UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Influência do inibidor do transportador de cátions orgânicos 2
(OCT2) cimetidina e do *diabetes* experimental na disposição
cinética da gabapentina em ratos**

Jhohann Richard de Lima Benzi

**Ribeirão Preto
2018**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Influência do inibidor do transportador de cátions orgânicos 2
(OCT2) cimetidina e do *diabetes* experimental na disposição
cinética da gabapentina em ratos**

Jhohann Richard de Lima Benzi

Ribeirão Preto

2018

JHOHANN RICHARD DE LIMA BENZI

**Influência do inibidor do transportador de cátions orgânicos 2
(OCT2) cimetidina e do *diabetes* experimental na disposição
cinética da gabapentina em ratos**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Toxicologia da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientado: Jhohann Richard de Lima Benzi

Orientadora: Profa. Dra. Natália Valadares de Moraes

Coorientadora: Profa. Dra. Amanda Martins Baviera

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia no dia 17/08/2018. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

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.

Benzi, Jhohann Richard de Lima

Influência do inibidor do transportador de cátions orgânicos 2 (OCT2) cimetidina e do *diabetes* experimental na disposição cinética da gabapentina em ratos. Ribeirão Preto, 2018.
95 p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia

Orientadora: de Moraes, Natália Valadares.

1. OCT2. 2. Farmacocinética.
3. Gabapentina. 4. *Diabetes melleitus*.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Jhohann Richard de Lima Benzi

Influência do inibidor do transportador de cátions orgânicos 2 (OCT2) cimetidina e do *diabetes* experimental na disposição cinética da gabapentina em ratos

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Toxicologia da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientadora: Profa. Dra. Natália
Valadares de Moraes

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

A meu pai **José Antônio** (*in memoriam*),

Por sempre apoiar meus sonhos, comemorar minhas vitórias e sofrer minhas derrotas. Por me incentivar e por me guiar. Por ser um exemplo.

A minha mãe **Zilda**,

Por todo o afeto, ternura e amor. Por estar sempre comigo, em todos os momentos.

Agradecimentos

Agradeço a minha orientadora **Profa. Dra. Natália Valadares de Moraes**, pela confiança a mim depositada, pela dedicação no ensino da ciência e por todas as discussões fundamentais para a realização deste trabalho, bem como para meu crescimento profissional e pessoal.

A minha coorientadora **Profa. Dra. Amanda Martins Baviera** pela ajuda na aplicação do modelo de *diabetes mellitus* experimental, bem como por seus momentos de reflexão que resultaram na adição de um grupo experimental.

À **Dra. Elke H. J. Krekels** e **Profa. Dra. Catherijne A. J. Knibbe** por terem sido tão atenciosas durante meu estágio no exterior na Universidade de Leiden, Holanda. Pelas valorosas discussões metodológicas e científicas. Por me mostrar um novo mundo de possibilidades.

Ao grupo de pesquisa **LACDR** (*Leiden Academic Centre for Drug Research - Leiden University*), pela amizade e companhia durante o inverno europeu. Especialmente à **Sinziana Cristea**, por me mostrar o caminho da modelagem e simulação.

Aos **funcionários do Laboratório de Toxicologia Ocupacional** pelo suporte na utilização das ferramentas necessárias à realização deste trabalho.

Às colegas do grupo de pesquisa **Mariana e Priscila**, pelo compartilhamento de momentos, pelas discussões dos resultados e pelos inúmeros momentos de diversão.

Aos **colegas e professores do Programa de pós-graduação em Toxicologia** pelo aprendizado durante o mestrado.

Aos **colegas e professores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara**, pelos ensinamentos durante o mestrado.

Ao meu companheiro **João Paulo Zerbinati** por me fazer descobrir mais de mim mesmo todos os dias. Pelo companheirismo, atenção, carinho...por tudo.

Às amigos da vida **Bianca, Estela, Fernanda e Flávia** pelo apoio mútuo ao enfrentar os desafios da graduação e da pós-graduação. Pelas experiências de vida. Por toda a amizade.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pelo auxílio financeiro.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** – Processos **2015/25728-2 e 2017/12452-4**, pelas bolsas de mestrado e estágio no exterior.

*I'm forever chasing after time
But everybody dies, dies
If I could buy forever at a price
I would buy it twice, twice*

Immortal

Marina and the Diamonds

RESUMO

BENZI, J. R. L. **Influência do inibidor do transportador de cátions orgânicos 2 (OCT2) cimetidina e do diabetes experimental na disposição cinética da gabapentina em ratos**. 2018. 75f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

O transportador de cátions orgânicos 2 (OCT2), expresso na membrana basolateral do túbulo proximal dos rins, promove a eliminação de compostos endógenos e de vários fármacos em uso na clínica. A gabapentina (GAB), anticonvulsivante utilizado para tratamento de dor neuropática, é eliminada principalmente por excreção renal e estudos sugerem participação da secreção ativa via OCT2. Dados experimentais observados em ratos com *diabetes mellitus* experimental (DME) induzido por estreptozotocina (STZ) sugerem que a hiperglicemia e/ou a redução dos níveis circulantes de insulina reduzem a expressão do OCT2. O objetivo do estudo é investigar a influência do DME, e do DME após administração de insulina, da cimetidina (inibidor de OCT2) e da metformina (substrato de OCT2) na disposição cinética da GAB em ratos. Ratos machos Wistar (n = 6 por tempo de coleta) foram divididos em cinco grupos: controle, cimetidina (dose única de cimetidina 100 mg/kg via intraperitoneal), diabético (dose única de STZ 40 mg/kg via intravenosa), diabético tratado com insulina (dose única de STZ 40 mg/kg via intravenosa e doses de insulina 2 UI duas vezes por dia, por 15 dias) e metformina (dose única de metformina 100 mg/kg). Todos os animais receberam dose única de GAB (50 mg/kg, via gavagem). Amostras de plasma e urina foram coletadas até 12 horas após a administração da GAB. As concentrações plasmáticas e urinárias de GAB foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrometria de massas e ultravioleta, respectivamente. A área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo extrapolado ao infinito ($ASC^{0-\infty}$) da GAB foi calculada pela quadratura de Gauss-Laguerre. A administração de dose única de GAB 50 mg/kg em ratos Wistar machos resultou em valores (média $\pm$ desvio padrão) de $ASC^{0-\infty}$, $C_{m\acute{a}x}$, $T_{m\acute{a}x}$, CL_T/F , $t_{1/2}$, CL_r e Fel de $96,31 \pm 12,28 \mu g \cdot h/mL$, $24,75 \pm 9,26 \mu g/mL$, $3,66 \pm 1,11 h$, $0,52 \pm 0,07 L/h \cdot kg$, $0,25 \pm 0,07 L/h \cdot kg$ e $0,48 \pm 0,13$, respectivamente. A disposição cinética da GAB não foi alterada após a administração simultânea de cimetidina ou metformina. O grupo diabético apresentou maiores valores de Fel quando comparado com o grupo controle ($0,83 \pm 0,25 \times 0,48 \pm 0,13$, respectivamente). O Grupo Diabético tratado com insulina também apresentou maior Fel ($0,85 \pm 0,10$) e CL_r quando comparado ao grupo controle ($0,55 \pm 0,10 L/h \cdot kg \times 0,25 \pm 0,07 L/h \cdot kg$). As diferenças encontradas podem ser explicadas pela hiperfiltração glomerular induzida pelo diabetes e pelo tratamento com insulina, devido ao aumento no fluxo sanguíneo renal. Conclui-se que o transporte ativo por OCT2 não é relevante para a disposição cinética da GAB em ratos. A hiperfiltração glomerular induzida pela diabetes *mellitus* experimental e pela administração de insulina sugerem que a filtração glomerular é o principal processo na eliminação renal da GAB.

Palavras-chave: OCT2, gabapentina, cimetidina, *diabetes mellitus* experimental, farmacocinética

ABSTRACT

BENZI, J. R. L. **The role of organic cation transporter 2 inhibitor cimetidine, experimental *diabetes mellitus* and metformin on gabapentin pharmacokinetics in rats.** 2018. 75f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

The organic cation transporter 2 (OCT2), expressed on the basolateral membrane of the proximal kidney tubule, promotes the elimination of endogenous compounds and various drugs in clinical use. Gabapentin (GAB), an anticonvulsant used to treat neuropathic pain, is eliminated primarily by renal excretion, and studies suggest participation of active secretion via OCT2. Experimental data observed in mice with streptozotocin (STZ) induced experimental diabetes mellitus (EDM) suggest that hyperglycemia and/or reduction of circulating insulin levels reduce OCT2 expression. The aim of the study is to investigate the influence of EDM, EDM after insulin administration, cimetidine (OCT2 inhibitor) and metformin (OCT2 substrate) on the kinetic disposition of GAB in rats. Male Wistar rats were divided into five groups: control, cimetidine (single dose of cimetidine 100 mg/kg intraperitoneally), diabetic (single dose of STZ 40 mg/kg intravenously), diabetic treated (single dose of STZ 40 mg/kg intravenously and 2 IU twice daily for 15 days) and metformin (single dose metformin 100 mg/kg). All animals received a single dose of GAB (50 mg/kg, via gavage). Plasma and urine samples were collected up to 12 hours after GAB administration. Plasma and urine concentrations of GAB were determined by high performance liquid chromatography with detection by mass spectrometry and ultraviolet, respectively. The area under the plasma concentration versus time-extrapolated to infinity ($ASC^{0-\infty}$) curve of GAB was calculated by the Gauss-Laguerre quadrature. Single dose administration of 50 mg/kg GAB in male Wistar rats resulted in values (mean $\pm$ standard deviation) of $ASC^{0-\infty}$, C_{max} , T_{max} , CL_T / F , $T_{1/2}$, CL_r and Fel of $96.31 \pm 12.28 \mu\text{g.h/mL}$, $24.75 \pm 9.26 \mu\text{g/mL}$, $3.66 \pm 1.11 \text{ h}$, $0.52 \pm 0.07 \text{ L/h.kg}$, $0.25 \pm 0.07 \text{ L/h.kg}$ and 0.48 ± 0.13 , respectively. The kinetic disposition of GAB was not altered after the simultaneous administration of cimetidine or metformin. The diabetic group had higher Fel values when compared to the control group ($0.83 \pm 0.25 \times 0.48 \pm 0.13$, respectively). The Diabetic Group treated with insulin also had higher Fel (0.85 ± 0.10) and CL_r when compared to the control group ($0.55 \pm 0.10 \text{ L/hr.kg} \times 0.25 \pm 0.07 \text{ L/hr.kg}$). The differences found may be explained by glomerular hyperfiltration induced by diabetes and by insulin treatment, due to increased renal blood flow. We concluded that the active transport by OCT2 is not relevant for the GAB kinetic disposition. Glomerular hyperfiltration induced by EDM and by insulin administration suggest that glomerular filtration is the main process in the renal elimination of GAB.

Key-words: OCT2, gabapentin, cimetidine, experimental *diabetes mellitus*, pharmacokinetics

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fórmula estrutural do neurotransmissor GABA (A) e da gabapentina (B). .1	1
Figura 2 - Mecanismo de absorção e fluxo de gabapentina mediado pelos transportadores PEPT1, b0,+ e LAT2 em enterócitos de ratos.3	3
Figura 3 - Localização e fluxo do transporte mediado pelo transportador de cátions orgânicos 2 (OCT2) no epitélio do túbulo proximal renal.7	7
Figura 4 - Fórmula estrutural da cimetidina.10	10
Figura 5 - Estudo do tamanho amostral em relação ao poder de teste.15	15
Figura 6 - Desenho experimental para avaliação da influência do inibidor do transportador de cátions orgânicos 2 (OCT2) cimetidina, do substrato de OCT2 metformina, do diabetes mellitus experimental e da administração de insulina na disposição cinética da gabapentina em ratos.16	16
Figura 7 - Fórmula estrutural da fenacetina (A) e do anlodipino (B).18	18
Figura 8 - Procedimento de preparo de amostra de plasma de ratos.20	20
Figura 9 - Formula estrutural da gabapentina, 1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno e do produto da derivatização.21	21
Figura 10 – Procedimento de preparo de amostra de urina de ratos.212	212
Figura 11 - Curva analítica da gabapentina utilizando a ponderação $1/x^2$ em plasma (A) e urina (C). Plot do erro padrão relativo x concentração do método de determinação de gabapentina em plasma (B) e urina (D) de ratos.29	29
Figura 12 - Cromatogramas referentes à determinação de gabapentina em plasma de ratos por CLAE-EM. Foram monitoradas as razões m/z 172 para gabapentina e 180 para fenacetina (padrão interno).31	31
Figura 13 - Cromatogramas referentes à determinação de gabapentina (1) em amostras de urina de ratos por CLAE-UV, com detecção a 360 nm.32	32

Figura 14 - Curvas de concentração plasmática versus tempo de gabapentina após dose única de gabapentina 50 mg/kg via gavagem (n = 6 por tempo de coleta).	38
Figura 15 - Quantidade de gabapentina excretada acumulada (mg) em urina (n = 6, por tempo de coleta), por intervalo de tempo após dose única de gabapentina 50 mg/kg via gavagem.	39
Figura 16 - Diagrama de caixa dos parâmetros farmacocinéticos dos grupos experimentais após administração de dose única de gabapentina 50 mg/kg via gavagem.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros farmacocinéticos da gabapentina, em ratos, descritos como média $\pm$ desvio padrão.	6
Tabela 2 - Compostos endógenos, fármacos e protótipos catiônicos substratos de OCT2 e Oct2.	8
Tabela 3 - Estudos in vitro sobre influência de fármacos e xenobióticos na atividade do OCT2.....	9
Tabela 4 - Estudo do efeito matriz, em seis fontes distintas de plasma de rato, avaliado como coeficiente de variação do fator de matriz normalizado por padrão interno (FMN).	30
Tabela 5 - Estudo de estabilidade de gabapentina em solução.	33
Tabela 6 - Parâmetros de validação analítica do método de determinação da gabapentina em plasma de ratos.	34
Tabela 7 - Parâmetros de validação analítica do método de determinação da gabapentina em urina de ratos.....	35
Tabela 8 - Parâmetros farmacocinéticos da gabapentina após dose única de 50 mg/kg (gavagem). Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão (intervalo de confiança de 95%).....	37
Tabela 9 - Comparação dos modelos de <i>diabetes mellitus</i> experimental utilizados para avaliação da expressão de OCT2 com o modelo do presente estudo.	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Ae: Quantidade excretada na urina de forma inalterada.

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

ASC: Área sob a curva concentração plasmática versus tempo.

ASC^{0-∞}: Área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo extrapolada ao infinito.

ASC^{ss} : Área sob a curva concentração plasmática versus tempo (ASC) em estado de equilíbrio.

CLAE-EM: Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrometria de massas

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

CL: Clearance.

CL_{CR}: Clearance de creatinina.

CL_r: Clearance renal.

CL_T/F: Clearance total aparente

C_{máx}: Concentração plasmática máxima.

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.

DME: *Diabetes mellitus* experimental.

EPR: Erro padrão relativo.

F: Biodisponibilidade.

Fel: Fração da gabapentina excretada na urina de forma inalterada.

FMN: Efeito matriz normalizado por padrão interno.

GAB: gabapentina.

HEK: *Human embryonic kidney cells.*

Ki: Constante de inibição.

LAT: Transportador de aminoácidos do tipo LAT.

LIQ: Limite inferior de quantificação.

LSQ: limite superior de quantificação.

MATE: *Multidrug and toxin extrusion.*

MDCK: *Madin-Darby Canine Kidney.*

NMN: N-metil-nicotinamida.

OCT2: Transportador de cátions orgânicos 2.

PEPT1: Transportador de peptídeos 1.

STZ: Estreptozotocina

T_{1/2}: meia vida de eliminação.

T_{máx}: Tempo necessário para alcançar a concentração máxima.

TR: Tempo de retenção.

