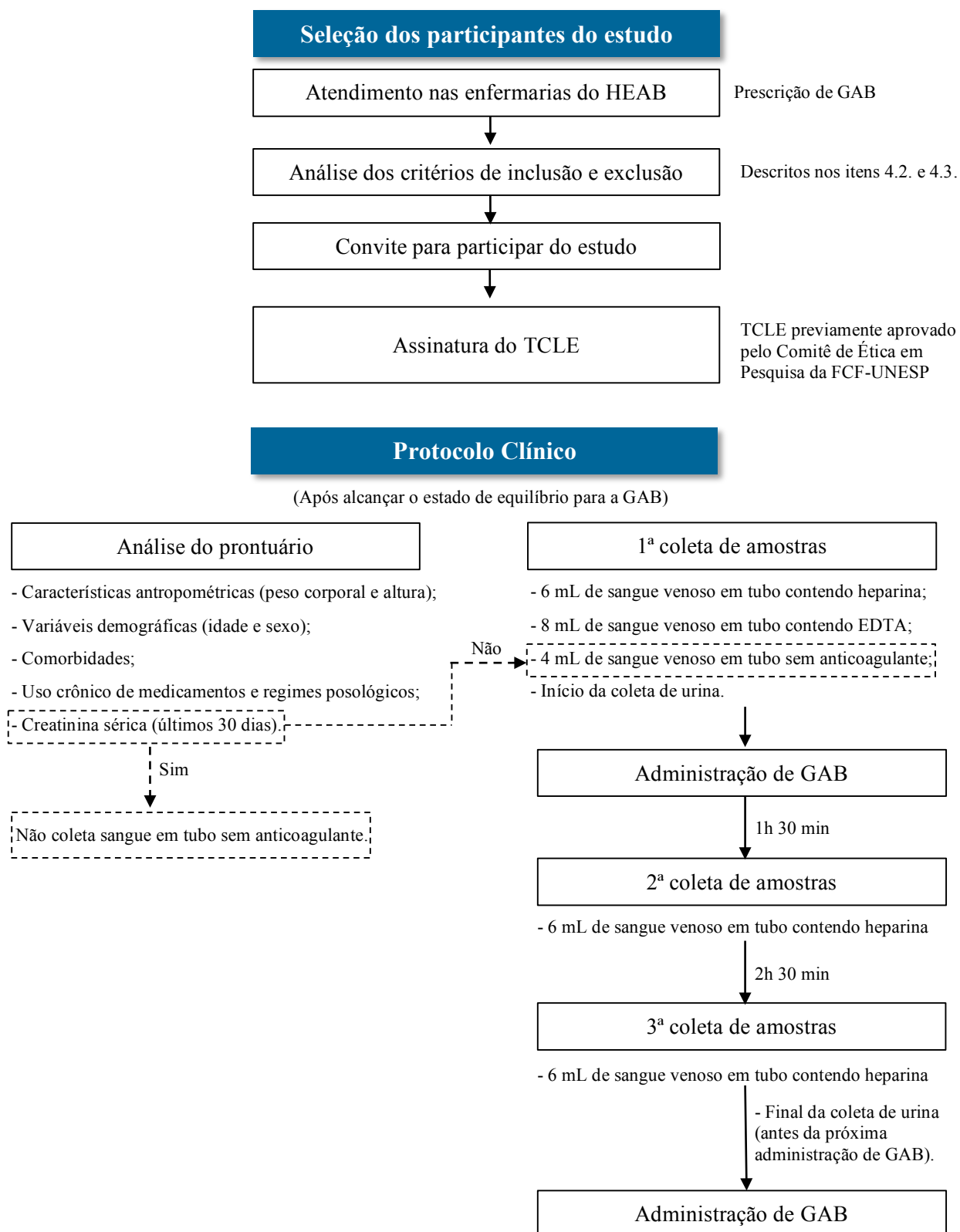
Será coletado sangue venoso em tubo contendo heparina (6 mL) para análise da concentração plasmática de GAB 1,5 horas após a administração do fármaco.

#### 4.5.3. Terceira coleta

Será coletado sangue venoso em tubo contendo heparina (6 mL) para análise da concentração plasmática de GAB 4 horas após a administração do fármaco.

