



FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO-USP DEPARTAMENTO DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA

Av. Bandeirantes, 3900 - 8º andar - Ribeirão Preto-SP - CEP 14049- 900
Fone (016) 3602-2583 - Fax (016) 3602-1524

TÍTULO

Influência da pielonefrite em gestantes sobre a atividade dos transportadores de membrana OATP1B1 e OCT2 / Influence of pyelonephritis in pregnant women on the activity of membrane transporters OATP1B1 and OCT2

LINHA DE PESQUISA

Farmacocinética, metabolismo e transferência placentária de drogas durante a gestação

NUCLEO DE PESQUISA OU SETOR

Setor de Obstetrícia do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP)

LOCAIS DE EXECUÇÃO

Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRPUSP): Centro Obstétrico (CO), Ambulatório de Moléstias Infectocontagiosas em Ginecologia e Obstetrícia (AMIGO), Enfermaria e Unidade de Pesquisa Clínica (UPC)

Irmandade da Santa Casa da Misericórdia de São Carlos (ISCSCar)

Laboratório de Farmacocinética Clínica (PKCLIN) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP)

PESQUISADOR RESPONSÁVEL

Ma. Ana Cláudia Rabelo e Silva

PESQUISADORES ENVOLVIDOS

Prof. Dr. Geraldo Duarte (Orientador)

Profa. Dra. Vera Lucia Lanchote (Coorientadora) – FCFRP-USP

Prof. Dr. João Paulo Bianchi Ximenez – FCFRP-USP

Ma. Bruna Elias Parreira Lopes Ferraz – ISCSCar

APROVAÇÃO DO CHEFE DO SETOR: Sim (X) Não ()

Ribeirão Preto

2024

Lista de Siglas

6 β -OHCOR	6 β -hidroxicortisol
ABC	Transportador <i>ATP-binding cassette</i>
ADME	Absorção, distribuição, metabolismo e excreção de fármacos
ALT	Alanino aminotransferase
AMIGO	Ambulatório de Moléstias Infectocontagiosas em Ginecologia e Obstetrícia
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	Aspartato aminotransferase
AUC	Área sob a curva
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
Cl/F	Clearance total
C _{max}	Concentração máxima
CO	Centro Obstétrico
COR	Cortisol
CP	Coproporfirina
CYP	Citocromo P450
CYP3A	Subfamília 3A do citocromo P450
FCFRP-USP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
FMRP-USP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
HC-FMRPUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
ISCSCar	Irmandade da Santa Casa da Misericórdia de São Carlos
IFN- γ	Interferón gama
IL	Interleucina
ITU	Infecção do trato urinário
k _{el}	Constante da velocidade de eliminação
MRM	Monitoramento de Reações Múltiplas
OATP	Polipeptídio de transporte de ânions orgânicos
OCT	Transportador de cátions orgânicos
PKCLIN	Laboratório de Farmacocinética Clínica
REDCap	<i>Research Electronic Data Capture</i>
SLC	Transportador <i>solute-linked carrier</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UPC	Unidade de Pesquisa Clínica
UPLC-MS/MS	Cromatografia líquida de ultra eficiência com detecção por espectrometria de massas

Sumário

1 Introdução	6
2 Objetivos	10
2.1 Objetivo primário	10
2.2 Objetivos secundários	10
3 Métodos	10
3.1 Desenho de estudo	10
3.2 Aspectos éticos	11
3.3 Participantes	11
3.4 Tamanho amostral	12
3.5 Protocolo clínico	13
3.6 Determinação dos fármacos e biomarcadores	14
3.7 Análise farmacocinética	14
3.8 Análise do genótipo	15
3.9 Métodos estatísticos	15
3.10 Gestão de dados	15
4 Referências	16
5 Cronograma	22
6 Orçamento	23

RESUMO

Contexto/Justificativa: A presente pesquisa visa elucidar como a pielonefrite (a infecção mais grave do trato urinário na gravidez, com evidente componente inflamatório) modula a atividade dos transportadores de membrana das células em gestantes, possibilitando melhor embasamento futuro para a utilização de fármacos com mais segurança nessa população especial e para auxiliar na previsão da exposição fetal a fármacos. **Objetivo:** Avaliar a influência da pielonefrite na atividade dos transportadores OATP1B1 e OCT2 durante o segundo e o terceiro trimestres de gravidez (empregando rosuvastatina e metformina como fármacos marcadores). **Métodos:** Estudo observacional, longitudinal e prospectivo, no qual serão investigadas 13 gestantes diagnosticadas com pielonefrite que estejam no segundo ou terceiro trimestres de gravidez, com indicação de tratamento com antibióticos endovenosos. O protocolo clínico ocorrerá no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HC-FMRPUSP) e na Irmandade da Santa Casa da Misericórdia de São Carlos (ISCSCar) e será dividido em: a) Fase I, realizada na Divisão de Obstetrícia do HC-FMRPUSP e no Setor de Ginecologia e Obstetrícia da ISCSCar, onde são coletadas amostras sanguíneas para realização de exames bioquímicos e hematológicos, análise de citocinas inflamatórias e do genótipo. Em seguida, será administrada dose única oral dos fármacos marcadores: rosuvastatina (5 mg) e metformina (50 mg), com coletas seriadas de sangue por 24 h, as quais são congeladas e armazenadas até a análise farmacocinética; b) Fase II, realizada na Unidade de Pesquisa Clínica (UPC) e no Setor de Ginecologia e Obstetrícia da ISCSCar, em data conveniente para a participante após o término no tratamento subsequente com antibióticos orais, onde são realizados todos os mesmos procedimentos descritos na Fase I (exceto a análise do genótipo). As análises estão sendo realizadas no Laboratório de Farmacocinética Clínica (PKCLIN) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP), empregando cromatografia líquida de ultra eficiência com detecção por espectrometria de massas (UPLC-MS/MS), por meio de protocolos já validados (para rosuvastatina), em processo de publicação (para metformina) e outros em desenvolvimento neste estudo (para os biomarcadores endógenos coproporfirina I, cortisol e 6 β -hidroxicortisol). Os parâmetros farmacocinéticos (AUC e clearance total) serão calculados com base nas concentrações plasmáticas obtidas experimentalmente por meio do software *Phoenix WinNonlin*. Os dados do projeto estão sendo armazenados e gerenciados usando o *Research Electronic Data Capture* (REDCap). As análises estatísticas estão sendo realizadas com auxílio do software R. A disposição cinética dos fármacos marcadores será avaliada entre as fases (antes e após o tratamento) através do teste t de Student ou o teste não paramétrico de Wilcoxon. A relação entre o clearance renal da rosuvastatina com o biomarcador CP-I será avaliada pelo coeficiente de Pearson; todos com nível de significância fixado em 5%. O projeto será financiado pela Fundação

de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), por meio do Processo Temático FAPESP: 2018/05616-3.

Palavras-chave: Pielonefrite. Gravidez. Proteínas de membrana transportadoras.