Vd: Volume de distribuição.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	vi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Gabapentina	1
1.2 O transportador de cátions orgânicos 2 (OCT2)	7
1.3 <i>Diabetes mellitus</i> (DM)	11
2. OBJETIVOS	13
2.1 Objetivos específicos	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 Protocolo experimental	14
3.1.1 Indução do diabetes mellitus experimental	15
3.1.2 Grupo controle (GC)	16
3.1.3 Grupo cimetidina (GCI)	16
3.1.4 Grupo metformina (GM)	16
3.1.5 Grupo Diabetes (GD)	17
3.1.6 Grupo Diabetes tratado com insulina (GDI)	17
3.2 Determinação da gabapentina em plasma e urina de rato por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrometria de massas (CLAE-EM) e por ultravioleta (CLAE-UV), respectivamente.	17
3.2.1 Soluções padrão e reagentes	17
3.2.2 Condições cromatográficas	18
3.2.3 Preparo de amostras	20
3.2.4 Validação Analítica	23
3.2.5 Seletividade	23
3.2.6 Efeito residual	23
3.2.7 Efeito matriz	23
3.2.8 Curva analítica/linearidade	24
3.2.9 Precisão e exatidão	24
3.2.10 Estabilidade em matriz biológica	25
3.2.11 Estabilidade em solução	26
4. RESULTADOS	28
5. DISCUSSÃO	41
6. CONCLUSÕES	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
ANEXOS	74

1. INTRODUÇÃO

1.1 Gabapentina

A gabapentina (GAB) é um fármaco utilizado clinicamente para tratamento da dor crônica neuropática e no tratamento como monoterapia ou terapia adjunta de crises epilépticas parciais, com ou sem generalização secundária (YASAEI; SAADABADI; 2018). Estudos clínicos controlados por placebo demonstram o efeito terapêutico da GAB no tratamento de dores neuropáticas, ondas de calor, neuralgia pós-herpética e neuropatia diabética (BACKONJA et al., 2003; PANDYA, et al., 2005; BACKONJA; CANAFAX; CUNDY, 2011; MOORE; DERRY; WIFFEN, 2018). Há também evidências clínicas do seu uso no tratamento de síndrome das pernas inquietas (CHEIKH et al., 2015). Embora o fármaco possua semelhanças estruturais com o neurotransmissor GABA (Figura 1), eles não interagem de maneira significativa (TAYLOR, 2009; YASAEI; SAADABADI; 2018). Alguns autores descrevem o mecanismo de ação da GAB como um ligante da subunidade $\alpha 2$ - δ de canais de cálcio dependentes de voltagem, diminuindo a liberação de glutamato, norepinefrina e substância P (SILLS, 2006; TAYLOR, 2009), enquanto outros sugerem uma função na modulação GABAérgica, glutaminérgica e monoaminérgica, modificando processos de desenvolvimento da dor neuropática (BACKONJA; GLANZMAN, 2003).

Figura 1 - Fórmula estrutural do neurotransmissor GABA (A) e da gabapentina (B).

A absorção oral da GAB é variável e dados sugerem grande variabilidade interindividual associada a este processo (GIDAL et al., 2000). O tempo necessário para alcançar a concentração máxima ($T_{\text{máx}}$) da GAB em dose única, em humanos, varia de 2-3h após a administração oral (WALKER; PATSALOS, 1995; GIDAL et al., 2000; BOCKBRADER et al., 2010; KRASOWSKI, 2010; TJANDRAWINATA et al., 2014; GALITZ, JAYAWARDENA, S.; FUREY, 2015), e em doses múltiplas varia de 2 à 17h, com mediana de 8h (GORDI et al., 2008). A biodisponibilidade oral (F) da GAB varia de 29-60% (ELWES; BINNIE, 1996; GIDAL et al., 1998; GIDAL et al., 2000; YAGI et al., 2012). Esta variabilidade na absorção da GAB pode estar associada à alta solubilidade e baixa capacidade de permeabilidade, uma vez que é classificada como fármaco de classe III segundo o Sistema de Classificação Biofarmacêutico (ROCHA et al., 2016). De maneira semelhante, EL-KATTAN e VARMA (2018) classificam a GAB, segundo o Sistema de Classificação de Clearance Extendido (*Extended Clearance Classification System*), como fármaco pertencente à classe 3A, com absorção incompleta e possível contribuição de transporter paracelular e transportadores em sua disposição cinética (VARMA et al., 2015; EL-KATTAN et al., 2016; EL-KATTAN e VARMA, 2018).

A absorção da GAB é dose dependente, com redução da F com aumento de dose (STEWART, 1993; CUNDY et al., 2008, BOCKBRADER et al., 2010; LARSEN et al., 2015). CUNDY et al. (2008) demonstraram que o aumento de 7 vezes na dose de GAB resulta em aumento de apenas 2,8 vezes na área sob a curva concentração plasmática versus tempo (ASC) e de 2,2 vezes na concentração plasmática máxima ($C_{\text{máx}}$). A extensa variabilidade na F da GAB parece estar também estar relacionada à absorção limitada pelo transporte mediado pelo transportador de aminoácidos do tipo LAT (LAT) (STEWART et al., 1993; PATSALOS et al., 2008; STRIANO et al., 2008; SINGH e ECKER, 2018). O transporte de GAB em diversas linhagens celulares foi reduzido pelo uso de inibidores de LAT1, o que reforça envolvimento do LAT1 na absorção oral de GAB (SUET al., 1995; DICKENS et al., 2013; FURUGEN et al., 2017; AKANUMA et al., 2018; SINGH e ECKER, 2018).

Outros estudos sugerem que absorção não linear da GAB pode ser atribuída a saturação do transportador de peptídeos 1 (PEPT1) intestinal, responsável pela captação da GAB nos enteróticos (NGUYEN et al., 2007; LARSEN et al., 2015). Nguyen et al. (2007) demonstraram que a absorção intestinal da GAB é mediada pelo transportador PEPT1 e por trans-estimulação pelo transportador $b^{0,+}$ (Figura 2).

Além disso, a captação da GAB é inibida por substratos catiônicos como arginina e aminoácidos neutros como leucina e fenilalanina, não se alterando pela presença de prótons ou sódio e aumenta com a presença de glicil-glutamato (NGUYEN, et al., 2007).

Figura 2 - Mecanismo de absorção e fluxo de gabapentina mediado pelos transportadores PEPT1, b⁰,+ e LAT2 em enterócitos de ratos.

Ilustração: Próprio autor.

Nota: O processo se dá por: influxo de glicil-glutamato (GliGlu) por transportador PEPT1; (a) hidrólise em glicina (Gli) e glutamato (Glu) por dipeptidase; (b) por ação de glutamina sintetase, há conversão de Glu em Glutamina (Gln), que fornece força motriz para absorção trans-estimulada da GAB, através do transportador b⁰,+. Na membrana basolateral, o efluxo de GAB se dá pelo sistema LAT2, através de influxo de aminoácidos neutros (aa) provenientes da circulação sistêmica (NGUYEN; SMITH; FLEISHER, 2007).

Com relação à influência da alimentação na absorção da GAB, Gidal et al., 1996 demonstraram que uma alimentação com alto teor de gordura pode alterar alguns parâmetros da disposição cinética da GAB. Embora não tenham sido encontradas diferenças na ASC, a C_{máx} aumentou em 36% e houve redução no T_{máx} nos indivíduos que fizeram ingestão de alimentos com alto teor de gordura se comparados aos indivíduos tratados em jejum. Outro estudo demonstra a influência

de uma refeição rica em cogumelos shiitake nos parâmetros farmacocinéticos da GAB (TOH et al., 2013). Apesar de aumentar $T_{\text{máx}}$ e clearance renal (CL_r) e diminuir $C_{\text{máx}}$, a alimentação rica em cogumelos shiitake não altera a ASC e provavelmente não tem relevância clínica (TOH et al., 2013). Entretanto, um estudo de quatro fases, onde cada sujeito era controle de si mesmo, a disposição cinética da GAB não se alterou de forma significativamente estatística quando a administração se deu com água, com purê de maçã, suco de laranja ou pudim de chocolate (GIDAL, et al., 1998). Apesar da não observação de diferenças entre os veículos utilizados, o grupo que recebeu GAB e alimentação protéica (pudim de chocolate) apresentou aumento de ASC e $C_{\text{máx}}$ de 26% e 32%, respectivamente, quando comparado aos demais grupos. Ademais, em um estudo semelhante, Benetello et al., (1997) demonstraram que os parâmetros farmacocinéticos ASC, $T_{\text{máx}}$ e $C_{\text{máx}}$ da GAB não se alteraram ao administrar GAB a pacientes em jejum e alimentados após uma refeição rica em proteínas.

Há divergência com relação à influência do sexo na disposição cinética da GAB. Dados sugerem uma variabilidade da absorção da GAB em relação ao gênero, com F maior em mulheres (GIDAL et al., 2000). Entretanto, outros estudos não observaram esta diferença (BOYD et al., 1999; LANDMARK, et al., 2015). Boyd et al., 1999 relata que o único parâmetro farmacocinético que apresenta diferenças entre homens e mulheres é o $C_{\text{máx}}$, sendo maior em mulheres, porém sem relevância clínica (BOYD et al., 1999).

Em humanos, a GAB apresenta volume de distribuição (V_d) de 0,65-1,4 L/Kg (ASCONAPÉ, 2014), não se liga às proteínas plasmáticas (BIALER, 1993; WALKER e PATSALOS, 1995; JOHANNENSEN; TOMSON, 2006; ASCONAPÉ, 2014) e não é metabolizada, sendo eliminada de forma inalterada na urina (ASCONAPÉ, 2014), com meia vida de eliminação ($T_{1/2}$) de 5-9 horas (ELWES; BINNIE, 1996; GIDAL et al., 2000; GORDI et al., 2008; KRASOWSKI, 2010; TJANDRAWINATA et al., 2014; GALITZ, JAYAWARDENA; FUREY, 2015) e clearance (CL) de 9-10 L/h em indivíduos saudáveis (LAL, et al., 2009; YAGI et al., 2012; GALITZ, JAYAWARDENA; FUREY, 2015).

A excreção renal da GAB se dá por filtração glomerular e dados sugerem a participação de secreção ativa via transportador de cátion orgânico 2 (OCT2 em humanos; Oct2 em ratos), expresso nos rins (BOYD et al., 1999; LAL et al., 2010; Neurontin® [bula]). Em um estudo clínico, 12 pacientes receberam 1.200 mg de GAB

enacarbil, pró-fármaco da GAB, e 400 mg de cimetidina por quatros dias. Os pacientes apresentaram diminuição no CL_r e aumento na área sob a curva concentração plasmática versus tempo em estado de equilíbrio (ASC^{ss}) da GAB de 24%, quando comparados com a administração de apenas GAB enacarbil (LAL et al., 2010). Boyd et al., (1999) conduziram um estudo de dose única no qual 36 pacientes (18 homens e 18 mulheres) de 20-78 anos receberam 400 mg de GAB. O estudo demonstrou que o CL_r da GAB apresentou baixa correlação com o CL de creatinina (CL_{cr}) ($R^2 = 0,234$, $p = 0,0028$), o que sugere a contribuição de outros mecanismos de eliminação além da filtração glomerular.

Tendo em vista que a GAB não apresenta metabolismo hepático, não se liga as proteínas plasmáticas e não apresenta interações medicamentosas com outros anticonvulsivantes, a GAB é um fármaco seguro para uso em populações idosas (BIRNBAUM, 2007; MOTIKA; SPENCER, 2016). Apesar da escassez de estudos, a disfunção hepática não parece alterar parâmetros farmacocinéticos da GAB. Entretanto, Ikemura et al., (2013) demonstraram que lesões do tipo isquemia-reperfusão hepáticas em ratos, diminuem a expressão renal de Oct2 em 33%.

A GAB vem sendo utilizada em modelos experimentais de dor (FOLKESSON, 2010; PAPATHANASIOU et al., 2016; 2016-b; MIRANDA et al., 2017). Em ratos, a F da GAB também diminui com o aumento da dose, variando de 30,3 a 95,3% quando 10 a 200 mg/kg via gavagem são administrados (RADULOVIC et al., 1992; LARSEN et al., 2014). Assim como em humanos, a GAB não é metabolizada em ratos, sendo excretada de forma inalterada na urina. O V_d e o CL da GAB, em animais variam de 1,17 a 4,75 L/kg e 0,32 a 1,13 L/h/kg, respectivamente (RADULOVIC et al., 1992; FOLKESSON, 2010; LARSEN et al., 2014). Outros parâmetros farmacocinéticos da GAB em ratos estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Parâmetros farmacocinéticos da gabapentina, em ratos, descritos como média $\pm$ desvio padrão.

Dose	F (%)	C _{máx} (µg/mL)	T _{máx} (h)	ASC ^{0-∞} (µg.h/L)	Vd (L/kg)	T _{1/2} (h)	CL/F (L/h/kg)	Referência
10	95,3 $\pm$ 3,1	7,16 $\pm$ 0,2	1,04 $\pm$ 0,0	31, 639 $\pm$ 1,2	1,17 $\pm$ 0,05	2,55 $\pm$ 0,1	0,32 $\pm$ 0,01	1
25	74,9 $\pm$ 4,1	13,13 $\pm$ 0,4	1,21 $\pm$ 0,2	62,176 $\pm$ 3,4	1,55 $\pm$ 0,1	2,70 $\pm$ 0,3	0,41 $\pm$ 0,02	1
50	51,2 $\pm$ 2,0	17,40 $\pm$ 1,0	1,57 $\pm$ 0,2	85,09 $\pm$ 3,3	2,11 $\pm$ 0,1	2,46 $\pm$ 0,0	0,59 $\pm$ 0,03	1
50	79,0 $\pm$ 11	16,4 $\pm$ 2,1	1,7 $\pm$ 0,8	73,1 $\pm$ 9,9	1,44 $\pm$ 0,5	1,7 $\pm$ 0,6	0,55 $\pm$ 0,1	2
60	-	-	-	-	1,3	1,7	0,5	3*
100	36,1 $\pm$ 2,7	23,40 $\pm$ 2,5	1,46 $\pm$ 0,1	119,76 $\pm$ 9,1	3,09 $\pm$ 0,2	2,52 $\pm$ 0,1	0,86 $\pm$ 0,07	1
200	30,3 $\pm$ 4,0	33,10 $\pm$ 3,0	2,03 $\pm$ 0,3	200,95 $\pm$ 26,8	4,75 $\pm$ 0,9	2,96 $\pm$ 0,3	1,13 $\pm$ 0,2	1

Nota: * - Administração por via subcutânea; Os demais estudos são referentes à administração via gavagem. **F:** Biodisponibilidade; **C_{máx}:** Concentração máxima; **CL/F:** clearance total aparente; **T_{máx}:** Tempo para atingir C_{máx}; **ASC^{0-∞}:** Área sob a curva extrapolada ao infinito; **Vd:** Volume de distribuição; **T_{1/2}:** meia vida;

1 – LARSEN et al., 2014; 2 – RADULOVIC et al., 1992; 3 – FOLKESSON et al., 2010.

1.2 O transportador de cátions orgânicos 2 (OCT2)

A família dos transportadores de cátions orgânicos (OCT) é constituída pelos transportadores OCT1 (SLC22A1), OCT2 (SLC22A2) e OCT3 (SLC22A3), sendo todos membros da superfamília de transportadores de solutos (SLC) SLC22A, que inclui também os novos transportadores de cátions orgânicos (OCTN), OCTN1 (SLC22A4) e OCTN2 (SLC22A5), e os transportadores de ânions orgânicos OAT1-4 (SLC22A6, SLC22A7, SLC22A8 e SLC22A11) (NIES et al., 2011).

O OCT2 é expresso principalmente nos rins, mas também encontrado na placenta, timo, glândula adrenal e plexo coróide (KOEPESELL, 2013). Em ratos e humanos, o Oct2/OCT2 é expresso na membrana basolateral dos túbulos proximais renais (Figura 3) (URAKAMI et al., 1998; KIDO; MATSSON; GIACOMINI, 2011; KOEPESELL, 2013). O OCT2 é constituído por 593 aminoácidos, com um peso molecular calculado de 66 kDa e 67% de semelhança com OCT1 (JONKER; SCHINKEL, 2003). Sua atividade parece ser dependente do sexo e da idade, sendo que a sua expressão é maior em ratos machos e com idade mais avançada (URAKAMI et al., 1999).

Figura 3 - Localização e fluxo do transporte mediado pelo transportador de cátions orgânicos 2 (OCT2) no epitélio do túbulo proximal renal.

Ilustração: Próprio autor.

Nota: OAT: transportador de ânions orgânicos; OCT: transportador de cátions orgânicos; MATE: transportador de extrusão de múltiplos fármacos e toxinas; MRP: proteína associada à resistência a múltiplos fármacos.

Os substratos de OCT2 incluem substâncias endógenas (colina, dopamina, histamina e serotonina), fármacos (cetirizina, cimetidina, imipramina, lamivudina, entre outros) e os protótipos catiônicos 1-metil-4-fenilpiridina, tetraetilamônio, tetrametilamônio, tetrapentilamônio (Tabela 2). Entre os substratos que inibem o OCT2, tem-se a cetirizina, cimetidina, desipramina, dipiridamol, imipramina, ondasetrona, orfenadrina e tacrina (DRESSER; LEABMAN; GIACOMINI, 2001; LEE et al., 2010; KIDO; MATSSON; GIACOMINI, 2011; KOEPESELL, 2013).

Tabela 2 - Compostos endógenos, fármacos e protótipos catiônicos substratos de OCT2 e Oct2.

Substratos	Transportador	Referência
1-metil-4-fenilpiridina; amantadina; aminoguanidina; cetirizina; cimetidina; colina; desipramina; disopiramida; dipiridamol; dopamina; famotidina; histamina; imipramina; isoprenalina; lamivudina; memantina; mepiperfenidol; norepinefrina; o-metilprocaïnâmica; ondasetrona; orfenadrina; paraquat; quinina; ranitidina; serotonina; N1-metilniconitâmida; tetraetilamônio; tetrametilamônio; tetrapentilamônio; tacrina.	OCT2	DRESSER; LEABMAN; GIACOMINI, 2001; LEE, et al., 2010; KIDO; MATSSON; GIACOMINI, 2011; KOEPESELL, 2013.
1-metil-4-fenilpiridina; adrenalina; colina; cimetidina; cisplatina; corticosterona; creatinina; desoxicorticosterona; dopamina; β -estradiol; guinidina; histamina; levofloxacina; nicotina; noradrenalina; noraepinefrina; procaïnâmica; progesterona; quinidina; serotonina; N1-metilniconitâmida; tetraetilamônio.	Oct2	DRESSER; LEABMAN; GIACOMINI, 2001.

