

NATÁLIA VALADARES DE MORAES

**Influência do diabetes descompensado na disposição cinética,
metabolismo e farmacocinética-farmacodinâmica dos enantiômeros
do tramadol em pacientes com dor neuropática**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Orientadora: Profa. Dra. Vera Lucia Lanchote

Ribeirão Preto
2011

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.

De Moraes, Natália Valadares

Influência do diabetes descompensado na disposição cinética, metabolismo e farmacocinética-farmacodinâmica dos enantiômeros do tramadol em pacientes com dor neuropática.
Ribeirão Preto, 2011.

202p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração:
Toxicologia.

Orientadora: Lanchote, Vera Lucia.

1. Tramadol.
2. Farmacocinética.
3. Metabolismo.
4. Diabetes.
5. Dor neuropática.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Natália Valadares de Moraes

Influência do diabetes descompensado na disposição cinética, metabolismo e farmacocinética-farmacodinâmica dos enantiômeros do tramadol em pacientes com dor neuropática

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientada: Natália Valadares de Moraes

Orientadora: Profa. Dra. Vera Lucia Lanchote

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

A minha mãe Jane,
por todo amor e confiança em todos os momentos
da minha vida.

Ao meu pai Leo,
pelo exemplo de dedicação e por sua compreensão
nos momentos mais difíceis.

Ao meu irmão Neto,
pelo eterno companheirismo e carinho.

Ao Daniel,
porque na sua presença eu vivo os melhores dias da
minha vida.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora **Prof. Dr. Vera Lucia Lanchote** por permitir o meu desenvolvimento profissional e pessoal em seu laboratório nos últimos 5 anos, por acreditar e apoiar sempre o meu trabalho e por seu exemplo de dedicação, competência e sabedoria.

A **Clínica de Dor** (médicos, residentes e equipe de enfermagem) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, em especial à responsável clínica deste trabalho e pela orientação na seleção dos pacientes e na coleta das amostras.

Ao **Corpo Clínico** do Ambulatório de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP pela valiosa contribuição na seleção dos pacientes diabéticos.

A **Dra. Patrícia Kunzle Ribeiro Magalhães** pelo auxílio na seleção de pacientes no Centro de Saúde-Escola da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo.

Aos **funcionários** da Unidade de Pesquisa Clínica do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto pela competência no cuidado dos pacientes e na coleta de amostras.

Ao **Dr. Márcio Nogueira Napolitano** pelo precioso tempo dedicado à internação dos pacientes.

Ao **Prof. Dr. Eduardo Barbosa Coelho, Juliana Abumansur e Mariana Tavares** pelo auxílio na genotipagem dos pacientes.

Aos **demais docentes** do Programa de Pós-Graduação em Toxicologia pela constante troca de conhecimentos durante a realização do doutorado.

Aos funcionários **Dra. Maria Paula Costa Marques** e **Natalino Bocardo** pela ajuda constante, competência e pela amizade conquistada.

À funcionária **Viviani Nardini** pela colaboração na análise de noradrenalina no plasma.

Ao grupo de pesquisa do laboratório de farmacocinética e metabolismo: **Dra. Ana Leonor Godoy**, **Dra. Adriana Rocha**, **Dra. Carolina Miranda**, **Dra. Teresa Carvalho**, **Dra. Vanessa Bergamin Boralli**, **Ms. Carolina Pinto**, **Ms. Daniel Neves**, **Ms. Estela Schaab**, **Ms. Francine Attie de Castro**, **Ms. Leonardo Pinto**, **Ms. Juciane Cardoso**, **Ms. Natalícia Antunes**, **Ms. Glauco Nardotto**, **Eduardo Tozato**, **Otávio Rocha** e **Rodrigo Ribeiro**, pela troca diária de experiências e conhecimentos durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos Profs. **Dr. Christopher McCurdy** e **Dr. Bonnie Avery**, a **Harsha Tumuluri** e **Edward Furr** pela colaboração durante o meu estágio na *University of Mississippi*, nos EUA.

Aos Profs. **Dr. Amin Rostami** e **Dr. Aleksandra Galetin**, ao **Dr. Michael Gertz** e **Alison Helm** pela colaboração durante o estágio de doutorado na *University of Manchester*, no Reino Unido.

Ao **grupo de pesquisa CAPkR** (Centre for Applied Pharmacokinetic Research) da *University of Manchester*: **Ayse Ufuk**, **Catherine Gill**, **Carolina Lager**, **Ian Templeton**, **Karelle Menochet**, **Carina Cantrill** e **Louise Taylor** pelo apoio e amizade durante o meu estágio sandwich.