1 INTRODUÇÃO

Os parâmetros farmacocinéticos (que incluem os processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção de um fármaco, reconhecidos pela sigla ADME) sofrem variações durante a gravidez, visto que a demanda metabólica materna para suprir as necessidades do feto resulta em um período naturalmente repleto de diversas alterações fisiológicas e anatômicas no organismo materno.¹

Essas modificações que ocorrem no organismo materno impactam diretamente sobre os fenômenos farmacocinéticos, os quais começaram a ser descritos em gestantes de forma mais consistente a partir de 1977,² cujos efeitos se fazem notar em praticamente todos os órgãos, sistemas e aparelhos do organismo materno, destacando-se o cardiovascular, respiratório, hematológico, urinário, digestivo e endócrino.^{3,4}

Considerando o processo de absorção gastrointestinal dos fármacos, esse pode ser mais lento devido ao prolongamento de 30-50% do tempo de esvaziamento gástrico, efeito originado do aumento da progesterona no plasma, reduzindo a peristalse do estômago. Destes efeitos, decorrem a redução da concentração plasmática máxima (C_{max}) e o aumento do tempo para alcançar a C_{max} .³⁻⁵ Além disso, a absorção de fármacos dependentes de pH também é reduzida, devido à elevação do pH intestinal pela redução da secreção gástrica de ácido clorídrico e aumento de radicais básicos.^{3,5} Outro ponto é a queda da absorção e da biodisponibilidade do fármaco decorrente das frequentes náuseas e vômitos deste período.^{1,4,5}

Com relação à distribuição dos fármacos, observa-se sua elevação devido ao aumento no peso corporal, na deposição de gorduras e no volume plasmático (até 50%), assim como à redução da concentração de albumina plasmática.⁶

Por sua vez, o metabolismo dos fármacos também sofre alterações variáveis de acordo com o tipo específico de enzima envolvida. As enzimas das fases I (que envolvem a modificação química do fármaco: redução, oxidação pelo citocromo P450 [CYP] e hidrólise) e II (que envolvem a adição de frações: açúcares, sulfatos e aminoácidos) são afetadas pela gravidez, influenciando na concentração e na eficácia dos fármacos.²

Sobre a excreção, seu aumento ocorre principalmente devido à amplificação do clearance renal, decorrente do incremento do fluxo sanguíneo renal e da taxa de filtração glomerular, consequentemente promovendo menor meia-vida aos fármacos eliminados pelos rins.⁶

Com isso, mudanças em todos esses processos de ADME durante a gravidez devem-se, direta ou indiretamente, à alteração da atividade das enzimas metabolizadoras e dos transportadores de membrana relacionados ao fluxo dos fármacos.^{6,7}

Enzimas metabolizadoras, como as que fazem parte da superfamília CYP, são responsáveis pela biotransformação majoritariamente hepática de cerca de 70 a 80% dos fármacos disponíveis no mercado.⁸ As isoformas da subfamília 3A (CYP3A) são as mais abundantes no corpo humano, metabolizando cerca de 30% dos fármacos.⁹

Com relação aos transportadores, são proteínas integrais de membrana, as quais, por meio de transporte ativo, transferem fármacos e outras moléculas através da membrana celular, afetando todas as etapas de sua metabolização.¹⁰ São conhecidos inúmeros transportadores de fármacos, os quais são classificados principalmente em duas superfamílias: a) transportadores do tipo ABC, do inglês *ATP-binding cassette* (ABC), que estão relacionados, em geral, com o efluxo de substâncias; e b) transportadores do tipo SLC, do inglês *solute-linked carrier* (SLC), que estão frequentemente associados com o influxo de substâncias.¹¹

A respeito da família SLC, mais de 450 genes codificantes de proteínas transportadoras já foram identificados, os quais incluem, dentre outros, os grupos dos polipeptídios de transporte de ânions orgânicos (OATPs) e dos transportadores de cátions orgânicos (OCTs), atuando na captação hepática e renal de fármacos, respectivamente.^{11–13} Dentre os OATPs, o OATP1B1 é encontrado na membrana basolateral de hepatócitos, sendo essencial na absorção hepática de fármacos e no seu clearance. Considerando agora os OCTs, sabe-se que o OCT2 é expresso majoritariamente na membrana luminal de células epiteliais dos rins, também sendo encontrado em outros órgãos, como no intestino delgado, pulmão, pele, cérebro e plexo coroide. OATP1B1 e OCT2 foram escolhidos para investigação nesta pesquisa por apresentarem um papel crucial nos processos de ADME e, conseqüentemente, sendo de elevada relevância clínica, estando, inclusive, incluídos na lista dos transportadores recomendados pelas agências reguladoras para triagem durante o desenvolvimento de medicamentos.¹³

Duas estratégias para as análises da modulação dessas enzimas e transportadores utilizam: a) substratos de fármacos e b) biomarcadores endógenos. Apesar dessas duas estratégias demandarem métodos analíticos sensíveis e corretamente validados, ambas têm como vantagens não serem invasivas e muito seguras para os pacientes. Além disso, os substratos atuam como fármacos marcadores, utilizando medicamentos que, em geral, já apresentam a farmacocinética bem conhecida.⁷

Alguns medicamentos são considerados bons fármacos marcadores para OATP1B1, como é o caso da rosuvastatina, utilizada no tratamento de hipercolesterolemia.^{12,14} O uso das estatinas, classe da qual a rosuvastatina faz parte, durante a gravidez não foi associado com anomalias congênitas e nem a efeitos teratogênicos.^{15–17} Além disso, a rosuvastatina já foi utilizada como fármaco marcador em gestantes saudáveis, em dose única oral de 5 mg, em estudo anterior do nosso grupo de pesquisa.¹⁸ Já a metformina é apontada como um bom fármaco marcador de OCT2,^{12,14} sendo considerada segura

para uso durante a gravidez, visto que já é empregada no controle, por exemplo, de pacientes com diabetes gestacional;^{19,20} assim como já foi utilizada em estudos com gestantes acima do peso e sem outras comorbidades, sem problemas.²¹ Coquetéis utilizando os fármacos marcadores metformina e rosuvastatina já são utilizados e validados para uso como ferramentas sensíveis e específicas para a avaliação dos transportadores.²²⁻²⁴

No que se refere aos biomarcadores endógenos, o Consórcio Internacional de Transportadores, grupo formado por cientistas especializados em transporte de fármacos, divulgou em 2018²⁵ uma perspectiva de substratos endógenos cuja disponibilização pode ser mediada por transportadores, correlacionando sua concentração com a modulação do transportador. Isso impulsionou as pesquisas nessa busca de candidatos a biomarcadores endógenos, que dispensam o uso de um fármaco marcador e possibilitam a avaliação diretamente em estudos com seres humanos, sem testes prévios *in vitro* ou em animais. Com isso, seria possível prever ou validar a atuação de enzimas e transportadores frente aos fármacos.^{7,25-27} A coproporfirina I (CP-I) está sendo investigada em homens e mulheres não-grávidas como candidata a biomarcador endógeno para OATP1B1.²⁸⁻³⁰ Utilizar a razão metabólica entre a concentração plasmática dos componentes endógenos cortisol (COR) e 6 β -hidroxicortisol (6 β -OHCOR) (6 β -OHCOR:COR) é um método menos invasivo para avaliar a atividade de CYP3A.³¹

Além da alteração da ação das enzimas metabolizadoras e dos transportadores de membrana devido às mudanças rotineiras durante a gravidez, sua atividade também pode sofrer influência de várias doenças. As citocinas produzidas durante processos inflamatórios – como interferon gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucinas (IL) 6 e 8 (IL-6 e IL-8) e proteína C reativa –, por exemplo, podem alterar a expressão dos transportadores, afetando os parâmetros farmacocinéticos dos medicamentos, e, conseqüentemente, sua eficácia e/ou sua toxicidade. Por isso, suas dosagens são demandadas nos estudos referentes aos transportadores.^{7,32,33} Desse modo, considerando que a ocorrência de infecções é evento relativamente habitual no período gestacional, sendo as infecções do trato urinário (ITU) as mais frequentes,³⁴ é necessário investigar o papel dessas doenças na atividade dos transportadores em gestantes.