Nota: OCT2: transportador de cátions orgânicos 2, em humanos; Oct2: transportador de cátions orgânicos 2, em ratos.

Estudos *in vitro* utilizando células *Madin-Darby Canine Kidney* (MDCK) ou *Human embryonic kidney cells* (HEK) tem papel na identificação de fármacos e xenobióticos inibidores da atividade de OCT2 (Tabela 3). Tais estudos sinalizam a importância da investigação dos substratos e inibidores do transportador que podem ter relevância na prática clínica uma vez que em alguns exemplos, a inibição dos substratos modelo pode chegar a 90% (McCORMICK e SWAISLAND, 2016).

Tabela 3 - Estudos in vitro sobre influência de fármacos e xenobióticos na atividade do OCT2.

Classe	Fármacos	IC ₅₀ (μ M)	Substrato utilizado	Referência
Anti-hipertensivos	bisoprolol	2,4	metformina	1
	carvedilol	2,3		
	metoprolol	50,2		
	propranolol	8,3		
Antituberculosos	etambutol	85,8	MPP ⁺	2
	ácido para-aminosalicílico	189,2		
Antineoplásicos	pazopanibe	3,5	ASP ⁺ e MPP ⁺	3 e 4
	olaparib	19,9		
Anticolinérgicos	butilescopolamina	1819,5	MPP ⁺	5
	ipratrópio	3,6		
	tróspio	7,3		
	atropina	37,9		
	homotropina	45,4		
	escopolamina	540,8		
Antidepressivos	amitriptilina	0,78	metformina	6
	imipramina	0,30		
	desipramina	0,34		
	fluoxetina	4,35		
	sertralina	4,90		
	paroxetina	2,49		
	maclobemida	48,52		
	venlafaxina	> 100		
Extratos de plantas	Berberina (<i>Coptis chinensis</i> , <i>Berberis vulgaris</i> , <i>Hydrastis canadensis</i> , <i>Mahonia aquifolium</i>)	0,371	serotonina	7
Pesticidas organofosforados	fenamiphos	6,9	rodamina 123	8
	fosmete	7,9		
Excipientes farmacêuticos	Tween 20	295,20	MPP ⁺	9
	Tween 60	42,10		
	Tween 80	185,10		
Anti-viral	telaprevir	6,35	MPP ⁺	10

Nota: 1 - BACHMAKOV et al., 2009; 2 – PARVEZ, et al., 2016; 3 – SAUZAY et al., 2016; 4 – McCORMICK e SWAISLAND, 2016; 5 – CHEN et al., 2016; 6 - WANG, K. et al., 2014; 7 - SUN, S. et al., 2014; 8 - CHEDIK; BRUYERE; FARDEL, 2018; 9 – SOODVILAI et al., 2017; 10 – Kunze et al., 2012;

ASP⁺: Iodeto 4-(4-(dimetilamino)estiril)-N metilpiridínio; **MPP⁺:** 1-metil-4-fenilpiridina

IC₅₀: Concentração necessária para inibir 50% da atividade máxima de OCT2.

MDCK: *Madin-Darby Canine Kidney*. **HEK:** *Human embryonic kidney cells*.

A cimetidina foi caracterizada como fármaco inibidor de OCT2 (Figura 4) em estudos *in vitro*, *in vivo* e clínicos. Urakami et al. (1998) demonstraram acúmulo extracelular de [^{14}C]tetraetilamônio em cultura de células MDCK transfetadas com OCT1 e OCT2, na presença dos inibidores 1-metil-4-fenilpiridina, cimetidina, quinidina, tetraetilamônio, nicotina, N^1 – metilnicotinamida e guanidina, sendo a cimetidina o segundo inibidor mais potente, depois de 1-metil-4-fenilpiridina. Dados de Nadai et al. (2007) demonstraram redução do CL_r de 3-metilxantina e da emprofilina, sem alterar a taxa de filtração glomerular, ao administrar dose intravenosa de cimetidina 50-100 mg/kg em ratos. Dresser; Leabman; Giacomini (2011) demonstram a inibição do OCT2 pela cimetidina através de análise computacional e Umehara (2008) sugere que não há diferenças entre espécies na afinidade da cimetidina por OCT2/Oct2. LAL et al. (2010) sugere a participação de OCT2 na eliminação da GAB, em estudo clínico utilizando a cimetidina como inibidor de OCT2. O *International Transporter Consortium* sugere a cimetidina em estudos de investigação de interações fármaco-fármaco envolvendo OCT2 (HACKER et al., 2015, CONSORTIUM, et al., 2010).

A cimetidina também produz inibição significativa das isoformas do citocromo P450 1A2, 2C9, 2D6 E 3A4, bem como em outros transportadores renais *multidrug and toxin extrusion* (MATE) 1 e 2 (SHAIK; MEHVAR, 2008; ITO et al., 2011).

Figura 4 - Fórmula estrutural da cimetidina.

1.3 *Diabetes mellitus* (DM)

O *diabetes mellitus* (DM) é considerado um problema de saúde pública a nível mundial, tanto nos países desenvolvidos quanto nos países em desenvolvimento (NARAYAN, 2009; MATHERS e LONCAR, 2006; ANIMAW e SEYOUM, 2017). O DM é caracterizado pela hiperglicemia resultante de alterações na secreção e/ou ação da insulina. Os sintomas agudos do DM incluem poliúria, polidipsia, perda de peso, polifagia e visão turva, podendo causar complicações fatais como cetoacidose e síndrome não-cetótica hiperosmolar (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2015; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, s/d).

O envelhecimento populacional associado à falta de atividades físicas e aos maus hábitos alimentares está relacionado ao aumento da incidência de DM. A maior sobrevida do paciente diabético está relacionada à menor tempo de exposição a condições de hiperglicemia, reduzindo as chances do desenvolvimento de complicações do DM, como macroangiopatia, retinopatia, nefropatia e neuropatias (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2015; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, s/d).

A metformina é considerada o fármaco de escolha para o tratamento da *diabetes mellitus* tipo 2, devido não somente ao controle glicêmico, mas contribuições benéficas relacionadas às complicações vasculares, peso, lipídios, pressão diastólica e mortalidade (SAENZ et al., 2005; ROJAS e GOMES, 2013). O OCT2 contribui de maneira importante na excreção renal da metformina, como evidenciando em estudos clínicos (WANG et al., 2008; YOON et al., 2013) e *in vitro* (KIMURA et al., 2005; SONG; SHIN; SHIN; 2008; HACKER et al., 2015).

A dor neuropática pode ser definida como a dor iniciada ou causada por lesão primária ou disfunção do sistema nervoso. A neuropatia periférica é uma complicação comum em pacientes diabéticos com incidência de 66% dos pacientes com DM dependentes de insulina e 59% dos pacientes com DM não dependentes de insulina (SADOSKY et al., 2008). A prevalência da dor neuropática diabética aumenta em função da idade, do tempo de diagnóstico da doença e do grau da hiperglicemia (ADRIAENSEN et al., 2005; SADOSKY et al., 2008). O controle da dor neuropática diabética consiste no controle da glicemia e no tratamento farmacológico. Estudos clínicos controlados por placebo demonstram a efetividade

do uso de GAB para tratamento da dor neuropática (BACKONJA et al., 1998; SÁNCHEZ-VALIENTE, 1998; SERPELL et al., 2002).

O DM pode alterar absorção gastrointestinal, a distribuição, o metabolismo e a excreção renal dos fármacos em uso na clínica dependendo do tempo de diagnóstico da doença, da presença de complicações do *diabetes* e do substrato investigado (DOSTALEK et al., 2012).

O *diabetes mellitus* experimental (DME) induzido em ratos suprime a expressão do CYP1A2, CYP2C11, CYP2C13 e CYP3A2 e a induz a expressão do CYP2A1, CYP2B1, CYP2C12, CYP4A1 e CYP2E1 (IBER et al., 2001; SCHENKMAN, 1991; SHIMOJO, 1993; LEE et al., 2010), assim como altera a atividade de enzimas de fase II (LEE et al., 2010). A expressão e atividade de transportadores também são influenciadas pelo DM. Estudos *in vitro* sugerem o aumento da expressão de LAT1 em condições de privação de glicose, bem como a diminuição da expressão em condições de exposição à glicose (MATSUYAMA et al., 2012; YAMAMOTO et al., 2017). Nowicki et al. (2008) e Grover et al. (2004) descreveram redução de 50 a 70% nos níveis de Oct2 em ratos com diabetes experimental induzida por estreptozotocina.

Considerando que a GAB é um fármaco eficaz no tratamento da dor neuropática diabética e que a metformina é o fármaco de escolha no tratamento do DM tipo 2, bem como dados da literatura sugerem a participação de OCT2 na eliminação renal da GAB e que o diabetes experimental altera em 50-70% a expressão de OCT2, este trabalho busca investigar: a) o impacto da atividade de OCT2 na disposição cinética da GAB através do estudo da interação GAB x cimetidina (inibidor de OCT2) em ratos; b) o impacto da potencial interação entre GAB e metformina (substrato de OCT2) em ratos; c) a influência do DME induzido pela estreptozotocina e do tratamento com insulina na disposição cinética da GAB em ratos.

2. OBJETIVOS

Investigar o impacto *do diabetes mellitus* experimental (DME) e do DME após administração de insulina, da cimetidina e da metformina na disposição cinética da GAB em ratos.

2.1 Objetivos específicos

- Desenvolver e validar métodos de determinação da GAB em plasma e urina de ratos por cromatografia líquida de alta eficiência.
- Avaliar o impacto do inibidor de OCT2 cimetidina e do substrato de OCT2 metformina na disposição cinética da GAB em ratos;
- Avaliar o impacto do DME induzido por estreptozotocina e da administração de insulina na disposição cinética da GAB em ratos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Protocolo experimental

Os experimentos em animais foram realizados no Biotério do Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP (FCF-UNESP). Foram utilizados ratos machos *Wistar* (250 ± 20 g; 7-8 semanas) provenientes do Biotério Central do Campus de Botucatu da Universidade Estadual Paulista. O protocolo experimental descrito abaixo fora aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da FCF-UNESP (CEUA/FCF/Car: 75/2015) (ANEXO I e II).

O cálculo do tamanho amostral foi obtido através do programa *Power and Sample Calculation* versão 2.1.30 (DUPONT; PLUMMER, 1997). Os valores médios e desvio padrão da ASC utilizados para o cálculo do tamanho amostral foram de $73,1 \pm 9,9$ µg.hr/mL observados em ratos tratados com dose única de GAB 50 mg/kg (RADULOVIC, et al., 1995). O tamanho amostral mínimo para detectar uma diferença de pelo menos 30% no parâmetro ASC entre os grupos de animais, com erro tipo I fixado em 0,05 e poder do teste superior a 90%, foi de 6 animais (Figuras 5 e 6).

Considerando a necessidade de coletas de amostras seriadas de sangue para a análise farmacocinética clássica e por tratarem-se de animais de pequeno porte, foram realizadas no máximo 5 coletas de 500 µL de sangue de cada animal de experimentação por excisão de cerca de 0,3 mm da porção distal da cauda, após vasodilatação por aquecimento localizado a 42° C. A última coleta foi realizada por decapitação, respeitando os princípios de coletas de amostras em animais de experimentação (DIEHL et al., 2001; JOSLIN, 2009). Tendo em vista que os animais utilizados no estudo possuíam em média 16 mL de sangue circulante (DIEHL et al., 2001), a amostragem múltipla em 24 h (totalizando a retirada de 2,5 mL - aproximadamente 15% do volume total) não causou risco de choque hipovolêmico aos animais (DIEHL et al., 2001). Em função do uso das gaiolas metabólicas para a coleta de urina e visando minimizar a contaminação das amostras de urina com sangue dos animais, foram utilizados 15 animais para coleta de plasma e 6 animais para a coleta de urina em cada grupo, totalizando 21 animais por grupo experimental.

Foram coletadas amostras sangue nos tempos 0,25h, 0,5h, 0,75h, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 8h, 10h, 12h em tubos heparinizados (Liquemine® 5000 UI, Roche). A urina dos animais foi coletada nos intervalos de tempo de 0-4h; 4-8h; e 8-12 h. As amostras de plasma e urina foram armazenadas a -70° C até o momento da análise.

Figura 5 - Estudo do tamanho amostral em relação ao poder de teste.

3.1.1 Indução do diabetes mellitus experimental

Diabetes mellitus experimental foi induzido nos animais em jejum de 14h, após anestesia com isoflurano (100%, Cristália, Itapira, Brasil) por administração de dose única de estreptozotocina 40 mg/kg (STZ, > 98%, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) via intravascular, dissolvido em tampão citrato de sódio 0,1 M (pH 4,5) (ARCARO et al., 2014). Quatro dias após a administração de STZ, os animais foram considerados diabéticos quando a glicemia fora do jejum foi maior que 300 mg/dL, avaliados por método da glicose oxidase (TRINDER, 1969). Os grupos não diabéticos receberam volume de 0,2 mL de tampão citrato de sódio 0,1 M (pH 4,5) no mesmo momento das administrações de STZ nos grupos diabéticos, como forma de controle do veículo.

Figura 6 - Desenho experimental para avaliação da influência do inibidor do transportador de cátions orgânicos 2 (OCT2) cimetidina, do substrato de OCT2 metformina, do diabetes mellitus experimental e da administração de insulina na disposição cinética da gabapentina em ratos.

Nota: i.v.: via intravenosa; i.p.: via intraperitoneal.

3.1.2 Grupo controle (GC) (n=6, por tempo de coleta; total n=21)

Os animais do GC receberam dose única de GAB 50 mg/kg, via oral (gavagem) (RADULOVIC et al., 1995; LARSEN et al., 2015) após jejum de 14 horas.

3.1.3 Grupo cimetidina (GCI) (n=6, por tempo de coleta; total n=21)

Os animais do GCI receberam dose única de cimetidina 100 mg/kg via intraperitoneal (ADEDYOYIN; AARONS; HOUSTON, 1987; NADAI et al., 2007; BELTRAME et al., 2015), 60 minutos antes de receber dose única de GAB 50 mg/kg, por gavagem (RADULOVIC et al., 1995; LARSEN et al., 2015) após jejum de 14 horas.

3.1.4 Grupo metformina (GM) (n=6, por tempo de coleta; total n=21)

Os animais do GM receberam dose única de metformina 100 mg/kg, por gavagem, (MA et al., 2016) concomitantemente com dose única de GAB 50 mg/kg, por gavagem, (RADULOVIC et al., 1995; LARSEN et al., 2015) após jejum de 14 horas.

3.1.5 Grupo Diabetes (GD) (n=6, por tempo de coleta; total n=21)

Após 15 dias da confirmação do diabetes, os animais do GD receberam dose única de GAB 50 mg/kg por gavagem (RADULOVIC et al., 1995; LARSEN et al., 2015), após jejum de 14 h.

3.1.6 Grupo Diabetes tratado com insulina (GDI) (n=6, por tempo de coleta; total n=21)

Após a confirmação do diabetes, os animais incluídos do GDI receberam diariamente 4 U de insulina (Humolin®) via subcutânea (ARCARO et al., 2014), por 15 dias, sendo uma administração às 8h00 (2U) e a outra às 17h00 (2U). Após os 15 dias, os animais receberam dose única de GAB 50 mg/kg por gavagem (RADULOVIC et al., 1995; LARSEN et al., 2015), após jejum de 14h.

3.2 Determinação da gabapentina em plasma e urina de rato por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrometria de massas (CLAE-EM) e por ultravioleta (CLAE-UV), respectivamente.

3.2.1 Soluções padrão e reagentes

A GAB é uma substância controlada pela Portaria SVS/MS nº 344/1998 e para sua compra, foi necessária a obtenção de autorização especial junto a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (ANEXOS III e IV). Os solventes metanol (J. T. Baker, Cidade do México, México), diclorometano (J.T. Baker, Pensilvânia, EUA), n-butanol (Sigma-Aldrich, Rio de Janeiro, Brasil) utilizados foram de grau CLAE. Foram utilizados os reagentes ácido acético (Synth, Diadema, Brasil), fosfato de sódio monobásico (Synth, Diadema, Brasil), isopropanol (Merck, Rio de Janeiro, Brasil) de grau analítico. Toda água utilizada durante o experimento foi obtida em sistema de purificação Milli-Q® Plus (Millipore, Merck, São Paulo, Brasil).

O padrão certificado de GAB (99,8%, Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil) foi usado para preparar solução de estoque na concentração de 100 µg/mL em metanol. A partir desta solução, foram realizadas sucessivas diluições para obtenção

das soluções de trabalho nas concentrações de 1; 2; 5; 7; 10; 20; 30; 50 e 70 µg/mL em metanol.

A fenacetina (97%, Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) (Figura 7-A) utilizada como padrão interno para o método de determinação de GAB em plasma, foi preparada na concentração de 10 µg/mL em metanol. O besilato de anlodipino (99,7%, *European Pharmacopeia Reference Standard*, Strasbourg, França) (Figura 7-B) utilizado como padrão interno para o método de determinação de GAB em urina, foi preparado na concentração de 200 µg/mL em metanol. Todas as soluções foram armazenadas a -20°C.