Todo material biológico será devidamente identificado, acondicionado e armazenado até o momento do transporte, o qual ocorrerá ao final das coletas. O transporte será realizado pelo pesquisador em embalagens apropriadas para o Laboratório de Toxicologia da FCF-UNESP onde serão processadas e/ou analisadas.





**Figura 4.** Fluxograma da seleção dos participantes e do protocolo clínico do estudo.

#### 4.6. Análise da GAB em plasma e urina

A análise da GAB em plasma e urina será realizada por LC-MS no laboratório de Toxicologia da FCF-UNESP (PARK et al., 2007). Será empregado o sistema cromatográfico LC Conventional LC (6000 psi, Perkin Elmer) acoplado ao espectrômetro de massas de único quadripolo Flexar SQ 300 MS (Perkin Elmer) com fonte de ionização por Electrospray (ESI). Os métodos de análise em plasma e urina serão validados de acordo com a Resolução ANVISA RDC n° 27 de 17 de maio de 2012, considerando os parâmetros robustez, efeito matriz, linearidade, limite de quantificação, precisão e exatidão inter e intra-ensaios e estabilidade das soluções padrão e das amostras de GAB em plasma e urina em temperatura ambiente (curta duração), após ciclos de congelamento e descongelamento, pós-processamento e quanto ao período de armazenamento em freezer (longa duração).

A GAB e o padrão interno, hidrato de ácido (S)-(+)- $\alpha$ -aminociclohexanopropiônico (ACP), serão resolvidos em coluna de fase reversa C18 e fase móvel constituída de acetonitrila (ACN) 10 mM de acetato de amônio (20:80 v/v, pH 3,2). Amostras de 100  $\mu$ L de plasma ou urina serão adicionadas de 40  $\mu$ L de padrão interno (ACP 50  $\mu$ g/mL) e 300  $\mu$ L de ACN e agitadas mecanicamente. Então os tubos serão centrifugados por 10 minutos a 12.000 rpm. 300  $\mu$ L da fase orgânica superior serão evaporados até a secura e o resíduo será reconstituído em 200  $\mu$ L da fase móvel. Após reconstituição, será centrifugado por 10 minutos a 12.000 rpm e uma alíquota de 5  $\mu$ L será injetada no sistema cromatográfico.

#### 4.7. Genotipagem para SLC22A2 e SLC22A4

O DNA genômico será extraído de amostras de sangue total para avaliação dos polimorfismos dos genes *SLC22A2* e *SLC22A4*, que codificam o OCT2 e o OCTN1,

Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP). Os polimorfismos c.808G>T (A270S) do gene *SLC22A2* e c.1507C>T (L503F) do gene *SLC22A4* serão avaliados em todos os pacientes incluídos no presente estudo. A reação da polimerase em cadeia (PCR) e sequenciamento dos produtos de PCR serão realizados empregando condições definidas em trabalhos publicados previamente (Tabela 3, TOH et al., 2009; YOON et al., 2013).

**Tabela 3.** Sequência de *primers* a serem empregados no genótipo do gene *SLC22A2* e do gene *SLC22A4*

Gene	Posição	Primer F' (5'→3')	Primer R' (5'→3')
SLC22A2	808G>T	CTGGACAGCCAACTCATTA	ATTGGGCTCTTTGTGAAAT
SLC22A4	1507C>T	CCAACCTTCACAAAATGATGCTC	CCCAGCCAACAATATGCTTTAT

#### 4.8. Análise farmacocinética populacional

Os parâmetros farmacocinéticos da GAB serão estimados usando abordagem populacional através do software NONMEN em estudo de colaboração com a Prof. Aleksandra Galetin da *University of Manchester*.

#### 4.9. Análise estatística

Os testes estatísticos serão realizados com auxílio do *software SPSS Statistics* para obtenção da média, mediana, erro padrão da média (EPM) e intervalos de confiança. A distribuição dos genótipos para cada polimorfismo será avaliada quanto a desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg. As concentrações plasmáticas de GAB no vale serão comparadas entre os genótipos de OCT2 e OCTN1 usando análise de variância (ANOVA). Para relacionar as concentrações plasmáticas de GAB e as suas potenciais covariáveis (genótipo, IMC, clearance

de creatinina, dose, etc) será empregada a regressão linear múltipla. As diferenças serão consideradas significativas quando o valor de  $p < 0,05$ .