Devido às alterações anatômicas e fisiológicas causadas pela gestação, a predisposição para o desenvolvimento de pielonefrite nesse período aumenta,³⁵ na maioria das vezes como evolução da bacteriúria assintomática não tratada (em cerca de 30% desses casos).³⁶ Como essa doença apresenta um evidente componente inflamatório,³⁷ cujos mediadores podem modular a atividade dos transportadores,³² a pielonefrite representa um bom modelo para a investigação da influência de uma infecção sobre os transportadores.

A pielonefrite lidera a lista de formas graves de ITU que ocorrem na gravidez, associando-se a elevadas taxas de hospitalizações de origem não obstétrica e a prognósticos maternos e perinatais desfavoráveis, sendo também uma das principais causas de sepse materna.^{37,38}

De acordo com o protocolo adotado pelo Setor de Gestação de Alto Risco do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRPUSP),³⁹ o tratamento para pielonefrite consiste na antibioticoterapia endovenosa com uso preferencial de cefalosporinas de segunda ou terceira gerações: cefuroxima (750 mg de 8 em 8 horas) ou ceftriaxona (1 g de 12 em 12 horas). A cefuroxima tem como vantagens a segurança para uso durante toda a gestação e o período de amamentação, assim como elevada taxa de sensibilidade de *Escherichia coli* (o principal microrganismo causador dessa ITU em gestantes). Além destas prerrogativas, a possibilidade de ser transicionada para a via oral após melhora clínica embasa a escolha deste medicamento para o tratamento da pielonefrite em gestantes. A ceftriaxona, apesar de também ser segura e apresentar um bom espectro de ação contra os germes Gram-negativos (entre eles a *Escherichia coli*), não tem a formulação via oral para transicionar após a melhora clínica.^{39,40}

Estudos relacionando a atividade das enzimas metabolizadoras e dos transportadores na gestação são raros, demandando imperiosa necessidade de pesquisas relacionadas a este tema.³² Isso acontece em razão de gestantes serem consideradas “órfãs terapêuticas”, devido à exclusão dessas pacientes da maioria dos estudos envolvendo pesquisa e desenvolvimento de fármacos (participaram de menos de 0,5% dos estudos), considerando que as barreiras éticas, legais e logísticas são maiores nesse grupo especial. Desse modo, a extrapolação de doses baseadas em estudos com populações de mulheres não-grávidas e homens transforma-se na regra, visto que mais de 90% dos fármacos aprovados para uso clínico não apresentam especificações para gestantes.^{1,6} Com isso, na maioria desses casos, são prescritos medicamentos sem dosagem específica e carentes de informações detalhadas sobre eficácia e segurança para gestantes e fetos, fato ainda mais preocupante ao considerar que cerca de 90% das pacientes usam ao menos uma medicação durante a gravidez.^{41,42}

A investigação da alteração da função de diversas enzimas metabolizadoras e transportadores relacionados a contextos distintos tem sido feita por nosso grupo de pesquisa, envolvendo trabalhos em andamentos ou mesmo já publicados.^{18,43–46}

Desse modo, a presente pesquisa justifica-se pela necessidade de elucidar como a pielonefrite modula a atividade de enzimas e de transportadores de membrana em gestantes, possibilitando melhor embasamento futuro para a utilização de fármacos com mais segurança nessa população especial e para poder auxiliar na previsão da exposição fetal a fármacos. Além disso, a investigação dos possíveis biomarcadores endógenos CP-I (para a atividade de OATP1B1) e da razão metabólica 6β-OHCOR:COR no plasma (para a atividade de CYP3A) poderá contribuir no entendimento da

atuação desse transportador e dessa enzima em diversos âmbitos sem o uso de fármacos marcadores, o que significaria também uma expressiva contribuição neste campo do conhecimento.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo primário

Avaliar a influência da pielonefrite na atividade dos transportadores OATP1B1 e OCT2 durante o segundo e o terceiro trimestres de gravidez (empregando rosuvastatina e metformina como fármacos marcadores).

2.2 Objetivos secundários

a) Comparar as atividades de OATP1B1 e OCT2 em gestantes com pielonefrite antes e após o tratamento de pielonefrite com cefuroxima ou ceftriaxona, empregando, respectivamente, os fármacos marcadores rosuvastatina e metformina;

b) Avaliar as concentrações plasmáticas das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-8 e da proteína C reativa nas gestantes com diagnóstico de pielonefrite antes e após o tratamento com o antibiótico;

c) Desenvolver e validar o método de determinação do biomarcador endógeno CP-I em plasma, empregando cromatografia líquida de ultra eficiência com detecção por espectrometria de massas (UPLC-MS/MS);

d) Investigar se os valores de área sob a curva (AUC) da rosuvastatina em gestantes com pielonefrite antes e após o tratamento com cefuroxima ou ceftriaxona apresentam a mesma tendência que os valores das concentrações do biomarcador endógeno CP-I em plasma.

e) Desenvolver e validar o método de determinação dos biomarcadores endógenos cortisol (COR) e 6 β -hidroxicortisol (6 β -OHCOR) em plasma, empregando UPLC-MS/MS;

f) Avaliar a razão metabólica 6 β -OHCOR:COR no plasma como biomarcador endógeno para a atividade da enzima citocromo P450 isoforma 3A (CYP3A).

3 MÉTODOS

3.1 Desenho de estudo

Estudo observacional, longitudinal e prospectivo.⁴⁷

3.2 Aspectos éticos

Conforme Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, sobre pesquisa envolvendo seres humanos, este projeto foi analisado e aprovado pela Comissão de Pesquisa do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP) – Protocolo nº 806, pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HC-FMRPUSP – Parecer nº 6.045.166, e pelo CEP da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP) – Parecer nº 6.439.081. Além disso, o projeto será estendido para recrutamento de participantes no Serviço de Ginecologia e Obstetrícia da Irmandade da Santa Casa da Misericórdia de São Carlos (ISCSCar), para a qual está sendo submetida para análise do CEP desta instituição.