Figura 7 - Fórmula estrutural da fenacetina (A) e do anlodipino (B).

3.2.2 Condições cromatográficas

A determinação da GAB em plasma de ratos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas (CLAE-MS). Foi utilizado o sistema cromatográfico da Perkin Elmer (Shelton, EUA) constituído por sistema binário de bombas (Flexar LC Pump), degaseificador (Flexar solvent manager), forno (Flexar LC column oven), injetor automático (Flexar LC Autosampler) e detecção por espectrometria de massas (Perkin Elmer, Flexar SQ 300 MS).

A GAB e o padrão interno fenacetina foram resolvidos em coluna de fase reversa LiChrospher® C18 RP (125 × 4,0 mm, 5 µm, Merck, Darmstadt, Alemanha), com pré-coluna LiChroCART® 4-4 Purospher® RP-18 (5 µm, Merck, Darmstadt,

Alemanha), mantidas a 25°C e fase móvel constituída por mistura de acetato de amônio 5 mM (pH 4,0) e metanol (40:60, v/v) (CARLSSON; REUBSAET, 2003) com fluxo de 0,4 mL/min, em modo isocrático.

O efluente da coluna cromatográfica foi direcionado para o espectrômetro de massas, Flexar SQ 300 MS Perkin Elmer, cuja interface operou no modo eletronebulização positiva. A voltagem do capilar na ionização por eletro nebulização foi de 6,0 kV e a temperatura de dessolvatação foi mantida a 350° C. O nitrogênio foi utilizado como gás de nebulização na vazão de 12 L/min. A voltagem do cone utilizada foi calibrada com relação ao *autotune* para a GAB e para o padrão interno. As condições de otimização do espectrômetro de massa foram obtidas através de infusão direta da solução padrão de GAB (0,1 µg/mL) preparada na fase móvel e introduzida com bomba de infusão na vazão de 10 µL/min. Os íons moleculares protonados $[M+H]^+$ de razão m/z 172 e 180 foram utilizados para monitorização da GAB e padrão interno, respectivamente. A aquisição de dados e a quantificação das amostras foram realizadas utilizando o *software* Chromera, versão 3.4.0.5712 (Perkin Elmer, Shelton, EUA).

A determinação da GAB em urina de ratos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta (CLAE-UV). O sistema cromatográfico da Shimadzu (Shimadzu Inc., Kyoto, Japão) foi constituído por sistema de bombas quaternário LC-20AT, degaseificador DGV-20AR5 e detector UV-VIS SDP-20AT e comprimento de onda de 360 nm. A GAB e o padrão interno anlodipino foram resolvidos em mesma coluna e pré-coluna do método em plasma. A fase móvel foi constituída por mistura de fosfato de sódio 50 Mm (pH 3,9) e metanol (27:73, v/v) (JALALIZADEH, et al., 2007) com fluxo de 1,2 mL/min, em modo isocrático. A aquisição de dados e a quantificação das amostras foram realizadas utilizando o *software* Lab Solutions versão 5.57 SP1 (Shimadzu Inc., Kyoto, Japão).

3.2.3 Preparo de amostras

Em microtubos de 1,5 mL, alíquotas de 100 μ L de plasma foram enriquecidas de 5 μ L de padrão interno (fenacetina, 10 μ g/mL), 50 mg de Na₂SO₄ e 1000 μ L da mistura diclorometano:n-butanol (1:1 v/v). Os microtubos foram agitados em agitador automático por 20 minutos e centrifugados a 15.000 $\times$ g por 20 minutos (*Eppendorf Centrifuge 5417R*, Hamburgo, Alemanha). Transferiu-se 900 μ L do sobrenadante e evaporou-se a secura usando concentrador de amostras sob vácuo (*Genevac™ Centrífuga Duo*, Ipswich, Reino Unido). O resíduo foi reconstituído em 120 μ L da fase móvel, agitado por 15 segundos em vortex e 10 μ L foram injetados no sistema cromatográfico (Figura 8).

Figura 8 - Procedimento de preparo de amostra de plasma de ratos.

Nota: CLAE-EM: Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrometria de massas.

O método de análise da GAB em urina por CLAE com detecção no ultravioleta exigiu a derivatização da GAB usando o reagente 1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno (FDNB), uma vez que a GAB não possui cromóforo em sua estrutura. A reação de derivatização usando FDNB está representada na Figura 9 (JALALIZADEH, et al., 2007).

Figura 9 – Formula estrutural da gabapentina, 1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno e do produto da derivatização.

Alíquotas de 100 μL de urina foram adicionadas em microtubos de 1,5 mL e enriquecidas com 30 μL de padrão interno (anlodipino), 50 mg de 50 mg de Na_2SO_4 e 1000 μL de diclorometano:n-butanol (1:1 v/v). Os microtubos foram agitados em agitador automático por 20 minutos e centrifugados a 15.000 $\times g$ por 20 minutos.

Transferiu-se 800 μL do sobrenadante e evaporou-se a secura. Em seguida, adicionou-se ao resíduo 40 μL de tampão borato (pH 8,2), 12 μL de agente derivatizante FDNB 0,06 M e 400 μL de acetonitrila (JALALIZADEH, et al., 2007). Após homogeneização, os microtubos foram aquecidos a 65 °C por 10 minutos para reação de derivatização. Após resfriamento, a reação foi interrompida com adição de 10 μL de HCL 1 M e 50 μL da solução foram injetadas no sistema cromatográfico (Figura 10).

Figura 10 - Procedimento de preparo de amostra de urina de ratos.

Nota: CLAE-UV: Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta.

3.2.4 Validação Analítica

Os métodos de determinação da GAB em plasma e urina foram validados de acordo com a RDC nº 27 de 17 de maio de 2012 da ANVISA. Foram avaliados os seguintes parâmetros: seletividade, efeito residual, efeito matriz, linearidade, precisão e exatidão intra e interensaios, estabilidade em matriz biológica (curta duração, pós-processamento, após ciclo de congelamento e descongelamento) e estabilidade em solução.

3.2.5 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada pela análise de amostras de plasma e urina branco, de 6 fontes distintas, sendo para o método de plasma utilizado 4 amostras normais e 2 hemolisadas. Considera-se o método seletivo quando respostas de picos interferentes próximos ao tempo de retenção (TR) do analito e picos interferentes próximos ao TR do padrão interno forem menores que 20% e 5% da resposta obtida, respectivamente, quando amostras branco são comparadas as amostras processadas do limite inferior de quantificação (LIQ).

3.2.6 Efeito residual

O efeito residual foi avaliado através de três injeções de amostras branco, na qual uma foi injetada antes e duas logo após a injeção de duas amostras processadas do limite superior de quantificação (LSQ). Considera-se o efeito residual ausente quando respostas de picos interferentes próximos ao TR do analito e picos interferentes próximos ao TR do padrão interno forem menores que 20% e 5% da resposta obtida, respectivamente, quando amostras branco são comparadas as amostras processadas do (LIQ).

3.2.7 Efeito matriz

O efeito matriz foi avaliado no método de determinação de GAB em plasma, uma vez que interferentes da matriz biológica podem suprimir ou aumentar a resposta do analito em espectrometria de massas. Compararam-se as áreas dos

picos da GAB em solução padrão, nas concentrações de 1,2 µg/mL (controle de qualidade de baixa concentração - CQB) e 24 µg/mL (controle de qualidade de alta concentração - CQA) e do padrão interno, injetados diretamente no sistema cromatográfico, com as áreas dos picos obtidos de solução padrão nas mesmas concentrações e do padrão interno, adicionadas em extratos de plasma branco de seis fontes distintas, sendo quatro normais e duas hemolisadas.

Utilizou-se a Equação 1 para a obtenção do fator matriz normalizado por padrão interno (FMN), para cada amostra:

$$FMN = \frac{\text{Resposta do analito em matriz} / \text{Resposta do padrão interno em matriz}}{\text{Resposta do analito em solução} / \text{Resposta do padrão interno em solução}} \quad (1)$$

O efeito matriz é considerado ausente quando o coeficiente de variação do FMN é inferior a 15%.

3.2.8 Curva analítica/linearidade

A curva analítica para o método em plasma e urina foi construída utilizando-se alíquotas de 100 µL de plasma e urina brancos enriquecidas com 30 µL de cada solução de trabalho de GAB. As amostras foram extraídas e analisadas conforme procedimento descrito previamente (Figuras 8 e 10). As curvas analíticas foram construídas nas concentrações finais de 0,6; 1,5; 2,1; 3; 6; 9; 15; 21; e 30 µg/mL de GAB por mililitro de plasma e 3; 6; 9; 15; 21 e 30 µg/mL de GAB por mililitro de urina.

3.2.9 Precisão e exatidão

A precisão e a exatidão dos métodos foram avaliadas através dos estudos intra-ensaios e interensaios. Amostras de plasma branco foram enriquecidas em cinco níveis de concentração: 0,6 µg/mL (LIQ); 1,2 µg/mL (CQB); 15 µg/mL (CQM); 24 µg/mL (CQA) e 52,2 µg/mL (controle de qualidade de diluição - CQD). De maneira semelhante, amostras de urina branco foram enriquecidas em cinco concentrações: 3,0 µg/mL (LIQ); 7,5 µg/mL (CQB); 15 µg/mL (CQM) e 25 µg/mL (CQA) e 500 µg/mL (CQD). No preparo da amostra, as amostras de CQD de plasma e urina foram diluídas 10 e 50 vezes com plasma e urina branco, respectivamente, e

submetidas protocolo de extração e análise conforme procedimento descrito previamente (Figuras 8 e 10).

Para avaliação de precisão e exatidão intra-ensaios do método, amostras de plasma e urina foram enriquecidas com as cinco concentrações supra citadas em quintuplicata de forma independente, em uma única corrida analítica. Para avaliação de precisão e exatidão interensaios, foram analisadas quintuplicatas de cada amostra em três corridas diferentes (três dias diferentes). O método é considerado preciso nos testes de intra-ensaio e interensaio quando o coeficiente de variação for igual ou inferior a 15% (aceitando-se 20% para amostras do LIQ). Para considerar o método exato nos testes de intra-ensaio e interensaio, o erro padrão relativo (EPR) deve ser igual ou inferior a 15% (aceitando-se 20% para amostras do LIQ). O EPR é calculado conforme a Equação 2.

$$\text{EPR} = \frac{(\text{Concentração média experimental} - \text{Valor nominal}) \times 100}{\text{Valor nominal}} \quad (2)$$

3.2.10 Estabilidade em matriz biológica

A estabilidade do método foi avaliada em amostras de plasma e urina branco enriquecidas em duas concentrações: 1,2 µg/mL (CQB) e 24 µg/mL (CQA) em plasma e 7,5 µg/mL (CQB) e 25 µg/mL (CQA) em urina. Para avaliação de estabilidade do método, foram analisadas triplicatas de cada amostra em uma única corrida analítica. As amostras são consideradas estáveis nas condições de armazenamento e do método analítico quando o erro padrão relativo (EPR) for igual ou inferior a 15%, calculado conforme a Equação 2.

A estabilidade de curta duração foi avaliada ao manter amostras de ambas as matrizes enriquecidas em temperatura ambiente (22°C) por 7 horas. Após este período, as amostras foram extraídas e analisadas. A estabilidade pós-processamento foi avaliada ao manter amostras preparadas de ambas as matrizes biológicas em temperatura na qual amostras estariam armazenadas para serem injetadas (18°C por 12 horas). Após este período, as amostras foram analisadas. Avaliou-se a estabilidade após 3 ciclos de congelamento e descongelamento, na qual as amostras enriquecidas foram congeladas a -70°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 quando as amostras foram extraídas e analisadas.

3.2.11 Estabilidade em solução

A estabilidade da GAB em solução foi avaliada ao se comparar área do pico de GAB (detectada por método em CLAE-UV) em solução padrão nas concentrações de 1 e 100 µg/mL de metanol utilizadas para construção da curva de calibração com área do pico de GAB de solução recém preparada, em triplicatas. A GAB em solução é considerada estável quando a diferença entre as médias das áreas não for maior que 10%.

3.3 Análise farmacocinética

A $ASC^{0-\infty}$ da GAB foi calculada pela quadratura de Gauss-Laguerre. As concentrações referentes aos tempos não coincidentes aos nós da quadratura foram estimadas por interpolação polinomial (AMISAKI, 2001). Diferentemente do método dos trapezóides, o método da quadratura de Gauss-Laguerre oferece resultados mais exatos e é uma metodologia confiável em desenhos de estudos farmacocinéticos com amostragem esparsa quando mais de uma amostra, mas não todas elas, são provenientes de um mesmo animal de experimentação (AMISAKI, 2001; NAVARRO-FONTESTAD et al., 2012). O clearance total aparente (CL_T/F) foi calculado pela Equação 3.

$$\frac{CL_T}{F} = \frac{Dose}{ASC^\infty} \quad (3)$$

A $C_{máx}$ e o $T_{máx}$ foram obtidos pela observação dos dados individuais. A $T_{1/2}$ foram calculados através das Equações 4 e 5, respectivamente.

$$T_{1/2} = \frac{0,693 \times V_d}{CL_T/F} \quad (4)$$

A quantidade excretada na urina de forma inalterada (Ae), a fração da dose excretada na urina de forma inalterada (Fel) e o clearance renal (CL_r) foram calculados através das Equações 5, 6 e 7, respectivamente.

$$Ae = \text{Concentração urinária} \times \text{Volume urinário (mL)} \quad (5)$$

$$Fel = Ae \times \text{dose administrada} \quad (6)$$

$$CL_r = \frac{Fel \times CL_T}{F} \quad (7)$$

3.4 Análise estatística

Os testes estatísticos foram realizados com auxílio do *software* GraphPadInstat® (GraphPad Software, Califórnia, EUA) para obtenção da média, desvio padrão, mediana, percentis e erro padrão da média (EPM). Os dados foram apresentados através das medianas e percentis 25 e 75. Os parâmetros farmacocinéticos foram comparados entre os grupos usando intervalos de confiança de 95%. A variância foi estimada considerando a amostragem esparsa (AMISAKI, 2001; NAVARRO-FONTESTAD et al., 2012).

4. RESULTADOS

Os intervalos de concentração das curvas analíticas foram selecionados com base em estudo piloto, no qual GAB foi administrada na dose de 50 mg/kg via gavagem em ratos (n=3). Os métodos de análise da GAB em plasma e urina de ratos mostraram-se lineares nos intervalos de 0,6 a 30 µg/mL e de 3 a 30 µg/mL, respectivamente, com o uso da ponderação $1/x^2$. Utilizou-se a regressão linear entre a razão de áreas GAB/padrão interno $\times$ concentração e a ponderação $1/x^2$ (ALMEIDA; CASTEL-BRANCO; FALCÃO, 2012; DA SILVA; EMÍDIO; MARCHI, 2015) para avaliação da linearidade nos intervalos de concentrações supracitados (Figura 11-A; Figura 11-C). O método foi considerado linear quando as concentrações da curva analítica apresentaram erro padrão relativo menor que 15% (Figura 11-B; Figura 11-D).

Figura 91 - Curva analítica da gabapentina utilizando a ponderação $1/x^2$ em plasma (A) e urina (C). Plot do erro padrão relativo x concentração do método de determinação de gabapentina em plasma (B) e urina (D) de ratos.

(A)

(C)

(B)

(D)

Nota: Coluna de fase reversa LiChrospher® C18 RP com pré-coluna LiChroCART® 4-4 Purospher® RP-18, mantidas a 25°C. Para o método em plasma, utilizou-se fase móvel constituída por mistura de acetato de amônio 5 mM (pH 4,0) e metanol (40:60, v/v) com fluxo de 0,4 mL/min, em modo isocrático e detecção por espectrometria de massas (monitorados na razão m/z de 172 para gabapentina e 180 para fenacetina). Para o método em urina, utilizou-se fase móvel constituída por mistura de fosfato de sódio 50 mM (pH 3,9) e metanol (27:73, v/v), com fluxo de 1,2 mL/min em modo isocrático e detecção por ultravioleta a 360 nm.

O efeito matriz foi considerado ausente no método de determinação de GAB em plasma de rato, por não apresentar coeficiente de variação maior que 15% do FMN (Tabela 4).

Os métodos de determinação da GAB em plasma e urina não apresentaram efeito residual e apresentaram seletividade aceitável por não possuir picos interferentes próximos ao tempo de retenção da GAB com áreas maiores que 20% da área do LIQ e 5% da área do padrão interno (Figuras 12 e 13). Os métodos desenvolvidos e validados permitiram a determinação da GAB em plasma e urina de rato até 12 horas após a administração de GAB 50 mg/kg por gavagem em ratos.

Tabela 4 - Estudo do efeito matriz, em seis fontes distintas de plasma de rato, avaliado como coeficiente de variação do fator de matriz normalizado por padrão interno (FMN).