## 5. PLANO DE TRABALHO E CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO

- I.Revisão de literatura
- II.Padronização e validação do método de análise da GAB em plasma e urina usando LC-MS
- III.Etapa clínica do projeto: seleção dos pacientes e coleta de amostras
- IV.Análise da GAB no plasma e urina dos pacientes
- V.Genotipagem
- VI.Análise farmacocinética
- VII.Análise estatística
- VIII.Preparo da dissertação e publicação de trabalhos científicos

Atividades	Meses																															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30		
I																																
II																																
III																																
IV																																
V																																
VI																																
VII																																
VIII																																

## 6. REFERÊNCIAS

- ARMIJO, J. A.; PENA, M. A.; ADIN, J.; VEGA-GIL, N. Association between patient age and gabapentin serum concentration-to-dose ratio: a preliminary multivariate analysis. **Ther Drug Monit**, v. 26, n. 6, p. 633-7, 2004.
- BLUM, R. A.; COMSTOCK, T. J.; SICA, D. A.; SCHULTZ, R. W.; KELLER, E.; REETZE, P.; BOCKBRADER, H.; TUERCK, D.; BUSCH, J. A.; REECE, P. A.; SEDMAN, A. J. Pharmacokinetics of gabapentin in subjects with various degrees of renal function. **Clin Pharmacol Ther**, v. 56, n. 2, p. 154-9, 1994.
- BOYD, R. A.; TURCK, D.; ABEL, R. B.; SEDMAN, A. J.; BOCKBRADER, H. N. Effects of age and gender on single-dose pharmacokinetics of gabapentin. **Epilepsia**, v. 40, n. 4, p. 474-9, 1999.
- CHOI, M. K.; SONG, I. S. Organic cation transporters and their pharmacokinetic and pharmacodynamic consequences. **Drug Metab Pharmacokinetic**, v. 23, n. 4, p. 243-53, 2008.

- CLIVATTI, J.; SAKATA, R. K.; ISSY, A. M. Review of the use of Gabapentin in the Control of Postoperative Pain. **Brazilian Journal of Anesthesiology**, v. 59, n. 1, p. 87-98, 2009.
- DICKENS, D.; WEBB, S. D.; ANTONYUK, S.; GIANNOUDIS, A.; OWEN, A.; RADISCH, S.; HASNAIN, S. S.; PIRMOHAMED, M. Transport of gabapentin by LAT1 (SLC7A5). **Biochem Pharmacol**, v. 85, n. 11, p. 1672-83, 2013.
- DUPONT, W. D.; PLUMMER JR, W. D. PS power and sample size program available for free on the internet. **Controlled Clinical Trials**, v. 18, n. 3, p. 274, 1997.
- FUJITA, T.; URBAN, T. J.; LEABMAN, M. K.; FUJITA, K.; GIACOMINI, K. M. Transport of drugs in the kidney by the human organic cation transporter, OCT2 and its genetic variants. **J Pharm Sci**, v. 95, n. 1, p. 25-36, 2006.
- FUKUSHIMA-UESAKA, H.; MAEKAWA, K.; OZAWA, S.; KOMAMURA, K.; UENO, K.; SHIBAKAWA, M.; KAMAKURA, S.; KITAKAZE, M.; TOMOIKE, H.; SAITO, Y.; SAWADA, J. Fourteen novel single nucleotide polymorphisms in the SLC22A2 gene encoding human organic cation transporter (OCT2). **Drug Metab Pharmacokinet**, v. 19, n. 3, p. 239-44, 2004.
- GORDI, T.; HOU, E.; KASICHAYANULA, S.; BERNER, B. Pharmacokinetics of gabapentin after a single day and at steady state following the administration of gastric-retentive- extended-release and immediate-release tablets: a randomized, open-label, multiple-dose, three-way crossover, exploratory study in healthy subjects. **Clin Ther**, v. 30, n. 5, p. 909-16, 2008.
- INTERNATIONAL TRANSPORTER CONSORTIUM, GIACOMINI, K. M.; HUANG, S. M.; TWEEDIE, D. J.; BENET, L. Z.; BROUWER, K. L.; CHU, X.; DAHLIN, A.; EVERS, R.; FISCHER, V.; HILLGREN, K. M.; HOFFMASTER, K. A.; ISHIKAWA, T.; KEPPLER, D.; KIM, R. B.; LEE, C. A.; NIEMI, M.; POLLI, J. W.; SUGIYAMA, Y.; SWAAN, P. W.; WARE, J. A.; WRIGHT, S. H.; YEE, S. W.; ZAMEK-GLISZCZYNSKI, M. J.; ZHANG, L. Membrane transporters in drug development. **Nat Rev Drug Discov**, v. 9, n. 3, p. 215-36, 2010.
- JOHANNESSEN LANDMARK, C.; BEISKE, G.; BAFTIU, A.; BURNS, M. L.; JOHANNESSEN, S. I. Experience from therapeutic drug monitoring and gender aspects of gabapentin and pregabalin in clinical practice. **Seizure**, v. 28, p. 88-91, 2015.
- JOHANNESSEN, S. I.; BATTINO, D.; BERRY, D. J.; BIALER, M.; KRÄMER, G.; TOMSON, T.; PATSALOS, P. N. Therapeutic drug monitoring of the newer antiepileptic drugs. **Ther Drug Monit**, v. 25, n. 3, p. 347-63, 2003.
- JOHANNESSEN, S. I.; TOMSON, T. Pharmacokinetic variability of newer antiepileptic drugs: when is monitoring needed? **Clin Pharmacokinet**, v. 45, n. 11, p. 1061-75, 2006.
- KANG, H. J.; SONG, I. S.; SHIN, H. J.; KIM, W. Y.; LEE, C. H.; SHIM, J. C.; ZHOU, H. H.; LEE, S. S.; SHIN, J. G. Identification and functional characterization of genetic variants of human organic cation transporters in a Korean population. **Drug Metab Dispos**, v. 35, n. 4, p. 667-75, 2007.
- KAWASAKI, Y.; KATO, Y.; SAI, Y.; TSUJI, A. Functional characterization of human organic cation transporter OCTN1 single nucleotide polymorphisms in the Japanese population. **J Pharm Sci**, v. 93, n. 12, p. 2920-6, 2004.
- KOEPSSELL, H. The SLC22 family with transporters of organic cations, anions and zwitterions. **Mol Aspects Med**, v. 34, n. 2-3, p. 413-35, 2013.
- KOEPSSELL, H.; LIPS, K.; VOLK, C. Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. **Pharm Res**, v. 24, n. 7, p. 1227-51, 2007.
- KRASOWSKI, M. D.; MCMILLIN, G. A. Advances in anti-epileptic drug testing. **Clin Chim Acta**,