Aos funcionários da Seção de Pós-graduação **Ana Lúcia Turatti**, **Rosemary Ioshimine Gerolineto** e **Rosana Florêncio** e a coordenadora e ao vice-coordenador do Programa de Pós-graduação em Toxicologia Profs. **Dra. Eliane Candiani Arantes Braga** e **Dr. Fernando Barbosa Junior** por toda dedicação.

Ao **CNPq** (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão da bolsa de doutorado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

À **Pró-Reitoria de Pós-Graduação da Universidade de São Paulo** pelo auxílio financeiro para a participação em congressos no exterior e pela concessão de bolsas referentes a participação no Programa de Aperfeiçoamento de Ensino

À **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão da bolsa PDEE para a realização do estágio de doutorado na *University of Manchester*, Reino Unido.

Ao **SIMCYP** pelo apoio financeiro na modalidade taxa de bancada durante o estágio de doutorado na *University of Manchester*, Reino Unido.

A verdade dividida

*A porta da verdade estava aberta
mas só deixava passar
meia pessoa de cada vez.*

*Assim não era possível atingir toda a verdade,
porque a meia pessoa que entrava
só conseguia o perfil de meia verdade.
E sua segunda metade
voltava igualmente com meio perfil.
E os meios perfis não coincidiam.*

*Arrebentaram a porta. Derrubaram a porta.
Chegaram ao lugar luminoso
onde a verdade esplendia os seus fogos.
Era dividida em duas metades
diferentes uma da outra.*

*Chegou-se a discutir qual a metade mais bela.
Nenhuma das duas era perfeitamente bela.
E era preciso optar. Cada um optou
conforme seu capricho, sua ilusão, sua miopia.*

Carlo Drummond de Andrade

RESUMO

DE MORAES, N.V. **Influência do diabetes descompensado na disposição cinética, metabolismo e farmacocinética-farmacodinâmica dos enantiômeros do tramadol em pacientes com dor neuropática.** 2011. 202f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

O tramadol é um analgésico de ação central eficaz na atenuação de dores agudas e crônicas, entre elas a dor neuropática em pacientes diabéticos. Encontra-se disponível na clínica como mistura de (+)-tramadol e (-)-tramadol. O tramadol é metabolizado pelo CYP2D6 em O-desmetiltramadol (M1) e pelo CYP3A4 e CYP2B6 em N-desmetiltramadol (M2). Ambos enantiômeros do tramadol e o (+)-M1 contribuem para a atividade analgésica: o (+)-tramadol e o (+)-M1 agem como agonistas do receptor μ -opióide; o (+)-tramadol inibe a recaptação de serotonina; e o (-)-tramadol inibe a recaptação de noradrenalina. O estudo investiga a influência do *diabetes mellitus* (DM) tipo 1 e tipo 2 descompensados na disposição cinética, metabolismo e farmacocinética-farmacodinâmica dos enantiômeros tramadol em pacientes com dor neuropática. Os pacientes não diabéticos (Grupo Controle, n=12), os pacientes com DM tipo 1 (n=9) e os pacientes com DM tipo 2 (n=9), todos portadores de dor neuropática e fenotipados como metabolizadores extensivos do CYP2D6, receberam dose única oral de 100 mg de tramadol racêmico. Amostras seriadas de sangue foram coletadas até 24 h após a administração do tramadol para o estudo farmacocinético e para a avaliação das concentrações de noradrenalina. A dor dos pacientes foi avaliada através da escala analógica visual de dor nos mesmos tempos de coleta de sangue. Os pacientes foram avaliados quanto à atividade *in vivo* do CYP3A utilizando midazolam como fármaco marcador e genotipados para o CYP2B6. As concentrações plasmáticas total e livre dos enantiômeros do tramadol, M1 e M2 foram analisadas por LC-MS/MS usando a coluna Chiralpak® AD. A disposição cinética do tramadol é enantiosseletiva nos pacientes dos Grupos Controle e DM tipo 1, com acúmulo plasmático do (+)-tramadol. O DM tipo 1, mas não o DM tipo 2, reduz a AUC do metabólito ativo (+)-M1 e simultaneamente aumenta sua fração livre. Portanto, a concentração plasmática livre do eutômero (+)-M1 permanece inalterada nos pacientes portadores de DM tipo 1 e DM tipo 2. Não foram observadas diferenças entre os Grupos Controle, DM tipo 1 e DM tipo 2 quanto às razões metabólicas plasmáticas e urinárias do metoprolol/ α -hidroximetoprolol e quanto ao clearance do midazolam. Correlações significativas entre as razões metabólicas de AUC (+)-tramadol/(+)-M1 ou (-)-tramadol/(-)-M1 e a atividade *in vivo* do CYP2D6 avaliada em plasma ou urina empregando o metoprolol como fármaco marcador sugerem a aplicação do tramadol como fármaco marcador do CYP2D6. Os dados também mostram uma tendência de aumento do clearance do (+)-tramadol e do (-)-tramadol em virtude da presença do alelo mutante T no polimorfismo 516G>T do CYP2B6. O modelo sigmóide de efeito máximo fracional foi empregado para descrever a relação farmacocinética-farmacodinâmica do tramadol em pacientes com dor neuropática, relacionando as concentrações plasmáticas livre do (+)-M1 com o efeito analgésico do tramadol. O presente estudo mostra a importância da análise da concentração livre dos enantiômeros individuais do tramadol e seus metabólitos nos estudos de farmacocinética-farmacodinâmica.