As participantes recebem explicação detalhada sobre a proposta do estudo, sua duração, os procedimentos e possíveis riscos envolvidos, sendo incluídas no estudo somente após a concordância e a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), em duas vias, as quais ficarão com uma via do documento. É garantida a liberdade das participantes de recusarem a participar ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização ou prejuízo de seu atendimento e/ou tratamento. Caso haja intercorrências, como aparecimento de efeitos adversos, será garantido o afastamento da paciente da pesquisa, sem prejuízo de seu tratamento.

3.3 Participantes

Como critérios de elegibilidade, estão sendo investigadas gestantes diagnosticadas com pielonefrite que estejam no segundo ou terceiro trimestres de gravidez, com indicação de tratamento com antibióticos endovenosos, conforme protocolo clínico do HC-FMRPUSP³⁹ (cefuroxima 750 mg de 8/8h ou ceftriaxona 1 g de 12/12h), atendidas na Divisão de Obstetrícia do HC-FMRPUSP (no Centro Obstétrico [CO], na enfermaria do 3º andar ou no Ambulatório de Moléstias Infectocontagiosas em Ginecologia e Obstetrícia [AMIGO] do HC-FMRPUSP) e no Serviço de Ginecologia e Obstetrícia da ISCSCar.

Como critérios de exclusão, são desconsideradas as gestantes que apresentarem pelo menos uma das seguintes doenças: insuficiência renal crônica, síndromes hipertensivas (hipertensão arterial crônica e/ou pré-eclâmpsia), sofrimento fetal crônico e lúpus eritematoso sistêmico. As gestantes também serão excluídas do protocolo ao utilizarem fármacos inibidores/indutores dos transportadores em questão, que possam interagir com os medicamentos utilizados: probenecida, verapamil, trimetopim, amiodarona, claritromicina, cobicistate, ciclosporina, dronedarona, eritromicina, itraconazol, cetoconazol, lapatinibe, lopinavir, ritonavir, quinidina, ranolazina, saquinavir, ritonavir,

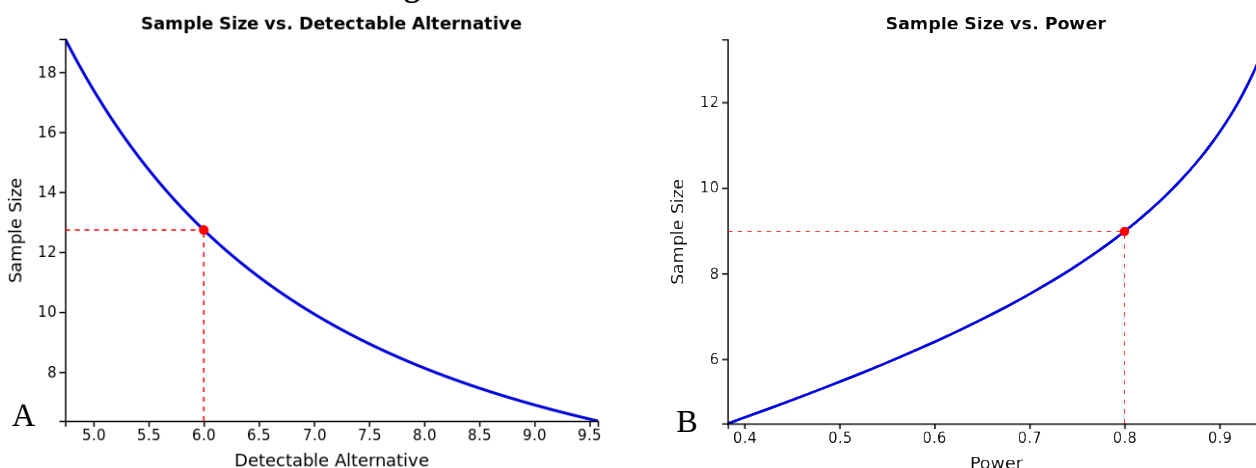
verapamil, atazanavir, gemfibrozila, rifampicina, cimetidina, dolutegravir, isavuconazol, pirimetamina, trilaciclib, vandetanibe, dabigatрана, digoxina, edoxabana, atorvastatina, bosentana, docetaxel, elagolix, glecaprevir, gliburida, grazoprevir, letermovir, paclitaxel, pitavastatina, pravastatina, repaglinida, ácido sinvastatina.^{12,48-50}

Como critérios de descontinuidade, estão a decisão da participante em retirar o consentimento a qualquer momento da sua participação no estudo; e participantes que, eventualmente, necessitem de tratamento baseado nos fármacos utilizados como marcadores.

3.4 Tamanho amostral

O cálculo do tamanho amostral para o estudo foi obtido por meio do programa *Power and Sample Size Calculation*, versão 2.1.30,⁵¹ considerando nível de significância de 5% e poder do teste de 80%. A nossa hipótese de trabalho é a de que as grávidas com pielonefrite no segundo ou terceiro trimestres da gestação apresentarão valores de área sob a curva (AUC) da rosuvastatina pelo menos 30% maiores em relação ao período pós-tratamento, baseando-se em diferença similar observada em estudos realizados anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa com outros transportadores de membrana. Considerando os valores de AUC (média e desvio padrão) para a rosuvastatina relatados por Moreira et al.¹⁸ para grávidas no terceiro trimestre que vivem com HIV ($22,2 \pm 7,75$ ng.h/mL), será necessário incluir 13 grávidas com pielonefrite (Figura 1A). A segunda hipótese é de que as grávidas com pielonefrite no segundo terceiro trimestre da gestação apresentarão valores de AUC de metformina pelo menos 30% maiores em relação ao período pós-tratamento. Considerando os valores de AUC (média e desvio padrão) para a metformina relatados por Garza-Ocañas et al.⁵² para voluntários sadios ($7133,1 \pm 2002,87$ ng.h/mL), será necessário incluir 9 grávidas diagnosticadas com pielonefrite (Figura 1B). Logo, serão recrutadas 13 participantes.

Figura 1 - Estudo do tamanho amostral.



3.5 Protocolo clínico

O protocolo clínico para as gestantes com pielonefrite com indicação de tratamento com antibióticos endovenosos é dividido nas **fases I e II**, nas quais cada paciente será comparada consigo mesma em dois momentos (antes e após o tratamento), sendo o próprio controle:

- **Fase I:** As gestantes diagnosticadas com pielonefrite são recrutadas diretamente no CO-HC-FMRPUSP, onde as pacientes já estão internadas (ou em outras áreas da Divisão de Obstetrícia do HC-FMRPUSP, como o AMIGO ou a enfermaria do 3º andar, as quais são posteriormente internadas no CO), assim como no Setor de Ginecologia e Obstetrícia da ISCSCar, onde ocorre a realização da fase I. No início do tratamento com o antibiótico, as pacientes são avaliadas por exames clínicos e por testes laboratoriais – ureia, creatinina, alanino aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), bilirrubinas, fosfatase alcalina, gama-GT, glicemia, proteínas totais, albumina, α 1 glicoproteína ácida, proteína C reativa, lipidograma e hemograma. Esses exames bioquímicos e hematológicos são realizados rotineiramente de acordo com o protocolo assistencial do setor, e tais dados serão acessados posteriormente (via prontuário eletrônico). Além disso, são coletados 8 mL de sangue, em tubos contendo EDTA, para a análise das citocinas plasmáticas INF- γ , TNF- α , IL-6 e IL-8 e para a análise do genótipo. Após a infusão da primeira dose do antibiótico (cefuroxima 750 mg de 8/8h ou ceftriaxona 1 g de 12/12h), as gestantes recebem dose única oral de rosuvastatina (5 mg) e de metformina (50 mg). Amostras seriadas de sangue (volumes aproximados de 6 mL) são colhidas por meio de punção venosa com escalpe em tubos contendo heparina (Liquemine® 5000 UI, Roche) nos tempos 0; 0,5; 1; 2; 4; 6; 10; 12; 16 e 24 h. Logo após cada ponto de coleta, as amostras são centrifugadas a 3500 rpm por 10 minutos a 4 °C. As alíquotas de plasma são separadas e, em seguida, armazenadas no Laboratório de Farmacocinética Clínica (PKCLIN) da FCFRP-USP, permanecendo no biorrepositório a -80 °C até a análise. Conforme o protocolo do Setor de Moléstias Infectocontagiosas em Ginecologia e Obstetrícia do HC-FMRPUSP e do Setor de Ginecologia e Obstetrícia da ISCSCar, após o tratamento antimicrobiano, e ao apresentar melhora do quadro infeccioso (febre, dor lombar, entre outros sintomas), as gestantes recebem alta hospitalar e continuam o tratamento com antibióticos via oral durante 10-14 dias, de acordo com o protocolo clínico.³⁹

- **Fase II:** Após o término do tratamento com os antibióticos orais, as gestantes são convidadas a retornarem para nova internação de 24 h, dessa vez na Unidade de Pesquisa

Clínica (UPC) do HC-FMRPUSP, e no Setor de Ginecologia e Obstetrícia da ISCSCar. São coletados cerca de 5 mL de sangue para a realização dos exames bioquímicos e hematológicos e dosagem das citocinas plasmáticas. Em seguida, são administrados os fármacos marcadores e realizadas as coletas de amostras de sangue seriadas, conforme protocolo descrito na Fase I.

3.6 Determinação dos fármacos e biomarcadores

As análises serão realizadas no PKCLIN da FCFRP-USP, sob responsabilidade da Prof.^a Dr.^a Vera Lucia Lanchote (coorientadora do projeto de pesquisa).

Os fármacos marcadores (rosuvastatina e metformina) e os biomarcadores endógenos (CP-I, COR e 6 β -OHCOR) serão analisados em amostras de plasma empregando cromatografia líquida de ultra eficiência com detecção por espectrometria de massas (UPLC-MS/MS). A rosuvastatina será analisada de acordo com o protocolo desenvolvido e validado em estudo publicado por Moreira et al.¹⁸ Para a metformina, o protocolo de análise está sendo desenvolvido e validado por outra pesquisa do nosso grupo de estudo. Com relação aos analitos CP-I, COR e 6 β -OHCOR e padrões internos, serão resolvidos na coluna de fase reversa Acquity BEH C18 column (50 mm x 2,1 mm, tamanho de partícula 1,7 μ m, Waters Corp., Milford, EUA) e detectados pelo espectrômetro de massas XEVO TQS triplo quadrupolo (Waters Corp., Milford, EUA) com interface de eletronebulização. Será empregada a metodologia de análise MRM (Monitoramento de Reações Múltiplas).

Previamente à quantificação dos analitos CP-I, COR e 6 β -OHCOR em plasma, o método de análise será validado de acordo com as exigências vigentes da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), RDC n° 27 de 17 de maio de 2012, para análise de fármacos em matrizes complexas. Os parâmetros avaliados serão linearidade, limite inferior de quantificação, efeito residual, efeito de matriz, precisão e exatidão e estabilidade das soluções padrão e das amostras com os analitos CP-I, COR e 6 β -OHCOR em plasma em temperatura ambiente (curta duração), após ciclos de congelamento e descongelamento, pós-processamento e quanto ao período de armazenamento em freezer (longa duração).

3.7 Análise farmacocinética

Os parâmetros farmacocinéticos serão calculados com base nas concentrações plasmáticas obtidas experimentalmente por meio do software *Phoenix WinNonlin*, versão 8.1.0 (Pharsight Corporation, CA). As AUCs dos fármacos e dos biomarcadores serão calculadas pelo método linear trapezoidal do tempo zero até a última amostra coletada e extrapolada para o infinito dividindo-se a

última concentração quantificada pela constante da velocidade de eliminação (k_{el}). O clearance total (Cl/F) será obtido através da equação $Cl/F = Dose/AUC_{0-\infty}$.

3.8 Análise do genótipo

O DNA genômico será extraído de uma amostra de sangue total periférico (1 mL) coletada com EDTA, empregando o QIAamp DNA Blood Midi Kit (QIAGEN, Hombrechtikon, Suíça), de acordo com as instruções do fabricante. O ensaio de discriminação alélica (TaqMan® Real-Time PCR Assays, Applied Biosystems™, Foster City, CA, EUA) para a identificação dos polimorfismos (*single nucleotide polymorphism* - SNP) do gene SLCO1B1 c.388A>G (rs2306283, p.N130D), c.463C>A (rs11045819, p.P155T), c.521T>C e c.1929A>C (rs34671512, p.L643F) será realizado utilizando o termociclador Roche LightCycler 480 (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha), mensurando a fluorescência final emitida da clivagem na sonda específica para o alelo (Endpoint Genotyping Analysis). Serão analisados os haplótipos SLCO1B1*1 (c.388A-c.463C-c.521T- c.1929A, previamente conhecido como *1A) e *15 (c.388G-c.463C-c.521C- c.1929A). O alelo *15 é de função diminuída enquanto o alelo *1 é de função normal.²⁹

3.9 Métodos estatísticos

As análises estatísticas estão sendo realizadas com auxílio do software R, versão 1.2 (R Foundation for Statistical Computing, Viena, Áustria), para obtenção da média, mediana, erro padrão da média e intervalo de confiança 95% (IC 95%). A disposição cinética dos fármacos marcadores será avaliada entre as fases (antes e após o tratamento) através do teste t de Student, e, caso os pressupostos dos testes não sejam atendidos, será aplicado um teste não paramétrico de Wilcoxon para amostras pareadas. A relação entre o clearance renal da rosuvastatina com o biomarcador CP-I será avaliada pelo coeficiente de Pearson.

Todos os testes estatísticos terão o nível de significância fixado em 5%.

3.10 Gestão de dados

Os dados gerados no projeto serão: dados clínicos das participantes; resultados de exames bioquímicos e hematológicos; quantificações da rosuvastatina, metformina, CP-I, COR, 6β-OHCOR e citocinas inflamatórias; genótipo.

O armazenamento e o gerenciamento dos dados serão realizados usando a ferramenta eletrônica de captura de dados *Research Electronic Data Capture* (REDCap),^{55,56} que é uma plataforma de *software* segura e baseada na Web, hospedada em <https://redcap.fmrp.usp.br/>.