Concentração	CQB (1,2 µg/mL)	CQA (24 µg/mL)
CV (%)	12,53	8,68

Nota: **CV:** Coeficiente de variação (desvio padrão/média) x 100; **CQB:** Controle de qualidade de baixa concentração; **CQA:** Controle de qualidade de alta concentração. **FMN:** (Resposta do analito em matriz/Resposta do PI em matriz)/(Resposta do analito em solução/Resposta do PI em solução)

Figura 10 - Cromatogramas referentes à determinação de gabapentina em plasma de ratos por CLAE-EM. Foram monitoradas as razões m/z 172 para gabapentina e 180 para fenacetina (padrão interno).

Nota: Cromatogramas monitorados na razão m/z de 172 (A, B e C) para gabapentina e 180 (D e E) para fenacetina. Cromatograma de plasma branco (A e D); plasma enriquecido com gabapentina (limite inferior de quantificação - 0,6 $\mu\text{g/mL}$) e fenacetina (10 $\mu\text{g/mL}$) (B e E); Determinação de gabapentina em plasma de rato coletado após 10h de administração de dose única de gabapentina 50 mg/kg, via gavagem (C). **1** – gabapentina; **2** - fenacetina

Figura 11 - Cromatogramas referentes à determinação de gabapentina (1) em amostras de urina de ratos por CLAE-UV, com detecção a 360 nm.

(A)

(B)

(C)

(D)

Nota: Cromatograma de urina branco (A), de urina enriquecida com gabapentina no limite inferior de quantificação (3,0 µg/mL) (B), de urina enriquecido com anlodipino (2) (200 µg/mL) (C) e de determinação de gabapentina em amostra de urina de rato, no intervalo de 0 a 4 horas após administração de dose única de gabapentina 50 mg/kg, via gavagem (D).

A estabilidade da GAB em solução, avaliada pela comparação da média de áreas do pico da GAB entre solução estoque utilizada para preparo das soluções de trabalho e solução estoque recém preparada após quatro meses da anterior, não apresentou variação maior que 10% nas duas concentrações analisadas, garantindo a estabilidade do padrão em solução por quatro meses (Tabela 5).

A estabilidade da GAB em matriz, avaliada em três modalidades (curta duração, pós-processamento e após três ciclos de congelamento e descongelamento) apresentaram porcentagens de erro padrão relativo inferiores a 15%, garantindo a estabilidade das amostras de plasma e urina sob as condições de armazenamento, tempo de preparo de amostra e análise (Tabelas 6 e 7).

Os métodos foram considerados precisos e exatos, uma vez que os coeficientes de variação e erros padrão relativos foram inferiores a 15%, respectivamente, nas cinco concentrações de controle de qualidade avaliadas em cada método (Tabela 6 e 7).

Tabela 5 - Estudo de estabilidade de gabapentina em solução.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Média das áreas de solução utilizadas no estudo	Média das áreas de solução recém preparada	Variação (%)
1 $\mu\text{g/mL}$	34.551	37.827	10,08
100 $\mu\text{g/mL}$	2.701.633	2.973.947	9,48

Tabela 6 - Parâmetros de validação analítica do método de determinação da gabapentina em plasma de ratos.

Linearidade (0,6 -30 µg/mL)	$y = 0,3112x - 0,1236$
r	0,9948
Precisão intra-ensaio (CV%, n=5)	
LIQ (0,6 µg/mL)	10,45
CQB (1,2 µg/mL)	14,56
CQM (15 µg/mL)	2,46
CQA (24 µg/mL)	11,36
CQD (52,2 µg/mL)	9,47
Precisão interensaios (CV%, n=3)	
LIQ (0,6 µg/mL)	13,75
CQB (1,2 µg/mL)	13,72
CQM (15 µg/mL)	12,04
CQA (24 µg/mL)	13,25
CQD (52,2 µg/mL)	13,96
Exatidão intra-ensaio (EPR%, n=5)	
LIQ (0,6 µg/mL)	-1,41
CQB (1,2 µg/mL)	0,39
CQM (15 µg/mL)	10,73
CQA (24 µg/mL)	7,07
CQD (52,2 µg/mL)	-3,18
Exatidão interensaio (EPR%, n=3)	
LIQ (0,6 µg/mL)	5,91
CQB (1,2 µg/mL)	2,31
CQM (15 µg/mL)	11,35
CQA (24 µg/mL)	8,68
CQD (52,2 µg/mL)	-8,13
Estabilidade (EPR%, n=3)	
Curta duração (7h a 22°C)	
CQB (1,2 µg/mL)	3,72
CQA (24 µg/mL)	6,13
Pós-processamento (12h a 18° C)	
CQB (1,2 µg/mL)	2,98
CQA (24 µg/mL)	3,21
Congelamento/descongelamento (3 ciclos)	
CQB (1,2 µg/mL)	10,72
CQA (24 µg/mL)	-0,98

Nota: **CV:** coeficiente de variação (desvio padrão/média) x 100; **r:** coeficiente de correlação linear; **EPR:** erro padrão relativo [(concentração média experimental – valor nominal)/valor nominal] x 100; **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.

Tabela 7 - Parâmetros de validação analítica do método de determinação da gabapentina em urina de ratos.

Linearidade (3,0 -30 µg/mL)	$y = 0,0354x + 0,0365$
r	0,9966
Precisão intra-ensaio (CV%, n=5)	
LIQ (0,6 µg/mL)	11,24
CQB (1,2 µg/mL)	10,93
CQM (15 µg/mL)	7,63
CQA (24 µg/mL)	3,03
CQD (52,2 µg/mL)	10,77
Precisão interensaios (CV%, n=3)	
LIQ (0,6 µg/mL)	12,57
CQB (1,2 µg/mL)	7,15
CQM (15 µg/mL)	10,46
CQA (24 µg/mL)	10,56
CQD (52,2 µg/mL)	12,70
Exatidão intra-ensaio (EPR%, n=5)	
LIQ (0,6 µg/mL)	-13,94
CQB (1,2 µg/mL)	-3,11
CQM (15 µg/mL)	4,62
CQA (24 µg/mL)	6,61
CQD (52,2 µg/mL)	10,01
Exatidão interensaio (EPR%, n=3)	
LIQ (0,6 µg/mL)	-8,49
CQB (1,2 µg/mL)	-1,82
CQM (15 µg/mL)	5,67
CQA (24 µg/mL)	12,30
CQD (52,2 µg/mL)	3,45
Estabilidade (EPR%, n=3)	
Curta duração (7h a 22°C)	
CQB (1,2 µg/mL)	8,28
CQA (24 µg/mL)	13,94
Pós-processamento (12h a 18° C)	
CQB (1,2 µg/mL)	-8,67
CQA (24 µg/mL)	12,18
Congelamento/descongelamento (3 ciclos)	
CQB (1,2 µg/mL)	7,76
CQA (24 µg/mL)	12,61

Nota: CV: coeficiente de variação (desvio padrão/média) x 100; r: coeficiente de correlação linear; EPR: erro padrão relativo [(concentração média experimental – valor nominal)/valor nominal] x 100; 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.

O modelo de DME induzido por STZ resultou em apenas um rato que não foi considerado diabético (glicemia fora do jejum menor que 300 mg/dL). Nos dias seguintes à dose de STZ, os animais do grupo DM apresentaram menor taxa de ganho de peso quando comparados aos demais grupos. Além disso, sinais de *diabetes* como polidipsia e poliúria foram observados em ambos os grupos diabéticos, quando comparados com animais de outros grupos.

Nenhum dos animais apresentou os efeitos adversos ataxia ou sonolência (FOLKESSON et al., 2010) após receberem 50 mg/kg de GAB.

A administração de dose única de GAB 50 mg/kg em ratos Wistar machos resultou em valores (média $\pm$ desvio padrão) de $ASC^{0-\infty}$, $C_{m\acute{a}x}$, $T_{m\acute{a}x}$, CL_T/F , $t_{1/2}$, CL_r e Fel de $96,31 \pm 12,28 \mu g.h/mL$, $24,75 \pm 9,26 \mu g/mL$, $3,66 \pm 1,11 h$, $0,52 \pm 0,07 L/h.kg$, $0,25 \pm 0,07 L/h.kg$ e $0,48 \pm 0,13$, respectivamente. Os parâmetros $ASC^{0-\infty}$, $C_{m\acute{a}x}$, $T_{m\acute{a}x}$, CL_T/F , $t_{1/2}$, CL_r e Fel não foram alterados após a administração simultânea de GAB e cimetidina ou GAB e metformina (Figuras 14-16; Tabela 8).

O grupo DM resultou em maior Fel quando comparado ao grupo controle: $0,83 \pm 0,25 \times 0,48 \pm 0,13$, respectivamente. O grupo DMI também resultou em maior Fel ($0,85 \pm 0,10$) e maior CL_r quando comparado ao grupo GAB: $0,55 \pm 0,10 L/h.kg \times 0,25 \pm 0,07 L/h.kg$, respectivamente (Figuras 14-16; Tabela 8).

Tabela 8 - Parâmetros farmacocinéticos da gabapentina após dose única de 50 mg/kg (gavagem). Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão (intervalo de confiança de 95%).

	Grupos experimentais				
	Controle	Cimetidina	Metformina	Diabético	Diabético tratado com insulina
ASC^{0-∞} (μg.h/mL)	96,31 $\pm$ 12,28 (86,48-106,13)	93,44 $\pm$ 27,48 (71,46-115,42)	110,90 $\pm$ 14,51 (99,29-122,51)	110,55 $\pm$ 34,29 (47,21-113,97)	80,59 $\pm$ 41,73 (83,16-137,97)
C_{máx}(μg/mL)	24,75 $\pm$ 9,26 (33,39-16,11)	26,26 $\pm$ 7,96 (32,62-19,9)	28,01 $\pm$ 7,70 (34,17-21,85)	24,02 $\pm$ 4,11 (27,30-20,74)	29,52 $\pm$ 5,43 (33,86-25,18)
T_{máx}(h)	3,66 $\pm$ 1,11 (2,77-4,54)	4,16 $\pm$ 1,34 (3,08-5,23)	4,83 $\pm$ 2,27 (3,01-6,64)	2,95 $\pm$ 1,49 (1,25-3,32)	2,95 $\pm$ 1,49 (1,75-4,14)
CL_{T/F} (L/h.kg)	0,52 $\pm$ 0,07 (0,46-0,57)	0,54 $\pm$ 0,12 (0,44-0,63)	0,45 $\pm$ 0,07 (0,38-0,51)	0,45 $\pm$ 0,17 (0,31 – 0,58)	0,62 $\pm$ 6,77 (-4,79-6,03)
t_{1/2} (h)	2,72 $\pm$ 0,37 (2,30-3,14)	2,52 $\pm$ 0,22 (2,26-2,77)	1,99 $\pm$ 1,03 (0,56-3,42)	2,87 $\pm$ 0,48 (2,32-3,42)	3,18 $\pm$ 0,83 (2,23-4,14)
CL_r (L/h.kg)	0,25 $\pm$ 0,07 (0,18-0,30)	0,34 $\pm$ 0,10 (0,28-0,43)	0,27 $\pm$ 0,04 (0,24-0,30)	0,36 $\pm$ 0,12 (0,28-0,47)	0,55 $\pm$ 0,10 (0,45-1,43)*
Fel	0,48 $\pm$ 0,13 (0,38-0,58)	0,64 $\pm$ 0,19 (0,51-0,80)	0,60 $\pm$ 0,07 (0,13-0,53)	0,83 $\pm$ 0,25 (0,62-1,04)*	0,85 $\pm$ 0,10 (0,77-0,93)*

Nota: Grupo controle e grupo diabético: dose única de gabapentina 50 mg/kg, via gavagem; n=6 por tempo de coleta; Grupo cimetidina: dose única de gabapentina 50 mg/kg, via gavagem e cimetidina 100 mg/kg, via intraperitoneal; n=6 por tempo de coleta; Grupo metformina: dose única de gabapentina 50 mg/kg, via gavagem e metformina 100 mg/kg, via oral; n=6 por tempo de coleta; Grupo diabetes tratado com insulina: insulina 2 UI, duas vezes por dia, por 15 dias, via subcutânea e dose única de gabapentina 50 mg/kg, via gavagem; n=6; **ASC^{0-∞}**: área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo extrapolada ao infinito; **C_{máx}**: concentração plasmática máxima; **T_{máx}**: Tempo para atingir C_{máx}; **T_{1/2}**: meia vida de eliminação; **CL_{T/F}**: clearance total aparente; **Fel**: Fração excretada na urina de forma inalterada; **CL_r**: Clearance renal. *Diferença estatística comparando-se intervalos de confiança 95% em relação ao Grupo Controle. *Diabetes mellitus* experimental induzido por estreptozotocina 40 mg/kg via intravascular.

Figura 12 - Curvas de concentração plasmática versus tempo de gabapentina após dose única de gabapentina 50 mg/kg via gavagem (n = 6 por tempo de coleta).

Grupo controle e grupo diabetes (DM): dose única de gabapentina 50 mg/kg, via gavagem; **Grupo cimetidina:** dose única de gabapentina 50 mg/kg, via gavagem e cimetidina 100 mg/kg, via intraperitoneal; **Grupo metformina:** dose única de gabapentina 50 mg/kg, via oral e metformina 100 mg/kg, via oral; **Grupo diabetes tratado com insulina (DMI):** insulina 2 UI, duas vezes por dia, por 15 dias, via subcutânea. *Diabetes mellitus* experimental induzido por estreptozotocina 40 mg/kg via intravascular.

Figura 13 - Quantidade de gabapentina excretada acumulada (mg) em urina (n = 6, por tempo de coleta), por intervalo de tempo após dose única de gabapentina 50 mg/kg via gavagem.

Nota: Grupo controle e grupo diabetes (DM): dose única de gabapentina 50 mg/kg, via gavagem; Grupo cimetidina: dose única de gabapentina 50 mg/kg, via gavagem e cimetidina 100 mg/kg, via intraperitoneal; Grupo metformina: dose única de gabapentina 50 mg/kg, via oral e metformina 100 mg/kg, via oral; Grupo diabetes tratado com insulina (DMI): insulina 2 UI, duas vezes por dia, por 15 dias, via subcutânea. *Diabetes mellitus* experimental induzido por estreptozotocina 40 mg/kg via intravascular.

Figura 14 - Diagrama de caixa dos parâmetros farmacocinéticos dos grupos experimentais após administração de dose única de gabapentina 50 mg/kg via gavagem.

Nota: A linha dentro de cada caixa indica a mediana. Os percentis 25 e 75 são indicados nas linhas inferiores e superiores de cada caixa, respectivamente. As barras de erro definem os valores mínimos e máximos. **Grupo controle e grupo diabetes (DM):** dose única de gabapentina 50 mg/kg, via gavagem; **Grupo cimetidina (GC):** dose única de gabapentina 50 mg/kg, via gavagem e cimetidina 100 mg/kg, via intraperitoneal; **Grupo metformina (GM):** dose única de gabapentina 50 mg/kg, via gavagem e metformina 100 mg/kg, via gavagem; **Grupo diabetes tratado com insulina (DMI):** insulina 2 UI, duas vezes por dia, por 15 dias, via subcutânea. *Diabetes mellitus* experimental induzido por estreptozotocina 40 mg/kg via intravascular. *Diferença estatística comparando-se intervalos de confiança 95% em relação ao Grupo Controle.

5. DISCUSSÃO

O estudo em pauta descreve o impacto da cimetidina (inibidor de OCT2), da metformina (substrato de OCT2) e do *diabetes mellitus* experimental na disposição cinética da GAB em ratos. Este trabalho exigiu o desenvolvimento e validação de métodos analíticos para determinação de GAB em plasma e urina de ratos. Estes resultados foram recentemente publicados na revista *Life Science* (BENZI et al., 2018).

Diversos métodos cromatográficos para determinação de GAB em fluidos biológicos são descritos na literatura. A maioria deles utiliza cromatografia líquida de alta eficiência e detecção por espectrometria de massas (KUSHNIR et al., 1991; IFA et al., 2001; CARLSSON e REUBSAET, 2003; MATAR; HAMID-ABDEL, 2005; JI et al., 2006; RAMAKRISHNA et al., 2006; PARK et al., 2007; WATTANANAT; AKARAWUT, 2009; OERTEL et al., 2009; JUENKE et al., 2011; CHAHBOUNI et al., 2013) fluorescência (FORREST et al., 1996; NEVILLE; PATSALOS, 1998; JIANG; SHUGUANG, 1999; TANG et al., 1999; CHOLLET et al., 2000; BELAL ET AL., 2002; GAUTHIER; GUPTA, 2002; KRIVANEK; KOPPATZ; TURNHEIM, 2003; CHAN; WANG, 2004; VERMEIJ; EDELBROEK, 2004; BAHRAMI et al., 2006; CHUNG; TAI; WU, 2006; BAHRAMI; MOHMMADI, 2006; MERCOLINIM et al., 2010; MARTINC et al., 2014) ou ultravioleta (ZHU; NEIRINCK, 2002; BERRY ET al., 2003; WAD; KRÄMER, 2005; SAGIRLI; ÇETIN; ÖNAL, 2006; EBRAHIMZADEH, et al., 2006; JALALIZADEH, et al., 2007). A cromatografia gasosa já foi utilizada na determinação da GAB (HOOPER; KAVANAGH; DICKINSON, 1990; KUSHNIR et al., 1991; WOLF; SAADY; POKLIS, 1996; BORREY et al., 2005; GAMBELUNGHE et al., 2005). A técnica de eletroforese capilar também já foi empregada na determinação da GAB (CHANG; WANG, 2004).