Palavras-chave: tramadol, farmacocinética, metabolismo, diabetes, dor neuropática.

ABSTRACT

DE MORAES, N.V. **Influence of uncontrolled type 1 and type 2 diabetes on the kinetic disposition, metabolism and pharmacokinetics-pharmacodynamics of tramadol enantiomers in patients with neuropathic pain.** 2011. 202p. Doctoral Thesis. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Tramadol is a centrally acting analgesic that effectively relieves acute and chronic pain, including neuropathic pain in diabetic patients. The drug is available in clinical practice as a mixture of the (+)-tramadol and (-)-tramadol enantiomers. Tramadol is metabolized by CYP2D6 to O-desmethyltramadol (M1) and by CYP3A4 and CYP2B6 to N-desmethyltramadol (M2). Both tramadol enantiomers and (+)-M1 contribute to the analgesic activity of the drug: (+)-tramadol and the (+)-M1 metabolite act as μ -opioid receptor agonists; (+)-tramadol inhibits serotonin reuptake; and (-)-tramadol inhibits the reuptake of norepinephrine. This study investigated the influence of uncontrolled type 1 and type 2 diabetes mellitus (DM) on the kinetic disposition, metabolism and pharmacokinetics-pharmacodynamics of tramadol enantiomers in patients with neuropathic pain. Nondiabetic patients (control group, n = 12), patients with type 1 DM (n = 9), and patients with type 2 DM (n = 9), all with neuropathic pain and phenotyped as extensive metabolizers of CYP2D6, received a single oral dose of 100 mg racemic tramadol. Serial blood samples were collected up to 24 h after administration of the drug for pharmacokinetic study and for the analysis of noradrenaline in plasma. Pain was rated on a visual analog pain scale at the same time as blood sampling. The patients were evaluated for *in vivo* CYP3A activity using midazolam as a probe drug and genotyped for CYP2B6. Total and unbound plasma concentrations of the tramadol, M1 and M2 enantiomers were analyzed by LC-MS/MS using a Chiralpak[®] AD column. The kinetic disposition of tramadol was enantioselective in the control and type 1 DM groups, with the accumulation of (+)-tramadol. Type 1, but not type 2, DM reduced the AUC of the active (+)-M1 metabolite and simultaneously increased its unbound fraction. Therefore, unbound plasma concentrations of the (+)-M1 eutomer remain unchanged in patients with type 1 and type 2 DM. No differences in the plasma and urinary metabolic ratios of metoprolol/ α -hydroxymetoprolol or in midazolam clearance were observed between the control, type 1 and type 2 DM groups. The significant correlations seen between (+)-tramadol/(+)-M1 or (-)-tramadol/(-)-M1 AUC metabolic ratios and *in vivo* CYP2D6 activity evaluated in plasma or urine using metoprolol as a probe drug suggest the application of tramadol as a marker for CYP2D6. The data also showed a trend towards increased clearance of (+)-tramadol and (-)-tramadol as a result of the presence of mutant allele T in the 516G>T polymorphism of the CYP2B6 gene. The fractional sigmoid maximum drug effect model was used to describe the pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship of tramadol in patients with neuropathic pain, associating the unbound plasma concentrations of (+)-M1 with the analgesic effect of tramadol. The present study highlights the importance of analyzing unbound concentrations of the individual tramadol enantiomers and its metabolites in pharmacokinetic-pharmacodynamic studies.