Apesar do armazenamento e do uso dos dados na pesquisa obedecerem a todas as normas legais e éticas, contudo, não é possível excluir a possibilidade de haver riscos mínimos de vazamento de dados, sendo que os pesquisadores responsáveis tomarão todos os cuidados necessários para evitá-los, incluindo a anonimização. O acesso ilimitado aos dados pré-anonimização será de responsabilidade dos pesquisadores Ana Cláudia Rabelo e Silva e Geraldo Duarte. Após a exportação dos dados para análise, as informações serão anonimizadas, não permitindo a identificação e/ou a rastreabilidade da participante, e os pesquisadores que terão acesso ilimitado aos dados anonimizados são: Ana Cláudia Rabelo e Silva, Geraldo Duarte, Vera Lucia Lanchote e João Paulo Bianchi Ximenez.

Os dados ficarão armazenados no REDCap até a realização de todas análises e publicação dos dados. Após este período, serão disponibilizados no repositório de dados científicos da USP, com acesso restrito à sua comunidade, que pode ser acessado no link <https://uspdigital.usp.br/repositorio/>.

4 REFERÊNCIAS

1. Kasma JM, van den Anker J, Allegaert K, Dallmann A, Ahmadzia HK. Anatomical and physiological alterations of pregnancy. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*. 2020;47(4):271-285. doi:10.1007/s10928-020-09677-1
2. Pinheiro EA, Stika CS. Drugs in pregnancy: Pharmacologic and physiologic changes that affect clinical care. *Semin Perinatol*. 2020;44(3):151221. doi:10.1016/J.SEMPERI.2020.151221
3. Eke AC. An update on the physiologic changes during pregnancy and their impact on drug pharmacokinetics and pharmacogenomics. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 2022;33(5):581. doi:10.1515/JBCPP-2021-0312
4. Costantine MM. Physiologic and pharmacokinetic changes in pregnancy. *Front Pharmacol*. 2014;5 APR:65. doi:10.3389/FPHAR.2014.00065/BIBTEX
5. Koren G, Pariente G. Pregnancy- Associated Changes in Pharmacokinetics and their Clinical Implications. *Pharm Res*. 2018;35(3):1-7. doi:10.1007/S11095-018-2352-2/TABLES/5
6. Ren Z, Bremer AA, Pawlyk AC. Drug development research in pregnant and lactating women. *Am J Obstet Gynecol*. 2021;225(1):33-42. doi:10.1016/j.ajog.2021.04.227
7. Brouwer KLR, Evers R, Hayden E, et al. Regulation of Drug Transport Proteins—From Mechanisms to Clinical Impact: A White Paper on Behalf of the International Transporter Consortium. *Clin Pharmacol Ther*. 2022;112(3):461-484. doi:10.1002/cpt.2605
8. Lee J, Beers JL, Geffert RM, Jackson KD. A Review of CYP-Mediated Drug Interactions: Mechanisms and In Vitro Drug-Drug Interaction Assessment. *Biomolecules*. 2024;14(1):99. doi:10.3390/biom14010099

9. Zhao M, Ma J, Li M, et al. Cytochrome P450 Enzymes and Drug Metabolism in Humans. *Int J Mol Sci.* 2021;22(23). doi:10.3390/IJMS222312808
10. Roberts AG. The structure and mechanism of drug transporters. *Methods Mol Biol.* 2021;2342:193-234. doi:10.1007/978-1-0716-1554-6_8
11. Yamashita M, Markert UR. Overview of drug transporters in human placenta. *Int J Mol Sci.* 2021;22(23):13149. doi:10.3390/ijms222313149
12. Liu X, Pan G. *Drug Transporters in Drug Disposition, Effects and Toxicity.* Vol 1141. (Liu X, Pan G, eds.). Springer Singapore; 2019. doi:10.1007/978-981-13-7647-4
13. Galetin A, Brouwer KLR, Tweedie D, et al. Membrane transporters in drug development and as determinants of precision medicine. *Nat Rev Drug Discov.* 2024;23(4):255-280. doi:10.1038/s41573-023-00877-1
14. Li Y, Talebi Z, Chen X, Sparreboom A, Hu S. Endogenous Biomarkers for SLC Transporter-Mediated Drug-Drug Interaction Evaluation. *Molecules.* 2021;26(18). doi:10.3390/MOLECULES26185500
15. Chang JC, Chen YJ, Chen IC, Lin WS, Chen YM, Lin CH. Perinatal Outcomes After Statin Exposure During Pregnancy. *JAMA Netw Open.* 2021;4(12):e2141321. doi:10.1001/jamanetworkopen.2021.41321
16. Bateman BT, Hernandez-Diaz S, Fischer MA, et al. Statins and congenital malformations: cohort study. *BMJ.* 2015;350:h1035. doi:10.1136/bmj.h1035
17. Aschenbrenner DS. Statins No Longer Contraindicated in Pregnancy. *AJN, American Journal of Nursing.* 2021;121(11):22-22. doi:10.1097/01.NAJ.0000798992.09378.14
18. Moreira F de L, Melli PP dos S, Marques MP, et al. P-Glycoprotein and Organic Anion Transporter Polypeptide 1B/Breast Cancer Resistance Protein Drug Transporter Activity in Pregnant Women Living With HIV. *The Journal of Clinical Pharmacology.* 2023;63(2):219-227. doi:10.1002/jcph.2152
19. Jorquera G, Echiburú B, Crisosto N, Sotomayor-Zárate R, Maliqueo M, Cruz G. Metformin during Pregnancy: Effects on Offspring Development and Metabolic Function. *Front Pharmacol.* 2020;11:653. doi:10.3389/FPHAR.2020.00653/BIBTEX
20. Espnes KA, Hønnås A, Løvvik TS, et al. Metformin serum concentrations during pregnancy and post partum - A clinical study in patients with polycystic ovary syndrome. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2022;130(3):415-422. doi:10.1111/BCPT.13703
21. Esmaili S, Rasuoli J, Vazifekhah S. Efficacy of Metformin on Pregnancy Outcome in Healthy Overweight Pregnant Women; A Double-Blinded Parallel Randomized Clinical Trial. *Int J Pediatr.* 2021;9. doi:10.22038/IJP.2021.55022.4341