A GAB e os padrões internos foram separados em coluna de fase reversa LiChrospher® C18 RP, com tempo de corrida analítica inferior a 13 minutos. Outros estudos utilizam colunas de fase estacionárias de cadeia carbônicas menores como C8 ou C4 (IFA et al., 2001; CARLSSON; REUBSAET, 2003; WATTANANAT; AKARAWUT, 2009; MARTINC et al., 2014).

A GAB foi extraída do plasma e urina de ratos utilizando a técnica de *salting-out* com sulfato de sódio e mistura de diclorometano:n-butanol (1:1 v/v) com solvente extrator. Outros solventes utilizados como éter metil terc-butil, isopropanol, clorofórmio, éter dietílico e acetato de etila resultaram em baixa recuperação de GAB e padrão interno ou presença de interferentes nos tempos de retenção destes analitos. Outros autores utilizam como metodologia de preparo de amostra a precipitação protéica (CARLSSON; REUBSAET, 2003; IFA et al., 2001; JI et al.,

2006; PARK et al., 2007; WATTANANAT; AKARAWUT, 2009; JÜENKE et al., 2011) ou extração em fase sólida (ZHU; NEIRINCK, 2002; MERCOLINIM et al., 2010; MARTINC et al., 2014). Durante o desenvolvimento deste método, testes utilizando precipitação de proteínas como preparo da amostra resultaram em interferentes no tempo de retenção da GAB.

Embora os métodos desenvolvidos e validados neste estudo apresentaram menor detectabilidade quando comparados com outros (IFA et al., 2001; CARLSSON; REUBSAET, 2003; WATTANANAT; AKARAWUT, 2009), os limites de quantificação foram compatíveis com a determinação GAB em ambas as matrizes até 12 h após administração de dose única de GAB 50 mg/kg.

O presente estudo buscou avaliar o impacto da atividade do transportador OCT2 na disposição da GAB através da avaliação da interação entre GAB e do inibidor de OCT2 cimetidina em ratos. Os parâmetros farmacocinéticos dose independentes da GAB, CL e $T_{1/2}$ foram semelhantes aqueles observados em estudos prévios com ratos tratados com doses de 10-200 mg/kg GAB (RADULOVIC et al., 1992; FOLKESSON et al., 2010; LARSEN et al., 2015) (Figuras 14-16; Tabelas 1 e 8). Os parâmetros farmacocinéticos da GAB $ASC^{0-\infty}$, $C_{\max}$, $T_{\max}$, $t_{1/2}$, CL_T/F , CL_r e F_{el} não foram alterados após a coadministração de GAB 50 mg/kg via gavagem e cimetidina 100 mg/kg via intraperitoneal em ratos (Grupo Cimetidina) (Figuras 14-16; Tabela 8).

Por não apresentar metabolismo hepático, não se ligar às proteínas plasmáticas e por ser eliminada exclusivamente por via renal, não espera-se observar freqüentes interações medicamentosas envolvendo a GAB. Dados da literatura sugerem que interações fármaco-fármaco envolvendo a GAB ocorrem na etapa da absorção ou da eliminação renal. O hidróxido de magnésio, fármaco utilizado para tratar constipação induzida por opióides, reduz o $C_{\max}$ e ASC da GAB em 30-40% (YAGI et al., 2012). Já o uso concomitante de omeprazol não altera $C_{\max}$ e ASC da GAB, e, portanto, a interação do hidróxido de magnésio pode ser atribuída a alterações na absorção intestinal, já que o omeprazol reduz de forma mais potente a acidez estomacal (YAGI et al., 2012).

Outro estudo relata a interação de GAB com morfina em voluntários sadios. A administração concomitante de 60 mg de sulfato de morfina e 600 mg de GAB por via oral resultou em aumento na ASC e redução do CL_T/F e do CL_r da GAB. As

alterações na disposição cinética da GAB podem ser explicadas pelo aumento da absorção intestinal e/ou pela redução da eliminação renal (ECKHARDT et al., 2000).

A interação GAB x cimetidina resultou em redução do clearance da GAB em estudo clínico no qual voluntários sadios foram tratados com doses diárias de 1.200 mg de GAB enacarbil, um pró-fármaco da GAB, e quatro doses diárias de 400 mg de cimetidina, por quatro dias. Os dados apresentados evidenciam a diminuição no CL_r e aumento na ASC^{ss} da GAB. Os autores sugeriram que a interação estudada é mediada por OCT2. Entretanto, estes resultados não foram considerados de relevância clínica e não houve recomendação de ajuste de dose na interação (LAL, et al. 2010). Os achados deste estudo corroboram os dados observados por LAL et al., (2010), demonstrando que a inibição de OCT2 causado pela cimetidina não foi significativa para alterar a disposição cinética da GAB em ratos.

Ademais, a interação GAB x metformina foi avaliada uma vez que este último é o fármaco de escolha para o tratamento do *diabetes mellitus* tipo 2 e substrato de OCT2. A prevalência de dor neuropática em pacientes diabéticos é de 66% nos pacientes com *diabetes* dependente de insulina e de 59% nos não dependentes de insulina (SADOSKY et al., 2008). Logo, o uso concomitante de GAB e metformina é frequente para o alívio da dor neuropática diabética, principalmente para os pacientes com diabetes tipo 2 (KIMURA et al., 2005; SONG; SHIN; SHIN; 2008; YOON et al., 2013; WANG et al., 2008; HACKER et al., 2015). A investigação dessa interação justifica-se na hipótese do presente trabalho da participação de OCT2 na disposição cinética da GAB. Apesar da metformina não ser inibidor de OCT2, ela é considerada substrato modelo e recomendada pelo *International Transporter Consortium* para a investigação de interações fármaco-fármaco envolvendo OCT2 (CONSORTIUM, et al., 2010; HACKER et al., 2015).

A ausência de alteração nos parâmetros farmacocinéticos entre o Grupo Controle e o Grupo Metformina demonstram a ausência de interação entre GAB e metformina, quando administrados na dose única de 50 mg/kg, em ratos (Figuras 14-16; Tabela 8).

O presente estudo descreve pela primeira vez o impacto do DME e da administração de insulina na disposição cinética da GAB em ratos. O Grupo diabético apresentou aumento do CL_r , enquanto o Grupo Diabético tratado com insulina apresentou aumento do CL_r e F_{el} , se comparados ao Grupo Controle (Figuras 14-16; Tabela 8). Os demais parâmetros farmacocinéticos da GAB $ASC^{0-\infty}$,

$C_{\text{máx}}$, $T_{\text{máx}}$, $t_{1/2}$, CL_T/F não foram alterados 15 dias após a indução do *diabetes mellitus* experimental tratado ou não com insulina.

Devido à excreção da GAB ser exclusivamente realizada pelos rins, alterações na função renal explicam parcialmente a variabilidade na disposição cinética da GAB. Em estudo observacional de 729 prontuários, pacientes com doença renal crônica apresentam maiores concentrações plasmáticas de GAB, com a elevação da concentração proporcional a severidade da doença (ZAND et al., 2010).

Asconapé (2014) sugere diferentes posologias da GAB em condições de doença renal em função da taxa de filtração glomerular. Devido ao CL_r da GAB poder ser relacionado ao da creatinina, menores doses são indicadas para indivíduos com redução na taxa de filtração glomerular. Consequentemente, em condições mais severas de doença renal, o uso da GAB deve ser evitado ou a hemodiálise pode ser requerida para completa eliminação da GAB (ASCONAPE, 2014; MOLEDINA; WILSON, 2015).

A influência da função renal (avaliado por CL_{cr}) no CL da GAB foi demonstrada por LAL et al., (2012) por análise farmacocinética populacional. Foram combinados dados de 12 estudos de pacientes com diferentes graus de disfunção renal, que utilizavam GAB enacarbil, para o tratamento da síndrome de pernas inquietas. O modelo sugere variação de CL da GAB de 1,70 L/h em condições de CL_{cr} de 15 mL/min a 6,94 L/h em condições de CL_{cr} de 120 mL/min (LAL et al., 2012).

O risco de toxicidade da GAB em pacientes com insuficiência renal é subestimado (ZAND et al., 2010). A literatura apresenta relatos de casos de toxicidade relacionados à GAB como miotoxicidade, rabdomiólise, mioclonia e doença renal aguda (TORREGROSA-DE JUAN, et al., 2012; KAUFMAN et al., 2014).

Estudos in vivo realizados por Ji et al. (2002) e Habu et al., 2003 sugerem que a insuficiência renal crônica, através do modelo de nefrectomia de 5/6 do rim de ratos e a hiperuricemia, primeira manifestação clínica de gota e associada com doenças renais, respectivamente, deprimem a expressão de Oct2. A baixa concentração de testosterona em condições de insuficiência renal crônica foi responsável pela inibição da expressão de Oct2 e consequentemente da excreção renal de cimetidina (JI et al., 2012).

Nowicki et al. (2008) e Grover et al. (2004) descreveram redução de 50 a 70% nos níveis de Oct2 em ratos com DME induzido por estreptozotocina. Thomas et al.

(2003; 2004) demonstraram, também em ratos com DME induzido por estreptozotocina, a redução de síntese de RNAm e de expressão dos transportadores Oct1, Oct2 e Oct3, bem como redução no CL de N-metil-nicotinamida (NMN), substrato de OCTs. Tais alterações podem ser explicadas pela redução de fluxo sanguíneo renal associado ao *diabetes*, enquanto a redução de expressão é associada a produtos finais da glicação avançada nos túbulos renais. Por outro lado, Baraldi et al. (2012) demonstraram que a DM tipo 2 não alterou a disposição cinética da metformina, fármaco substrato de OCT2, em gestantes. Até o presente momento, não há dados na literatura referentes à influência do DM na disposição cinética da GAB.

Apesar da evidencia da redução de expressão de Oct2 pelo DME induzido pela administração intravenosa de STZ (THOMAS 2003; 2004; GROVER et al., 2004; NOWICKI et al., 2008), as condições experimentais usadas para a indução do diabetes foram ligeiramente diferentes em termos da dose e do tempo do estado de doença (Tabela 9). A dose de STZ utilizada neste estudo é reconhecida como efetiva para indução do DME (RADENKOVIC; STOJANOVIC; PROSTRAN; 2016). Entretanto, os modelos experimentais que apresentaram redução da expressão de OCT2 tiveram pelo menos 4 semanas de doença instalada (Tabela 9). Embora o modelo de DME usado neste estudo seja considerado mais brando quando comparado com outros da literatura, a ausência de diferença nos parâmetros farmacocinéticos entre o Grupo Cimetidina e Metformina e o Grupo Controle sugerem que a contribuição de OCT2 não é relevante para a farmacocinética do GAB.

Tabela 9 - Comparação dos modelos de *diabetes mellitus* experimental utilizados para avaliação da expressão de OCT2 com o modelo do presente estudo.

Dose de estreptozotocina	Período de estudo	Condição alimentar	Tratamento com insulina	Estudo
55 mg/kg, iv	24 semanas	Jejum <i>overnight</i>	2 unidades	1
55 mg/kg, iv	4 semanas e 32 semanas	Jejum <i>overnight</i>	2 unidades; No estudo de 32 semanas, ratos receberam adicionalmente aminoguanidina 1 g/L até 4 g/L em água.	2
65 mg/kg, iv	6 semanas	Jejum <i>overnight</i>	40 U/kg	3
45 mg/kg, iv	10 dias	14 dias de dieta hiper calórica previamente a dose de STZ	-	4
40 mg/kg, iv	15 dias	Jejum <i>overnight</i>	4 unidades	Estudo atual

Nota: I.V.: administração intravascular; STZ: estreptozotocina; [1] – Thomas et al., 2003; [2] – Thomas et al., 2004; [3] – GROVER et al., 2004; [5] – NOWICKI et al., 2008;

A glicose plasmática foi medida em condições de jejum e pós-prandial em ratos diabéticos e não diabéticos. Após 15 dias de experimento, ratos não diabéticos apresentaram glicemia de jejum e pós-prandial de 80-90 e 120-140 mg/dL, respectivamente. Animais diabéticos (15 dias pós-STZ) geralmente apresentam níveis de glicemia de jejum e pós-prandial de 250-350 e 450-600 mg/dL, respectivamente. O impacto da insulina na glicemia pós-prandial em animais diabéticos é a normalização quando 2UI/rato são administradas duas horas antes da coleta de sangue resultando em glicemias entre 90-110 mg/dL. Devido ao risco de hipoglicemia, a insulina não foi administrada a animais não diabéticos. O impacto da metformina na glicemia pós-prandial em animais diabéticos é menor e não afeta a concentração sérica de insulina em ratos não diabéticos (CHOI et al., 2006). Várias investigações de interação medicamentosa utilizaram a metformina em animais não diabéticos (CHOI et al., 2006; MAA et al., 2007; GABR et al., 2017), mesmo em doses múltiplas (CHOI et al., 2006).

O aumento na Fel no Grupo Diabético e Diabético tratado com insulina ($0,83 \pm 0,25$ e $0,85 \pm 0,10$, respectivamente) quando comparados com o Grupo Controle ($0,48 \pm 0,13$), bem como o aumento do CL_r do Grupo Diabético tratado com insulina ($0,55 \pm 0,10$ L/h·kg) quando comparado com o Grupo Controle ($0,25 \pm 0,07$ L/h·kg) podem ser explicados pelo desenvolvimento de hiperfiltração glomerular devido ao

aumento no fluxo sanguíneo renal causado pelo *diabetes* e pelo tratamento com insulina (IGLESIAS; DÍEZ; 2008; PIHL et al., 2012). PIHL et al., (2012) investigaram os mecanismos de hiperfiltração renal em ratos diabéticos tratados e não tratados com insulina. Em ambos os grupos, houve aumento da filtração glomerular e do fluxo sanguíneo renal. Entretanto, apenas o grupo tratado com insulina demonstrou uma correlação entre filtração glomerular e fluxo renal sanguíneo (R_2 : 0,81; $P < 0,0001$). Este mecanismo corrobora com a hipótese de que a filtração glomerular é o principal processo envolvido na eliminação renal da GAB.

Uma possível limitação do estudo seria a falta de especificidade da cimetidina ao inibir o Oct2. ITO et al., (2011) sugerem por meio de estudos *in vitro* e em ratos que a inibição causada pela cimetidina na secreção renal dos túbulos proximais se dá preferencialmente nos transportadores MATE1 e MATE2 em detrimento da inibição de OCT2. A constante de inibição (K_i) da cimetidina para os transportadores da família MATE foram menores quando comparados ao K_i do OCT2 humano e de rato. Entretanto, a cimetidina inibe OCT2 após a administração de 100 mg/kg por via intraperitoneal em ratos (ADEDYOYIN; AARONS; HOUSTON, 1987; ITO et al., 2011). Adicionalmente, a cimetidina vem sendo utilizada com sucesso em estudos semelhantes onde a inibição do OCT2 é requerida para se avaliar a via de eliminação de fármacos (NADAI et al., 2007; LI et al., 2015), bem como demonstrou inibição da secreção tubular de metformina, fármaco modelo para estudo de interações via OCT2 em humanos (WANG et al., 2008; EBNER; ISHIGURO; TAUB, 2015; STOPFER et al., 2018).

Conclui-se que, embora estudos sugiram a participação de transporte ativo (OCT2) na excreção renal da GAB e que o *diabetes mellitus* experimental reduz a expressão de OCT2, os dados deste trabalho mostram que o inibidor de OCT2 cimetidina e o substrato de OCT2 metformina não alteram a disposição cinética da GAB. As diferenças encontradas em animais diabéticos e diabéticos tratados com insulina sugerem que a filtração glomerular, e não o transporte ativo por OCT2 é o principal processo na eliminação renal da GAB.

6. CONCLUSÕES

- Os métodos de determinação de GAB em plasma e urina de ratos empregando-se CLAE-EM e CLAE-UV, respectivamente, apresentaram parâmetros de validação compatíveis com a aplicação em estudo de farmacocinética em ratos tratados com dose única de 50 mg/kg de GAB.
- O inibidor de OCT2 cimetidina (100 mg/kg, via intraperitoneal) e o substrato de OCT2 metformina (100 mg/kg, via gavagem) não alteraram a disposição cinética da GAB avaliada pelos parâmetros $ASC^{0-\infty}$, $C_{máx}$, $T_{máx}$, $t_{1/2}$, CL_T/F , CL_r e Fel em ratos tratados com 50 mg/kg de GAB (via gavagem), sugerindo que o transporte ativo por OCT2 não é relevante para a disposição cinética da GAB.
- O *diabetes mellitus* experimental induzido pela estreptozotocina (STZ, 40 mg/kg, i.v) aumentou em 43% a Fel da GAB em ratos, sem alteração dos demais parâmetros farmacocinéticos $ASC^{0-\infty}$, $C_{máx}$, $T_{máx}$, $t_{1/2}$, CL_T/F , CL_r .
- O *diabetes mellitus* experimental induzido pela estreptozotocina e tratado com insulina resultou em aumento de 43% no Fel e 45% no CL_r GAB em ratos, sem alteração dos demais parâmetros farmacocinéticos.
- A hiperfiltração glomerular induzida pela *diabetes mellitus* experimental e pela administração de insulina sugerem que a filtração glomerular é o principal processo na eliminação renal da GAB em ratos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEDOYIN, A.; AARONS, L.; HOUSTON, J. B. Dose-dependent pharmacokinetics of cimetidine in the rat. **Xenobiotica**, v. 17, n. 5, p. 595–604, 1987.