Keywords: tramadol, pharmacokinetics, metabolism, diabetes, neuropathic pain.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Fórmulas estruturais do tramadol e seus principais metabólitos.....	32
Figura 2.	Procedimento de extração líquido-líquido do tramadol, M1 e M2 total e livre em plasma humano.....	40
Figura 3.	Ultrafiltração do plasma humano.....	41
Figura 4.	Cromatogramas referentes a análise dos enantiômeros do tramadol, M1 e M2 em plasma humano.....	49
Figura 5.	Curvas de concentração plasmática total <i>versus</i> tempo dos enantiômeros do tramadol, M1 e M2 nos pacientes portadores de dor neuropática tratados após a administração de dose única oral de 100 mg de tramadol racêmico.....	55
Figura 6.	Razões enantioméricas (+)/(-) das concentrações plasmáticas do tramadol, M1 e M2 após administração de dose única oral de 100 mg de tramadol racêmico em pacientes portadores de dor neuropática.....	57
Figura 7.	Estudo do tamanho amostral em relação ao poder do teste..	79
Figura 8.	Curvas de concentração plasmática <i>versus</i> tempo dos enantiômeros do tramadol, M1 e M2 total em pacientes do Grupo DM tipo 1.....	81
Figura 9.	Curvas de concentração plasmática <i>versus</i> tempo dos enantiômeros do tramadol, M1 e M2 total em pacientes do Grupo DM tipo 2.....	83
Figura 10.	Concentrações plasmáticas totais do (+)-tramadol em função do tempo observadas para os pacientes dos Grupos Controle (n=12), DM tipo 1 (n=9) e DM tipo 2 (n=9) após a administração de 100 mg de tramadol racêmico.....	85
Figura 11.	Concentrações plasmáticas totais do (-)-tramadol em função do tempo observadas para os pacientes dos Grupos Controle (n=12), DM tipo 1 (n=9) e DM tipo 2 (n=9) após a administração de 100 mg de tramadol racêmico.....	86
Figura 12.	Concentrações plasmáticas totais do (+)-M1 em função do tempo observadas para os pacientes dos Grupos Controle (n=12), DM tipo 1 (n=9) e DM tipo 2 (n=9) após a administração de 100 mg de tramadol racêmico.....	87

Figura 13.	Concentrações plasmáticas totais do (-)-M1 em função do tempo observadas para os pacientes dos Grupos Controle (n=12), DM tipo 1 (n=9) e DM tipo 2 (n=9) após a administração de 100 mg de tramadol racêmico.....	88
Figura 14.	Concentrações plasmáticas totais do (+)-M2 e do (-)-M2 em função do tempo observadas para os pacientes dos Grupos Controle (n=12), DM tipo 1 (n=9) e DM tipo 2 (n=9) após a administração de 100 mg de tramadol racêmico.....	89
Figura 15.	Razões (+)-tramadol/(-)-tramadol (A), (+)-M1/(-)-M1 (B), (+)-M2/(-)-M2 (C) observadas após a administração de dose única oral de 100 mg de tramadol racêmico em pacientes pertencentes aos Grupos Controle (n=12), DM tipo 1 (n=9) e DM tipo 2 (n=9).....	93
Figura 16.	Fração livre dos enantiômeros do tramadol, M1 e M2 nos Grupos Controle (n=12), DM tipo 1 (n=9) e DM tipo 2 (n=9)..	97
Figura 17.	Procedimento de extração líquido-líquido do metoprolol e α-hidroximetoprolol em urina e plasma.....	113
Figura 18.	Perfil das bandas na análise das variantes alélicas do CYP2B6.....	118
Figura 19.	Cromatogramas referentes a análise do metoprolol e α-hidroximetoprolol em urina.....	121
Figura 20.	Razão metabólica de concentrações urinárias metoprolol/α-hidroximetoprolol nos pacientes do Grupo Controle (n=12), DM tipo 1 (n=9) e DM tipo 2 (n=9).....	124
Figura 21.	Gráfico e equação de regressão ortogonal e seu respectivo coeficiente de correlação r entre a razão metabólica urinária 0-8h metoprolol/α-hidroximetoprolol (MR_{urina}) e a razão metabólica de concentrações plasmáticas \log_{10} metoprolol/α-hidroximetoprolol (MR_{plasma}).....	125
Figura 22.	<i>Clearance total aparente do midazolam apresentado como valores individuais e mediana nos pacientes do Grupo Controle (n=12), DM tipo 1 (n=9) e DM tipo 2 (n=9).....</i>	127
Figura 23.	Gráficos e equações de regressão ortogonal e seus respectivos coeficientes de correlação r entre a razão metabólica urinária 0-8h metoprolol/α-hidroximetoprolol (MR_{urina}) e o clearance total aparente dos enantiômeros do tramadol.....	129