22. Stopfer P, Giessmann T, Hohl K, et al. Optimization of a drug transporter probe cocktail: potential screening tool for transporter-mediated drug–drug interactions. *Br J Clin Pharmacol*. 2018;84(9):1941-1949. doi:10.1111/BCP.13609
23. Wiebe ST, Giessmann T, Hohl K, et al. Validation of a Drug Transporter Probe Cocktail Using the Prototypical Inhibitors Rifampin, Probenecid, Verapamil, and Cimetidine. *Clin Pharmacokinet*. 2020;59(12):1627. doi:10.1007/S40262-020-00907-W
24. Dunvald AD, Iversen DB, Svendsen ALO, et al. Tutorial: Statistical analysis and reporting of clinical pharmacokinetic studies. *Clin Transl Sci*. 2022;15(8):1856-1866. doi:10.1111/cts.13305
25. Chu X, Liao M, Shen H, et al. Clinical Probes and Endogenous Biomarkers as Substrates for Transporter Drug-Drug Interaction Evaluation: Perspectives From the International Transporter Consortium. *Clin Pharmacol Ther*. 2018;104(5):836-864. doi:10.1002/cpt.1216
26. Giacomini KM, Yee SW, Koleske ML, et al. New and Emerging Research on Solute Carrier and ATP Binding Cassette Transporters in Drug Discovery and Development: Outlook From the International Transporter Consortium. *Clin Pharmacol Ther*. 2022;112(3):540-561. doi:10.1002/CPT.2627
27. Giacomini KM, Huang SM. More Than Pharmacokinetics: Transporters in Clinical Pharmacology. *Clin Pharmacol Ther*. 2022;112(3):423-426. doi:10.1002/cpt.2710
28. Kalluri H V, Kikuchi R, Coppola S, et al. Coproporphyrin I Can Serve as an Endogenous Biomarker for OATP1B1 Inhibition: Assessment Using a Glecaprevir/Pibrentasvir Clinical Study. *Clin Transl Sci*. 2021;14(1):373-381. doi:10.1111/cts.12888
29. Neuvonen M, Tornio A, Hirvensalo P, Backman JT, Niemi M. Performance of Plasma Coproporphyrin I and III as OATP1B1 Biomarkers in Humans. *Clin Pharmacol Ther*. 2021;110(6):1622-1632. doi:10.1002/CPT.2429
30. Takita H, Scotcher D, Chu X, Yee KL, Ogungbenro K, Galetin A. Coproporphyrin I as an endogenous biomarker to detect reduced <scp>OATP1B</scp> activity and shift in elimination route in Chronic Kidney Disease. *Clin Pharmacol Ther*. 2022;112(3):615-626. doi:10.1002/cpt.2672
31. Hirano R, Yokokawa A, Furihata T, Shibasaki H. Plasma 6 β -hydroxycortisol to cortisol ratio as a less invasive cytochrome P450 3A phenotyping method. *Br J Clin Pharmacol*. 2024;90(4):1016-1026. doi:10.1111/bcp.15987
32. Evers R, Piquette-Miller M, Polli JW, 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. *Clin Pharmacol Ther.* 2018;104(5):900. doi:10.1002/CPT.1115
33. Atilano-Roque A, Roda G, Fogueri U, Kiser JJ, Joy MS. Effect of Disease Pathologies on Transporter Expression and Function. *The Journal of Clinical Pharmacology.* 2016;56(S7):S205-S221. doi:10.1002/jcph.768
34. Ansaldi Y, Martinez de Tejada Weber B. Urinary tract infections in pregnancy. *Clinical Microbiology and Infection.* 2022;Publish Ah. doi:10.1016/j.cmi.2022.08.015
35. DeYoung TH, Whittington JR, Ennen CS, Poole AT. Pyelonephritis in Pregnancy: Relationship of Fever and Maternal Morbidity. *American Journal of Perinatology Reports.* 2019;09(04):e366-e371. doi:10.1055/s-0039-1695746
36. Hudson RE, Job KM, Sayre CL, Krepkova L V., Sherwin CM, Enioutina EY. Examination of Complementary Medicine for Treating Urinary Tract Infections Among Pregnant Women and Children. *Front Pharmacol.* 2022;13. doi:10.3389/fphar.2022.883216
37. Umeh CC, Okobi OE, Olawoye OI, Agu C, Koko J, Okoeguale J. Pyelonephritis in pregnancy from the lens of an underserved community. *Cureus.* 2022;14(9):e29029. doi:10.7759/cureus.29029
38. Duarte G, Marcolin AC, Quintana SM, Cavalli RC. Infecção urinária na gravidez. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia.* 2008;30(2):93-100. doi:10.1590/S0100-72032008000200008
39. Duarte G. Infecção urinária e gravidez. In: *Diagnóstico e Conduta Nas Infecções Ginecológicas e Obstétricas.* 2nd ed. FUNPEC; 2004:169-177.
40. Corrales M, Corrales-Acosta E, Corrales-Riveros JG. Which Antibiotic for Urinary Tract Infections in Pregnancy? A Literature Review of International Guidelines. *J Clin Med.* 2022;11(23):7226. doi:10.3390/jcm11237226
41. Fashe MM, Fallon JK, Miner TA, Tiley JB, Smith PC, Lee CR. Impact of pregnancy related hormones on drug metabolizing enzyme and transport protein concentrations in human hepatocytes. *Front Pharmacol.* 2022;13. doi:10.3389/fphar.2022.1004010
42. Moreira F de L, Benzi JR de L, Pinto L, Thomaz M de L, Duarte G, Lanchote VL. Optimizing Therapeutic Drug Monitoring in Pregnant Women: a Critical Literature Review. *Ther Drug Monit.* 2022;Publish Ah. doi:10.1097/FTD.0000000000001039
43. Cestari RN, Oliveira RDR, Souza FFL, et al. Systemic Lupus Erythematosus Activity Affects the Sinusoidal Uptake Transporter OATP1B1 Evaluated by the Pharmacokinetics of Atorvastatin. *Clin Transl Sci.* 2020;13(6):1227-1235. doi:10.1111/cts.12808

44. Coelho EB, Cusinato DAC, Ximenez JP, Lanchote VL, Struchiner CJ, Suarez-Kurtz G. Limited Sampling Modeling for Estimation of Phenotypic Metrics for CYP Enzymes and the ABCB1 Transporter Using a Cocktail Approach. *Front Pharmacol.* 2020;11:1. doi:10.3389/FPHAR.2020.00022/FULL
45. Caris JA, Benzi JR de L, de Souza FFL, de Oliveira RDR, Donadi EA, Lanchote VL. Rheumatoid arthritis downregulates the drug transporter OATP1B1: Fluvastatin as a probe. *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2020;146:105264. doi:10.1016/j.ejps.2020.105264
46. Benzi JR de L, Moreira F de L, Marques MP, Duarte G, Suarez-Kurtz G, Lanchote VL. A background subtraction approach for determination of endogenous cortisol and 6 β -hydroxycortisol in urine by UPLC-MS/MS with application in a within-day variability study in HIV-infected pregnant women. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2020;1144. doi:10.1016/j.jchromb.2020.122074
47. Park E. Analysis of longitudinal data in case-control studies. *Biometrika.* 2004;91(2):321-330. doi:10.1093/biomet/91.2.321
48. Hanke N, Gómez-Mantilla JD, Ishiguro N, Stopfer P, Nock V. Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling of Rosuvastatin to Predict Transporter-Mediated Drug-Drug Interactions. *Pharm Res.* 2021;38(10):1645-1661. doi:10.1007/s11095-021-03109-6
49. Iversen DB, Andersen NE, Dalgård Dunvald AC, Pottegård A, Stage TB. Drug metabolism and drug transport of the 100 most prescribed oral drugs. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2022;131(5):311-324. doi:10.1111/BCPT.13780
50. U.S. Food and Drug Administration (FDA). Drug Development and Drug Interactions: Table of Substrates, Inhibitors and Inducers | FDA. Published 2022. Accessed December 19, 2022. <https://www.fda.gov/drugs/drug-interactions-labeling/drug-development-and-drug-interactions-table-substrates-inhibitors-and-inducers>
51. Dupont WD, Plummer WD. PS power and sample size program available for free on the internet. *Control Clin Trials.* 1997;18(3):274. doi:10.1016/S0197-2456(97)00074-3
52. Garza-Ocañas L, González-Canudas J, Tamez-de la O E, et al. Comparative Bioavailability of Metformin Hydrochloride Oral Solution Versus Metformin Hydrochloride Tablets in Fasting Mexican Healthy Volunteers. *Adv Ther.* 2019;36(2):407-415. doi:10.1007/S12325-018-0853-3
53. Benzi JR de L, Moreira F de L, Marques MP, Duarte G, Suarez-Kurtz G, Lanchote VL. A background subtraction approach for determination of endogenous cortisol and 6 β -hydroxycortisol in urine by UPLC-MS/MS with application in a within-day variability study in