ADRIAENSEN, H. et al. Critical review of oral treatments for diabetic neuropathic pain - clinical outcomes based on efficacy and safety data from placebo - controlled and direct comparative studies. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 21, p. 213-240, 2005.

ALMEIDA, A. M.; CASTEL-BRANCO, M. M.; FALCÃO, A. C.; Linear regression for calibration lines revised: weighting schemes for bioanalytical methods. **Journal of Chromatography B**, v. 774, p. 215-222, 2002.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Classification and diagnosis, **Diabetes Care**, v. 38, supl.1, p. S8-S16, 2015.

ANIMAW, W.; SEYOUM, Y. Increasing prevalence of diabetes mellitus in a developing country and its related factors. **PLoS ONE**, v. 12, n. 11, p. 1–11, 2017.

ARCARO, C. A. et al. Piperine, a natural bioenhancer, nullifies the antidiabetic and antioxidant activities of curcumin in streptozotocin-diabetic rats. **PLoS One**, v. 3, n. 9, p. 1-21, 2014.

ASCONAPÉ, J. J. Use of antiepileptic drugs in hepatic and renal disease. **Handbook of Clinical Neurology**, v. 119, p. 417–432, 2014.

BACHMAKOV, I. et al. Interaction of beta-blockers with the renal uptake transporter OCT2. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 11, n. 11, p. 1080–1083, 2009.

BACKONJA, M. M.; CANAFAX, D. M.; CUNDY, K. C. Efficacy of Gabapentin Enacarbil vs Placebo in Patients with Postherpetic Neuralgia and a Pharmacokinetic Comparison with Oral Gabapentin. **Pain Medicine**, v. 12, n. 7, p. 1098-1108, 2011.

BACKONJA, M. et al. Gabapentin for the symptomatic treatment of painful neuropathy in patients with diabetes mellitus: a randomized controlled trial. **Jama**, v. 280, n. 21, p. 1831-1836, 1998.

BACKONJA, M.; GLANZMAN, R. L.; Gabapentin dosing for neuropathic pain: Evidence from randomized, placebo-controlled clinical trials. **Clinical Therapeutics**, v. 25, n. 1, p. 81-104, 2003.

BAHRAMI, G.; MOHAMMADI, B. Sensitive microanalysis of gabapentin by high-performance liquid chromatography in human serum using pre-column derivatization with 4-chloro-7-nitrobenzofurazan: application to a bioequivalence study. **Journal of Chromatography B**. n. 837, p. 24-28. 2006.

BARALDI, C. O. et al. Effect of type 2 diabetes mellitus on the pharmacokinetics of metformin in obese pregnant women. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 51, p. 743-749, 2012.

BELAL, F. et al. Spectrofluorimetric determination of vigabatrin and gabapentin in urine and dosage forms through derivatization with fluorescamine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 27, n. 1–2, p. 253–260, 2002.

BELTRAME, F. L.; CERRI, P. S.; CERRI-SASSO, E. Cimetidine-induced Leydig cell apoptosis and reduced EG-VEGF (PK-1) immunoexpression in rats: Evidence for the testicular vasculature atrophy. **Reproductive Toxicology**, v. 57, p. 50-58, 2015.

BENETELLO, P. et al. Oral gabapentin disposition in patients with epilepsy after a high- protein meal. **Epilepsia**, v. 38, n. 10, p. 1140–1142, 1997.

BENZI, J. R. DE L. et al. The role of organic cation transporter 2 inhibitor cimetidine, experimental diabetes mellitus and metformin on gabapentin pharmacokinetics in rats. **Life Sciences**, v. 200, p. 63–68, 2018.

BERRY, D. J. et al. The absorption of gabapentin following high dose escalation. **Seizure**, v. 12, n. 1, p. 28-36, 2003.

BIALER, M. Comparative pharmacokinetics of the newer antiepileptic drugs. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 24, n. 6, p.441-452, 1993.

BIRNBAUM, A. K. Pharmacokinetics of antiepileptic drugs in elderly nursing home residents. **International Review of Neurobiology**. v. 81, p. 211-220, 2007.

BOCKBRADER, H. N. et al. A comparison of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of pregabalin and gabapentin. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 49, n. 10, p. 661-669, 2010.

BORREY, D. C.R. et al. Quantitative determination of vigabatrin and gabapentin in human serum by gas chromatography-mass spectrometry. **Clinica Chimica Acta**. n. 354, p. 147-151. 2005.

BOYD, R. A. et al. Effects of age and gender on single-dose pharmacokinetics of gabapentin. **Epilepsia**. n. 40, p. 474-479, 1999.

CARLSSON, K. C.; REUBSAET, J. L. E. Sample preparation and determination of gabapentin in venous and capillary blood using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. n. 34, p. 415-423, 2003.

CHAHBOUNI, A. et al. Rapid quantification of gabapentin, pregabalin and vigabatrin in human serum by ultraperformance liquid chromatography with mass-spectrometric detection. **Therapeutic Drug Monitoring**. n. 35, p. 48-53, 2013.

CHANG, S. T.; WANG, F. Y; Determination of gabapentin in human plasma by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection and acetonitrile stacking technique. **Journal of Chromatography B**. n. 799, p. 265-270, 2004.

HEDIK, L.; BRUYERE, A.; FARDEL, O. Interactions of organophosphorus pesticides with solute carrier (SLC) drug transporters. **Xenobiotica**, v. 0, n. 0, p. 1–12, 2018.

CHEIKH HASSAN, H. I. et al. Efficacy and safety of gabapentin for uremic pruritus and restless legs syndrome in conservatively managed patients with chronic kidney disease. **Journal of Pain and Symptom Management**, v. 49, n. 4, p. 782–789, 2015.

CHEN, J. et al. Tropane alkaloids as substrates and inhibitors of human organic cation transporters of the SLC22 (OCT) and the SLC47 (MATE) families. **Biological Chemistry**, v. 398, n. 2, p. 237–249, 2017.

CHOI, Y. H.; KIM, S. G.; LEE, M. G. Dose-independent pharmacokinetics of metformin in rats: Hepatic and gastrointestinal first-pass effects. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 95, n. 11, p. 2543-2552, 2006.

CHOLLET, D. F. et al. Fast isocratic high-performance liquid chromatographic assay method for the simultaneous determination of gabapentin and vigabatrin in human serum. **Journal of Chromatography B**, v. 746, p. 311-314, 2000.

CHUNG, T. C.; TAI, C. T.; WU, H. L. Simple and sensitive liquid chromatographic method with fluorimetric detection for the analysis of gabapentin in human plasma. **Journal of Chromatography A**, n 1119, p. 294-298, 2006.

CONSORTIUM, T. I. T. Membrane transporters in drug development. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, p. 215, 2010.

CUNDY, K. C. et al. Clinical pharmacokinetics of XP13512m a novel transported pro drug of gabapentin. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 48, p. 1378-1388, 2008.

DICKENS, D. et al. Transport of gabapentin by LAT1 (SLC7A5). **Biochemical Pharmacology**, v. 85, n. 11, p. 1672–1683, 2013.

DIEHL, K. H. et al. A Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes. **Journal of Applied Toxicology**, v.21, p.15-23, 2001.

DIMOND, K. R. et al. Effect of gabapentin on mood and well-being in patients with epilepsy. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**. v. 20, p. 407-17, 1996.

DOSTALEK, M.; AKHLAGHI, F.; PUZANOVOVA, M. Effect of diabetes mellitus on pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of drugs. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 51, p. 481-499, 2012.

DRESSER, M. J.; LEABMAN, M. K.; GIACOMINI, K. M. Transporters involved in the elimination of drugs in the kidney: organic anion transporters and organic cation transporters. **Journal of Pharmaceutical Sciences** v. 90, n. 4, p. 397-421, 2001.

DUPONT, W. D.; PLUMMER, W. D. PS power and sample size program available for free on the Internet. **Controlled Clinical Trials**, v. 18, n. 3, p. 274, 1997.

EBNER, T.; ISHIGURO, N.; TAUB, M. E. The Use of Transporter Probe Drug Cocktails for the Assessment of Transporter-Based Drug-Drug Interactions in a Clinical Setting - Proposal of a Four Component Transporter Cocktail. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 104, n. 9, p. 3220–3228, 2015.

EBRAHIMZADEH, H. et al. Holoow fiber-based liquid phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography for the analysis of gabapentin in biological samples. **Analytica Chimica Acta**. n. 665. p. 221-226. 2010.

ECKHARDT, K. et al. Gabapentin enhances the analgesic effect of morphine in healthy volunteers. **Anesthesia & Analgesia**. v. 91, p. 185-189, 2000.

EL-KATTAN, A. F. et al. Projecting ADME Behavior and Drug-Drug Interactions in Early Discovery and Development: Application of the Extended Clearance Classification System. **Pharmaceutical Research**, v. 33, n. 12, p. 3021–3030, 2016.

EL-KATTAN, A. F.; VARMA, M. V. S. Navigating transporter sciences in pharmacokinetics characterization using the extended clearance classification system. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 46, n. 5, p. 729–739, 2018.

ELWES, R. D. C; BINNIE. C. D. Clinical pharmacokinetics of newer antiepileptic drugs: lamotrigine, vigabatrin, gabapentin and oxcarbazepine. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 30, n. 6, p. 1-13, 1996.

FORREST, G. et al. Determination of gabapentin in plasma by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, n. 681, p. 421-425, 1996.

FURUGEN, A. et al. Involvement of L-type amino acid transporter 1 in the transport of gabapentin into human placental choriocarcinoma cells. **Reproductive Toxicology**, v. 67, p. 48–55, 2017.

GABR, R. Q. et al. Pharmacokinetics of metformin in the rat: Assessment of the effect of hyperlipidemia and evidence for its metabolism to guanylyurea. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 95, n. 5, p. 530–538, 2017.

GALITZ, L. A.; JAYAWARDENA, S.; FUREY, S. A. Pharmacokinetic effects of simultaneous administration of single-dose gabapentin 500 mg and zolpidem tartrate 10 mg in healthy volunteers: a randomized, open-label, crossover trial. **Drugs in R&D**, v. 15, p. 71-77, 2015.

GAMBELUNGHE, C. et al. Gas chromatography-tandem mass spectrometry analysis of gabapentin in serum. **Biomedical Chromatography**, n. 19, p. 63-67, 2005.

GAUTHIER, D.; GUPTA, R. Determination of gabapentin in plasma by liquid chromatography with fluorescence detection after solid-phase extraction with a C18 Column. **Clinical Chemistry**, v. 48, n. 12, 2002.

GIDAL, B. E. et al. Gabapentin bioavailability: effect of dose and frequency of administration in adult patients with epilepsy. **Epilepsy Research**, n. 31, p. 91-99, 1998.

GIDAL, B. E. et al. Effect of a high-protein meal on gabapentin pharmacokinetics. **Epilepsy Research**. v. 23, p. 71-76, 1996.

GIDAL, B. E. et al. Inter and intra-subject variability in gabapentin absorption and absolute bioavailability. **Epilepsy Research**, n. 40, p. 123-127, 2000.

GORDI, T.; HOU, E.; KASICHAYANULA, S.; BERNER, B. Pharmacokinetics of gabapentin after a single day and a 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. **Clinical Therapeutics**, v. 30, n. 5, p. 909-916, 2008.

GROVER, B.; BUCKLEY, D.; CACINI, W. Reduced expression of organic cation transporters rOCT1 and rOCT2 in experimental diabetes. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 308, n. 3, p. 949-956, 2004.

HABU, Y. et al. Decreased activity of basolateral organic ion transports in hyperuricemic rat kidney: roles of organic ion transporters, rOAT1, rOAT3 and rOCT2. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, p.1107-1114, 2003.

HACKER, K. et al. Substrate-dependent inhibition of the human organic cation transporter OCT2: A comparison of metformin with experimental substrates. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, p. 1–16, 2015.

HOOPER, W. D. et al. Determination of Gabapentin in Plasma and Urine by Capillary Column Gas Chromatography. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**. v. 529, p. 167-174, 1990.

IBER, H. et al. Regulation of hepatic cytochrome P450 2C11 via cAMP: Implications for Down-Regulation in Diabetes, Fasting, and Inflammation. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 297, n. 1, 2001.

IFA, D. R. et al. Gabapentin quantification in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. Application to a bioequivalence study. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 36, p. 188-194, 2001.

IGLESIAS, P.; DÍEZ, J. Insulin therapy in renal disease. **Diabetes, Obesity and Metabolism**. v. 10, p-811-823, 2008.

IKEMURA, K. et al. Altered pharmacokinetics of cimetidine caused by down-regulation of renal rat organic cation transporter 2 (rOCT2) after liver ischemia-reperfusion injury. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 28, n. 6, p. 504-509, 2013.

ITO, S. et al. Competitive Inhibition of the Luminal Efflux by Multidrug and Toxin Extrusions, but Not Basolateral Uptake by Organic Cation Transporter 2, Is the Likely Mechanism Underlying the Pharmacokinetic Drug-Drug Interactions Caused by Cimetidine in the Kidney. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 340, n. 2, p. 393–403, 2012.

JALALIZADEH, H. et al. Validated HPLC method for the determination of gabapentin in human plasma using pre-column derivatization with 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene and its application to a pharmacokinetic study. **Journal of Chromatography B**, n. 854, p. 43-47, 2007.

JI, H. Y. et al. Determination of gabapentin in human plasma using hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, n. 20, p. 2127-2132, 2006.

JI, L. et al. Down-regulation of rat organic cation transporter rOCT2 by 5/6 nephrectomy. **Kidney International**, v. 62, p. 514-524, 2002.

JIANG, Q.; LI, SHUGUANG, L. Rapid high-performance liquid chromatographic determination of serum gabapentin. **Journal of Chromatography B**, v. 727, p. 119-123, 1999.

JOHANNESSEN, S. I.; TOMSON, T.; Pharmacokinetic variability of newer antiepileptic drugs. When does monitoring needed? **Clinical Pharmacokinetics**, v. 45, n. 11, p. 1061-1075, 2006.

JONKER, J. W.; SCHINKEL, A. H. Pharmacological and physiological functions of the polyspecific organic cationtraansporters: OCT1, 2 and 3 (SLC22A1-3). **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 308, n. 1, p. 2-9, 2003.

JOSLIN, J. O. Blood collection techniques in exotic small mammals. **Journal of Exotic Pet Medicine**, v.18, n.2, p.117-39, 2009.

JUENKE, J. M. et al. Simultaneous Quantification of levetiracetam and gabapentin in plasma by ultra-pressure liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry detection. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 33, n. 2, 2011.

KAUFMAN, K. R. et al. Myoclonus in renal failure: two cases of gabapentin toxicity. **Epilepsy & Behavior Case Reports**, v. 2, p. 8-10, 2014.

KIDO, Y.; MATSSON, P.; GIACOMINI, K. M.; Profiling of a prescription drug library for potencial renal drug/drug interactions mediated by the organic cation transporter 2. **Journal of Medicinal Chemistry** v. 54, n. 13, p. 4548-4558, 2011.

KOEPSELL, Hermann. The SLC22 family with transporters of organic cations, anions and zwitterions. **Molecular aspects of medicine**, v. 34, n. 2, p. 413-435, 2013.

KRASOWSKI, M. D.; Therapeutic drug monitoring of the newer anti-epilpsy medications. **Pharmaceuticals**, v. 3, p. 1909-1935, 2010.

KRIVANEK, P. et al. Simultaneous Isocratic HPLC determination of vigabatrin and gabapentin in human plasma by dansyl derivatization. **Therapeutic Drug Monitoring**, n. 25, p. 374-377, 2003.

KUNZE, A. et al. Interaction of the antiviral drug telaprevir with renal and hepatic drug transporters. **Biochemical Pharmacology**, v. 84, n. 8, p. 1096–1102, 2012.

KUSHNIR, M. M. et al. Analysis of gabapentin in serum and plasma by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry for therapeutic drug monitoring. **Journal of Analytical Toxicology**. v. 23, p. 1-6, 1991.

LAL, R. et al. Pharmacokinetics and tolerability of single escalating doses of gabapentin enacarbil: a randomized-sequence, double-blind, placebo-controlled crossover study in healthy volunteers. **Clinical Therapeutics**, v. 31, n. 8, p. 1777-1786, 2009.

LAL, R. et al. Clinical pharmacokinetic drug interaction studies of gabapentin enacarbil, a novel transported prodrug of gabapentin, with naproxen and cimetidine. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 69, n. 5, p. 498-507, 2010.

LAL, R. et al. Clinical pharmacokinetics of gabapentin after administration of gabapentin enacarbil extended-release tablets in patients with varying degrees of renal function using data from an open-label, single-dose pharmacokinetic study.