Figura 24.	Gráficos e equações de regressão ortogonal e seus respectivos coeficientes de correlação r entre a razão metabólica plasmática (MR_{plasma}) \log_{10} metoprolol/α-hidroximetoprolol e o clearance total aparente dos enantiômeros do tramadol.....	130
Figura 25.	Gráficos e equações de regressão ortogonal e seus respectivos coeficientes de correlação r entre a razão metabólica urinária 0-8h metoprolol/α-hidroximetoprolol (MR_{urina}) e a razão metabólica (+)-tramadol/(+)-M1 ou (-)-tramadol/(-)-M1.....	131
Figura 26.	Gráficos e equações de regressão ortogonal e seus respectivos coeficientes de correlação r entre a razão metabólica plasmática (MR_{plasma}) \log_{10} metoprolol/α-hidroximetoprolol e a razão metabólica (+)-tramadol/(+)-M1 ou (-)-tramadol/(-)-M1.....	132
Figura 27.	Gráficos e equações de regressão ortogonal e seus respectivos coeficientes de correlação r entre o clearance total aparente do midazolam e o clearance total aparente (Cl_T/F) do (+)-tramadol ou do (-)-tramadol.....	133
Figura 28.	Gráficos e equações de regressão ortogonal e seus respectivos coeficientes de correlação r entre o clearance total aparente do midazolam e as razões metabólicas (+)-tramadol/(+)-M2 ou (-)-tramadol/(-)-M2.....	134
Figura 29.	Modelo de relação entre o modelo bicompartimental de primeira ordem, com microconstantes e inclusão de <i>lag time</i> e modelo sigmóide de efeito máximo (E_{max}).....	150
Figura 30.	Modelo sigmóide de efeito máximo.....	150
Figura 31.	Concentrações de noradrenalina plasmática após administração oral de tramadol racêmico a pacientes portadores de dor neuropática fenotipados como metabolizadores extensivos do CYP2D6 (n=25).....	153
Figura 32.	Noradrenalina plasmática após administração oral de tramadol racêmico a pacientes portadores de dor neuropática fenotipados como metabolizadores extensivos do CYP2D6 dos Grupos Controle (n=10), DM tipo 1 (n=7), DM tipo 2 (n=8).....	154
Figura 33.	Análise PK-PD relacionando as concentrações livre+ligada às proteínas plasmáticas ou livre do (+)-M1 com a atenuação da dor neuropática nos pacientes dos Grupos Controle (n=9), DM tipo 1 (n=7) e DM tipo 2 (n=8).....	156

Figura 34.	Curvas individuais de concentração plasmática <i>versus</i> tempo para os enantiômeros do tramadol, M1 e M2 nos pacientes do Grupo Controle.....	185
Figura 35.	Curvas individuais de concentração plasmática <i>versus</i> tempo para os enantiômeros do tramadol, M1 e M2 nos pacientes do Grupo DM tipo 1.....	186
Figura 36.	Curvas individuais de concentração plasmática <i>versus</i> tempo para os enantiômeros do tramadol, M1 e M2 nos pacientes do Grupo DM tipo 2.....	187