- LAI, Y. Organic anion, organic cation and zwitterion transporters of the SLC22 and SLC47 superfamily (OATs, OCTs, OCTNs and MATEs). In: LAI, Y. (Ed.). **Transporters in Drug Discovery and Development**. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2013, Cap. 7, p. 455-631.
- LAL, R.; SUKBUNTHONG, J.; LUO, W.; VICENTE, V.; BLUMENTHAL, R.; HO, J.; CUNDY, K. C. Clinical pharmacokinetic drug interaction studies of gabapentin enacarbil, a novel transported prodrug of gabapentin, with naproxen and cimetidine. **Br J Clin Pharmacol**, v. 69, n. 5, p. 498-507, 2010.
- LEABMAN, M. K.; HUANG, C. C.; KAWAMOTO, M.; JOHNS, S. J.; STRYKE, D.; FERRIN, T. E.; DEYOUNG, J.; TAYLOR, T.; CLARK, A. G.; HERSKOWITZ, I.; GIACOMINI, K. M. Polymorphisms in a human kidney xenobiotic transporter, OCT2, exhibit altered function. **Pharmacogenetics**, v. 12, n. 5, p. 395-405, 2002.
- NATIONAL KIDNEY FOUNDATION. K/DOQI Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification and Stratification. **Am J Kidney Dis**, v. 39, Suppl. 1, p. S1-S266, 2002
- NEELS, H. M.; SIERENS, A. C.; NAELAERTS, K.; SCHARPE, S. L.; HATFIELD, G. M.; LAMBERT, W. E. Therapeutic drug monitoring of old and newer anti-epileptic drugs. **Clin Chem Lab Med**, v. 42, n. 11, p. 1228-55, 2004.
- NEURONTIN. Farmacêutico Responsável José Cláudio Bumerad. Guarulhos: Laboratórios Pfizer Ltda, 2015. Bula de remédio.
- PARK, J.; JHEE, O.; PARK, S.; LEE, J.; LEE, M.; SHAW, L.; KIM, K.; LEE, J.; KIM, Y.; KANG, J. Validated LC-MS/MS method for quantification of gabapentin in human plasma: application to pharmacokinetic and bioequivalence studies in Korean volunteers. **Biomedical Chromatography**, v. 21, n. 8, p. 829-835, 2007.
- PATSALOS, P. N.; BERRY, D. J.; BOURGEOIS, B. F.; CLOYD, J. C.; GLAUSER, T. A.; JOHANNESSEN, S. I.; LEPPIK, I. E.; TOMSON, T.; PERUCCA, E. Antiepileptic drugs-best practice guidelines for therapeutic drug monitoring: a position paper by the subcommission on therapeutic drug monitoring, ILAE Commission on Therapeutic Strategies. **Epilepsia**, v. 49, n. 7, p. 1239-76, 2008.
- PELTEKOVA, V. D.; WINTLE, R. F.; RUBIN, L. A.; AMOS, C. I.; HUANG, Q.; GU, X.; NEWMAN, B.; VAN OENE, M.; CESCONE, D.; GREENBERG, G.; GRIFFITHS, A. M.; ST GEORGE-HYSLOP, P. H.; SIMINOVITCH, K. A. Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. **Nat Genet**, v. 36, n. 5, p. 471-5, 2004.
- SONG, I. S.; SHIN, H. J.; SHIM, E. J.; JUNG, I. S.; KIM, W. Y.; SHON, J. H.; SHIN, J. G. Genetic variants of the organic cation transporter 2 influence the disposition of metformin. **Clin Pharmacol Ther**, v. 84, n. 5, p. 559-62, 2008.
- STEWART, B. H.; KUGLER, A. R.; THOMPSON, P. R.; BOCKBRADER, H. N. A saturable transport mechanism in the intestinal absorption of gabapentin is the underlying cause of the lack of proportionality between increasing dose and drug levels in plasma. **Pharm Res**, v. 10, n. 2, p. 276-81, 1993.
- STRIANO, S.; STRIANO, P.; CAPONE, D.; PISANI, F. Limited place for plasma monitoring of new antiepileptic drugs in clinical practice. **Med Sci Monit**, v. 14, n. 10, p. Ra173-8, 2008.
- SU, T. Z.; LUNNEY, E.; CAMPBELL, G.; OXENDER, D. Transport of gabapentin, a gamma-amino acid drug, by system I alpha-amino acid transporters: a comparative study in astrocytes, synaptosomes, and CHO cells. **J Neurochem**, v. 64, n. 5, p. 2125-31, 1995.