- HIV-infected pregnant women. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2020;1144. doi:10.1016/j.jchromb.2020.122074
54. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 27, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. Diário Oficial da União, Poder Executivo. Brasília, DF, 2012. https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0027_17_05_2012.html
55. Harris PA, Taylor R, Minor BL, et al. The REDCap consortium: Building an international community of software platform partners. *J Biomed Inform.* 2019;95:103208. doi:10.1016/J.JBI.2019.103208
56. Harris PA, Taylor R, Thielke R, Payne J, Gonzalez N, Conde JG. Research electronic data capture (REDCap)—A metadata-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support. *J Biomed Inform.* 2009;42(2):377-381. doi:10.1016/J.JBI.2008.08.010
57. Hirano R, Yokokawa A, Furuta T, Shibasaki H. Sensitive and simultaneous quantitation of 6 β -hydroxycortisol and cortisol in human plasma by LC-MS/MS coupled with stable isotope dilution method. *Journal of Mass Spectrometry.* 2018;53(8):665-674. doi:10.1002/jms.4200
58. Sun LN, Shen Y, Yang YQ, et al. Simultaneous Determination of Cortisol and 6 β -Hydroxycortisol in Human Plasma by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J Chromatogr Sci.* 2023;61(2):130-139. doi:10.1093/chromsci/bmac038

5 CRONOGRAMA

		Etapas			
		1	2	3	4
Trimestre	2023-1	X			
	2023-2	X	X		
	2023-3		X		
	2023-4		X		
	2024-1		X		
	2024-2		X	X	
	2024-3		X	X	
	2024-4		X	X	X
	2025-1				X

Descrição das etapas:

1 = Análise e aprovação do projeto pelo Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da FMRP-USP, pela UPC e pelo CEP do HC-FMRPUSP.

2 = Coleta de dados (após aprovação no CEP)

3 = Análise dos dados

4 = Redação e divulgação dos resultados

6 ORÇAMENTO

Tabela 1 - Exames bioquímicos e hematológicos realizados no HC-FMRPUSP para as 13 participantes grávidas diagnosticadas com pielonefrite após o tratamento com antibiótico (Fase 2).

Item	Qtde.	Exames bioquímicos e hematológicos	Preço unitário (R\$)	Preço total (R\$)
01	13	Ureia	8,40	109,20
02	13	Creatinina	8,40	109,20
03	13	Alanino aminotransferase (ALT)	8,40	109,20
04	13	Aspartato aminotransferase (AST)	8,40	109,20
05	13	Bilirrubinas	9,00	117,00
06	13	Fosfatase alcalina	10,80	140,40
07	13	Gama-GT	12,00	156,00
08	13	Glicemia	8,40	109,20
09	13	Proteínas totais	9,00	117,00
10	13	Albumina	9,00	117,00
11	13	$\alpha 1$ glicoproteína ácida	24,00	312,00
12	13	Proteína C Reativa (PCR)	26,80	348,40
13	13	Lipidograma	42,00	546,00
14	13	Hemograma	19,00	247,00
Total:				2.646,80

Tabela 2 - Materiais necessários para a análise de citocinas em plasma para as 13 participantes grávidas diagnosticadas com pielonefrite antes (Fase 1) e após o tratamento com antibiótico (Fase 2), totalizando 26 amostras.

Item	Qtde.	Análise de citocinas (INF- γ , TNF- α , IL-6, IL-8 em plasma)	Preço unitário (US\$)	Preço total (R\$)*
15	1	Kit para análises das citocinas inflamatórias	2240,00	11.603,20
Total:				11.603,20

*Relativo à cotação do dólar registrada em 23/01/2023 = R\$5,18

Tabela 3 - Materiais necessários para a análise do genótipo para as 13 participantes grávidas diagnosticadas com pielonefrite antes do tratamento com antibiótico (Fase 1).

Item	Qtde.	Análise do genótipo	Preço unitário (R\$)	Preço total (R\$)
16	13	Análise do genótipo	360,00	4.680,00
Total:				4.680,00

Tabela 4 - Materiais necessários para a análise farmacocinética para as 13 participantes grávidas diagnosticadas com pielonefrite antes (Fase 1) e após o tratamento com antibiótico (Fase 2), totalizando 26 amostras.

df	Qtde.	Análise farmacocinética	Preço unitário (R\$)	Preço total (R\$)
17	26	Análise da rosuvastatina em plasma	100,00	2.600,00
18	26	Análise da metformina em plasma	100,00	2.600,00
19	26	Análise da coproporfirina I em plasma	100,00	2.600,00
20	26	Padrões	100,00	2.600,00
21	26	Solventes	100,00	2.600,00
Total:				13.000,00

Tabela 5 - Materiais necessários para as internações e ressarcimento de custo das 13 participantes grávidas diagnosticadas com pielonefrite após o tratamento com antibiótico (Fase 2), na UPC; para a coleta de amostras de sangue antes (Fase 1) e após o tratamento com antibiótico (Fase 2) e para consulta aos prontuários eletrônicos

Item	Qtde.	Internação das participantes	Preço unitário (R\$)	Preço total (R\$)
22	13	Leito (24 horas) na UPC	400,00	5.200,00
23	13	Ressarcimento de custos relacionados com transporte e alimentação na fase II	100,00	1.300,00
24	26	Material para coleta de amostras de sangue	80,00	2.080,00
25	26	Consulta aos prontuários eletrônicos	0,25	6,50
Total:				8.586,50

Tabela 6 - Orçamento total do projeto.

Itens	Valor total (R\$)
Exames bioquímicos e hematológicos	2.646,80
Análise de citocinas em plasma	11.603,20
Análise do genótipo	4.680,00
Análise farmacocinética	13.000,00
Internações das participantes, ressarcimento de custo e coleta de sangue	8.586,50
TOTAL:	40.516,50

A etapa clínica do estudo será realizada no HC-FMRPUSP, enquanto a etapa analítica será realizada no Laboratório de Farmacocinética Clínica (PKCLIN) da FCFRP-USP, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Vera Lucia Lanchote, e no laboratório da UPC.

De acordo com os dados descritos acima, o custo total do projeto é **R\$40.516,50** e será financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), por meio do Processo Temático FAPESP: 2018/05616-3.