Clinical Therapeutics, v. 34, n. 1, p. 201-212, 2012.

LANDMARK, C. J. et al. Experience from therapeutic drug monitoring and gender aspects of gabapentin and pregabalin in clinical practice. **Seizure**, v. 28, p. 88-91, 2015.

LARSEN, M. S. et al. In vivo and in vitro evaluations of intestinal gabapentin absorption: Effect of dose and inhibitors on carrier-mediated transport.

Pharmaceutical Research, v. 32, n. 3, p. 898–909, 2013.

LARSEN, M. S. et al. In vivo and in vitro evaluations of intestinal gabapentin absorption: effect of dose and inhibitors on carrier-mediated transport.

Pharmaceutical Research., v. 32, p. 898-909, 2015.

LEE, J. H. et al. Pharmacokinetics of drugs in rats with diabetes mellitus induced by alloxan or streptozotocin: comparison with those in patients with type I diabetes mellitus. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 62, p. 1-23, 2010.

LI, X. et al. Investigation of the role of organic cation transporter 2 (OCT2) in the renal transport of guanfacine, a selective α 2A-adrenoreceptor agonist. **Xenobiotica**, v. 45, n. 1, p. 88–94, 2015.

MAA, Y. et al., Metoprolol decreases the plasma exposure of metformin via the induction of liver, kidney and muscle uptake in rats. **Biopharmaceutics & drug disposition**, v. 28, n. 3, p. 135–143, 2007.

MARTINC, B. et al. Simultaneous determination of gabapentin, pregabalin, vigabatrin and topiramate in plasma by HPLC with fluorescence detections. **Journal of Chromatography B**, n.962, p. 82-88. 2014.

MATAR, K. M.; HAMID-ABDEL, M. E. Rapid tandem mass Spectrometric method for determination of gabapentin in human plasma. **Chromatographic**, n. 9/10, 2005.

MATHERS, C. D.; LONCAR, D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. **PLoS Medicine**, v. 3, n. 11, p. 2011–2030, 2006.

MATSUYAMA, R. et al. Up-regulation of I-Type Amino Acid Transporter 1 (LAT1) in Cultured Rat Retinal Capillary Endothelial Cells in Response to Glucose Deprivation. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 27, n. 3, p. 317–324, 2012.

MCCORMICK, A.; SWAISLAND, H. *In vitro* assessment of the roles of drug transporters in the disposition and drug–drug interaction potential of olaparib. **Xenobiotica**, v. 47, n. 10, p. 903–915, 2017.

MERCOLINIM, L. et al. Simultaneous HPLC-F analysis of three recente antiepileptic drugs in human plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 53, p. 62-67, 2010.

MIRANDA, H. F. et al. Antinociceptive Interaction of Tramadol with Gabapentin in Experimental Mononeuropathic Pain. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 119, n. 2, p. 210–214, 2016.

MOLEDINA, D. G.; WILSON, F. P. Pharmacologic treatment of common symptoms in dialysis patients: a narrative review. **Seminars in Dialysis**, v. 28, n. 4, p. 377-383, 2015.

MOORE, A.; DERRY, S.; WIFFEN, P. Gabapentin for Chronic Neuropathic Pain. **Jama**, v. 319, n. 8, p. 818, 2018.

MOTIKA, P. V.; SPENCER, D. C.; Treatment of epilepsy in the elderly. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, v. 16, n. 96, 2016.

NADAI, M. et al. Possible involvement of organic anion and cation transporters in renal excretion of xanthine derivatives, 3-methylxanthine and enprofylline. **Life Sciences**, v. 81, n. 15, p. 1175-1182, 2007.

NEURONTIN. [Bula]. Pfizer. Disponível em:

https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2011/020235s036,020882s02,021129s022lbl.pdf. Acesso em: 27 jun. 2018.

NEVILLE, R.; PATSALOS, P. N.A high-performance liquid chromatography micromethod for the simultaneous determination of vigabatrin and gabapentin in serum. **Therapeutic Drug Monitoring**, n. 20, v. 4, p. 430-434, 1998.

NGUYEN, T. V. et al. PEPT1 Enhances the uptake of gabapentin via trans-stimulation of b₀,+ exchange. **Pharmaceutical Research**, v. 24, n. 2, p. 353-360, 2007.

NIES, A. T. et al. Organic cationtransporters (OCTs, MATEs), in vitro and in vivo evidence for the im-portance in drug therapy. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 201, p.105–167, 2011.

NOWICKI, M. T. et al. Renal and hepatic transporter expression in type 2 diabetic rats. **Drug Metabolism Letters**, n. 2, p. 11-17, 2008.

OERTEL, R. et al. Simultaneous determination of three anticonvulsantes using hydriphilic interaction LC-MS. **Journal of Separating Science**,. n. 32, p. 238-243, 2009.

PANDYA, K. J. et al. Gabapentin for hot flashes in 420 women with breast cancer: a randomised double-blind placebo-controlled trial. **Lancet**, v. 366, n. 9488, p. 818–24, 2006.

PAPATHANASIOU, T. et al. Co-administration of morphine and gabapentin leads to dose dependent synergistic effects in a rat model of postoperative pain. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 82, p. 97–105, 2016.

PAPATHANASIOU, T. et al. Population Pharmacokinetic Modelling of Morphine, Gabapentin and their Combination in the Rat. **Pharmaceutical Research**, v. 33, n. 11, p. 2630–2643, 2016b.

PARK, J. H. et al. 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, p. 829-835. 2007.

PARVEZ, 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.

PATSALOS, P. N. et al. Antiepileptic drugs—best practice guidelines for therapeutic drug monitoring: a position paper by the subcommission on therapeutic drug monitoring. **Epilepsia**, v. 49, n. 7, p. 1239-1276, 2008.

PIHL, L. et al. Insulin induces the correlation between renal blood flow and glomerular filtration rate in diabetes: implications for mechanisms causing hyperfiltration. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**. v. 303, p. R39-R47, 2012.

RADULOVIC, L. L. Disposition of gabapentin (neurotin) in mice, rats, dogs, and monkeys. **Drug Metabolism & Disposition**, v. 23, n. 4, p. 441-448, 1995.

RAMAKRISHNA, N. V. S. et al. Rapid quantification of gabapentin in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, n. 40, p. 360-368, 2006.

ROCHA, A. B. O. et al. Cocristsais: Uma estratégia promissora na área farmacêutica. **Quimica Nova**, v. 39, n. 9, p. 1112–1125, 2016.

SADOSKY, A. A review of the Epidemiology of Painful Diabetic Peripheral Neuropathy, Postherpetic Neuralgia, and Less Commonly Studied Neuropathic. **Pain Conditions**, v. 8, p. 45-56, 2008.

SAGIRLI, O.; ÇETIN, S. M.; ÖNAL, A. Determination of gabapentin in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography with UV-vis detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, n. 42. p. 618-624. 2006.

SÁNCHEZ-VALIENTE, S. Tratamiento del dolor neuropático con gabapentina. **Revista de Neurología**, v. 26, p. 618-620, 1998.

SAUZAY, C. et al. Inhibition of OCT2, MATE1 and MATE2-K as a possible mechanism of drug interaction between pazopanib and cisplatin. **Pharmacological Research**, v. 110, p. 89–95, 2016.

SCHENKMAN, J. B. Induction of diabetes and evaluation of diabetic state on P450 Expression. **Methods in enzymology**, v. 206, 1991.

SERPELL, M. G. Gabapentin in neuropathic pain syndromes: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **Pain**, v. 99, n. 3, p. 557-566, 2002.

SHAIK, I. H.; MEHVAR, R. Effects of Cytochrome P450 Inhibition by Cimetidine on the Warm Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. **Journal of Surgical Research**, v. 159, n. 2, p. 680–688, 2010.

SHIMOJO, N. Changes in amounts of cytochrome P450 isozymes and levels of catalytic activities in hepatic and renal microsomes of rats with streptozocin-induced diabetes. **Biochemical Pharmacology**, v. 46, n. 4, p. 621-627, 1993.

SILLS, G. J. The mechanisms of action of gabapentin and pregabalin. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 6, n. 1 SPEC. ISS., p. 108–113, 2006.

SILVA, C. P. da; EMÍDIO, E. S.; MARCHI, M. R. R. Method validation using weighted linear regression models for quantification of IV filters in water samples. **Talanta**, v. 131, p. 221-227, 2015.

SINGH, N.; ECKER, G. Insights into the Structure, Function, and Ligand Discovery of the Large Neutral Amino Acid Transporter 1, LAT1. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 5, p. 1278, 2018.

SINGH, N.; ECKER, G. Insights into the Structure, Function, and Ligand Discovery of the Large Neutral Amino Acid Transporter 1, LAT1. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 5, p. 1278, 2018.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diabetes na prática clínica. E-book. Disponível em: <http://www.diabetes.org.br/ebook/>. Acesso em: 29 abr. 2017.

SOODVILAI, S. et al. Interaction of pharmaceutical excipients with organic cation transporters. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 520, n. 1–2, p. 14–20, 2017.

STEWART, B. H. et al. 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. **Pharmaceutical Research**, v. 10, n. 2, p. 276-81, 1993.

STOPFER, P. et al. Optimization of a drug transporter probe cocktail: potential screening tool for transporter-mediated drug-drug interactions. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 49, n. 7351, 2018.

STRIANO, S. et al. Limited place for plasma monitoring of new antiepileptic drugs in clinical practice. **Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research**, v. 14, n. 10, p. RA173-8, 2008.

SU, T. Z. et al. Transport of gabapentin, a gamma-amino acid drug, by system I alpha-amino acid transporters: a comparative study in astrocytes, synaptosomes, and CHO cells. **Journal of Neurochemistry**, v. 64, n. 5, p. 2125-31, 1995.

TANG, P. H. et al. Automated microanalysis of gabapentin in human serum by high-performance liquid chromatography with fluorometric detection. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 727, n. 1–2, p. 125–129, 30 abr. 1999.

TAYLOR, C. P.; Mechanisms of analgesia by gabapentin and pregabalin – Calcium channel $\alpha 2\text{-}\delta$ [Cav $\alpha 2\text{-}\delta$] ligands. **PAIN**, v. 142, n.1-2, p. 13-6, 2009.

THOMAS, M. C. et al. Reduced tubular cation transport in diabetes: Prevented by ACE inhibition. **Kidney International**, v. 63, n. 6, p. 2152–2161, 2003.

THOMAS, M. C. et al. The Role of Advanced Glycation in Reduced Organic Cation Transport Associated with Experimental Diabetes. **J Pharmacol Exp Ther**. v. 311, n. 2, p. 456–466, 2004.

TJANDRAWINATA, R. R. et al. Single dose pharmacokinetic equivalence study of two gabapentin preparations in healthy subjects. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 8, p. 1249–1255, 2014.

TOH, D. S. L. et al. Effect of mushroom diet on pharmacokinetics of gabapentin in healthy Chinese subjects. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 78, n. 1, p. 129–134, 2014.

TORREGROSA-DE, J. E. et al. Acute renal failure due to gabapentin. A case report and literature. **Nefrologia**, v. 32, n. 1, p. 130–131, 2012.

TRINDER, P. Determination of blood glucose using 4-amino phenazone as oxygen acceptor, **Journal of Clinical Pathology**, v. 22, n. 2, p.246, 1969.

UMEHARA, K. I. et al. Functional involvement of the organic cation transporter 2 (rOct2) in the renal uptake of organic cations in rats4. **J.Int.Med.Res.**, v. 36, n. 1, p. 123–136, 2008.

URAKAMI, Y. et al. Gender differences in expression of organic cation transporter OCT2 in rat kidney. **FEBS letters**, v. 461, n. 3, p. 339–342, 1999.

URAKAMI, Y. et al. Functional Characteristics and Membrane Localization of Rat Multispecific Organic Cation Transporters, OCT1 and OCT2, Mediating Tubular Secretion of Cationic Drugs. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 287, n. 2, p. 800 LP-805, 1 nov. 1998.

VARMA, M. V. et al. Predicting Clearance Mechanism in Drug Discovery: Extended Clearance Classification System (ECCS). **Pharmaceutical Research**, v. 32, n. 12, p. 3785–3802, 2015.

WAD, N.; KRÄMER, G. Sensitive high-performance liquid chromatographic method with fluorometric detection for the simultaneous determination of gabapentin and vigabatrin in serum and urine. **Journal of Chromatography B.**, n. 705, p. 154-158, 1998.

WALKER, M. C.; PATSALOS, P. N. Clinical pharmacokinetics of new antiepileptic drugs. **Pharmacology& Therapeutics**, v. 67, n. 3, p. 351-384, 1995.

WANG, Z. J. et al. OCT2 polymorphisms and in-vivo renal functional consequence: Studies with metformin and cimetidine. **Pharmacogenetics and Genomics**, v. 18, n. 7, p. 637–645, 2008.

WATTANANAT, T.; AKARAWUT, W. Validated LC-MS-MS method for the determination of gabapentin in human plasma: Application to a bioequivalence study. **Journal of Chromatographic Science**, v. 47, 2009.

WIFFEN, P. J. et al. Gabapentin for chronic neuropathic pain in adults (Review). **The Cochrane Database of Systematic Reviews**. n. 6, p. 10–13, 2017.

WOLF, C. E.; SAADY, J. I.; POKLIS, A. Determination of Gabapentin in Serum Using Solid-Phase Extraction and Gas-Liquid Chromatography. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 20, p. 498-501. 1996.

YAGI, T. et al. Impact of Concomitant Antacid Administration on Gabapentin Plasma Exposure and Oral Bioavailability in Healthy Adult Subjects. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 27, n. 2, p. 248–254, 2012.

YAMAMOTO, Y. et al. Glucose-mediated inactivation of AMP-activated protein kinase reduces the levels of L-type amino acid transporter 1 mRNA in C2C12 cells. **Nutrition Research**, v. 47, p. 13–20, 2017.

YASAEI R, SAADABADI A. Gabapentin (Neurontin) [Updated 2018 Mar 16]. In: StatPearls [Internet]. **Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2018**

Jan. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493228/>. Acesso em 26 jun 2018.

ZAND, L.; McKIAN, P.; QIAN, Q. Gabapentin toxicity in patients with chronic kidney disease: a preventable cause of morbidity. **The American Journal of Medicine**, v.; 123, n. 4, p. 367-373, 2010.

ZHU, Z.; NEIRINCK, L. High-performance liquid chromatographic method for the determination of gabapentin in human plasma. **Journal of Chromatography B.**, n. 779, p. 307-312, 2002.

ANEXOS

Anexo I – Certificado de aprovação em Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do campus de Araraquara da UNESP.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Influência do inibidor do transportador de cátions orgânicos 2 (OCT2) cimetidina e do diabetes mellitus experimental na disposição cinética da gabapentina em ratos", registrada com o Protocolo CEUA/FCF/CAR: 75/2015, sob a responsabilidade de Jhohann Richard de Lima Benzi e Profa. Dra. Natália Valadares de Moraes - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da UNESP em reunião de 20 de maio de 2016.

Finalidade	☐ Ensino ☒ Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Setembro de 2018
Espécie/linhagem/raça	Rato Wistar
Nº de animais	96
Peso/Idade	200 g 8 a 9 semanas
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central do Campus de Botucatu da UNESP

Araraquara, 09 de Junho de 2016.

Prof. Dr. CARLOS CESAR CRESTANI
Coordenador da CEUA

Anexo II – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do campus de Araraquara da UNESP, para inclusão de grupo experimental.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara

Protocolo CEUA/FCF/CAR nº 75/2015

Interessado: Jhohann Richard de Lima Benzi

Orientadora: Profa. Dra. Natália Valadares de Moraes

Projeto: Influência do inibidor do transportador de cátions orgânicos 2 (OCT2) cimetidina e do diabetes mellitus experimental na disposição cinética da gabapentina em ratos

Parecer nº 14/2017 – Comissão de Ética no Uso de Animais

A Comissão de Ética no Uso de Animais desta Faculdade, reunida em 29 de março de 2017, analisou e aprovou o pedido de adição de grupo experimental do protocolo para uso de animais na pesquisa "Influência do inibidor do transportador de cátions orgânicos 2 (OCT2) cimetidina e do diabetes mellitus experimental na disposição cinética da gabapentina em ratos", apresentado pelo pós-graduando Jhohann Richard de Lima Benzi, sob orientação da Professora Doutora Natalia Valadares de Moraes do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia desta Faculdade.

O relatório final do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em SETEMBRO de 2018 em formulário para este fim.

Araraquara, 03 de abril de 2017.

Prof. Dr. CARLOS CESAR CRESTANI
Coordenador da CEUA

ANEXO III – Autorização especial da ANVISA para compra de padrão de gabapentina.

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

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

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

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

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

Esta Autorização é válida por 1 (um) ano.

Brasília – DF, 20 de setembro de 2016

2ª Via ESTABELECIMENTO ADQUIRENTE

Thiago Brasil Silvério
SIAPE 1492947
Coordenador
COCIO/GPCON/UGB/ON/DIMON/ANVISA

ANEXO VI – Autorização especial da ANVISA para compra de padrão de gabapentina.

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

Brasília, 30 de maio de 2017.

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

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

Sr. Responsável,

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

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

Leia-se:

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

Atenciosamente,

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