TOH, D. S.; KOO, S. H.; LIMENTA, L. M.; YEE, J. Y.; MURRAY, M.; LEE, E. J. Genetic variations of the SLC22A4 gene in Chinese and Indian populations of Singapore. **Drug Metab Pharmacokinet**, v. 24, n. 5, p. 475-81, 2009.

URBAN, T. J.; BROWN, C.; CASTRO, R. A.; SHAH, N.; MERCER, R.; HUANG, Y.; BRETT, C. M.; BURCHARD, E. G.; GIACOMINI, K. M. Effects of genetic variation in the novel organic cation transporter, OCTN1, on the renal clearance of gabapentin. **Clin Pharmacol Ther**, v. 83, n. 3, p. 416-21, 2008.

URBAN, T. J.; YANG, C.; LAGPACAN, L. L.; BROWN, C.; CASTRO, R. A.; TAYLOR, T. R.; HUANG, C. C.; STRYKE, D.; JOHNS, S. J.; KAWAMOTO, M.; CARLSON, E. J.; FERRIN, T. E.; BURCHARD, E. G.; GIACOMINI, K. M. Functional effects of protein sequence polymorphisms in the organic cation/ergothioneine transporter OCTN1 (SLC22A4). **Pharmacogenet Genomics**, v. 17, n. 9, p. 773-82, 2007.

WANG, Z. J.; YIN, O. Q.; TOMLINSON, B.; CHOW, M. S. OCT2 polymorphisms and in-vivo renal functional consequence: studies with metformin and cimetidine. **Pharmacogenet Genomics**, v. 18, n. 7, p. 637-45, 2008.

YOON, H.; CHO, H. Y.; YOO, H. D.; KIM, S. M.; LEE, Y. B. Influences of organic cation transporter polymorphisms on the population pharmacokinetics of metformin in healthy subjects. **Aaps j**, v. 15, n. 2, p. 571-80, 2013.