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Características dos pacientes portadores de dor neuropática (n=12).....	36
Tabela 2.	Estudo do efeito matriz para os enantiômeros do tramadol, M1, M2 e padrão interno (PI) em seis diferentes lotes de plasma humano.....	50
Tabela 3.	Parâmetros de validação do método de análise dos enantiômeros do tramadol livre em plasma humano.....	51
Tabela 4.	Parâmetros de validação do método de análise da concentração total dos enantiômeros do tramadol em plasma humano.....	52
Tabela 5.	Parâmetros de validação do método de análise da concentração livre dos enantiômeros do M1 e M2 em plasma humano.....	53
Tabela 6.	Parâmetros de validação do método de análise da concentração total dos enantiômeros do M1 e M2 em plasma humano.....	54
Tabela 7.	Disposição cinética dos enantiômeros do tramadol, M1 e M2 nos pacientes portadores de dor neuropática (n=12) tratados com 100 mg de tramadol racêmico.....	56
Tabela 8.	Fração livre dos enantiômeros do tramadol, M1 e M2 nos pacientes portadores de dor neuropática (n=12).....	58
Tabela 9.	Características dos pacientes investigados nos Grupos DM tipo 1 (n=9) e DM tipo 2 (n=9).....	75
Tabela 10.	Características da doença dos pacientes investigados nos Grupos DM tipo 1 (n=9) e DM tipo 2 (n=9).....	76
Tabela 11.	Disposição cinética dos enantiômeros do tramadol, M1 e M2 total no Grupo DM tipo 1 (n=9) – pacientes tratados com 100 mg de tramadol racêmico. Os dados estão expressos como mediana (percentil 25 e 75) e média.....	82
Tabela 12.	Disposição cinética dos enantiômeros do tramadol, M1 e M2 total no Grupo DM tipo 2 (n=9) – pacientes tratados com 100 mg de tramadol racêmico.....	84

Tabela 13.	Disposição cinética dos eantiômeros do tramadol total nos Grupos Controle (n=12), DM tipo 1 (n=9) e DM tipo 2 (n=9) – pacientes tratados com 100 mg de tramadol racêmico.....	90
Tabela 14.	Disposição cinética dos enantiômeros do M1 total nos Grupos Controle (n=12), DM tipo 1 (n=9) e DM tipo 2 (n=9) – os pacientes foram tratados com 100 mg de tramadol racêmico.....	91
Tabela 15.	Disposição cinética dos enantiômeros do M2 total no Grupos Controle (n=12), DM tipo 1 (n=9) e DM tipo 2 (n=9) – os pacientes foram tratados com 100 mg de tramadol racêmico.....	92
Tabela 16.	Fração livre dos enantiômeros do tramadol, M1 e M2 nos pacientes do Grupo DM tipo 1 (n=9).....	94
Tabela 17.	Fração livre dos enantiômeros do tramadol, M1 e M2 nos pacientes do Grupo DM tipo 2 (n=9).....	95
Tabela 18.	Fração livre dos enantiômeros do tramadol, M1 e M2 nos Grupos Controle (n=12), DM tipo 1 (n=9) e DM tipo 2 (n=9) – pacientes tratados com 100 mg de tramadol racêmico.....	96
Tabela 19.	Limites de confiança do método de análise do metoprolol e α-hidroximetoprolol em urina.....	120
Tabela 20.	Investigação do fenótipo oxidativo tipo metoprolol através da razão metabólica de concentrações urinárias metoprolol/α-hidroximetoprolol nos pacientes portadores de dor neuropática (n=30).....	122
Tabela 21.	Investigação do fenótipo oxidativo tipo metoprolol através da razão metabólica de concentrações plasmáticas \log_{10} metoprolol/α-hidroximetoprolol (MR _{plasma}) nos pacientes portadores de dor neuropática (n=30).....	123
Tabela 22.	Investigação da atividade <i>in vivo</i> do CYP3A avaliado através do Cl _T /F MDZ (mL/min/kg) nos pacientes dos Grupos Controle (n=12), DM tipo 1 (n=9) e DM tipo 2 (n=9).....	126
Tabela 23.	Frequência do polimorfismo do gene CYP2B6 nos pacientes portadores de dor neuropática (n=30).....	128
Tabela 24.	Clearances dos enantiômeros do tramadol nos pacientes genotipados como G/G, G/T ou T/T para o CYP2B6.....	135

Tabela 25.	Reações adversas após administração de dose única oral de 100 mg de tramadol em pacientes com dor neuropática, portadores ou não de DM.....	152
Tabela 26.	Relação PK-PD e parâmetros estatísticos das concentrações totais dos enantiômeros do tramadol e a atenuação da dor neuropática em pacientes portadores de dor neuropática do Grupo Controle (n=7), DM tipo 1 (n=5) e DM tipo 2 (n=6).....	155
Tabela 27.	Estudo PK-PD relacionando as concentrações plasmáticas do (+)-M1 total e livre com a atenuação da dor neuropática em pacientes dos Grupos Controle (n=9), DM tipo 1 (n=7) e DM tipo 2 (n=8).....	157
Tabela 28.	Dados individuais de disposição cinética enantiosseletiva do <i>tramadol</i> em pacientes não diabéticos portadores de dor neuropática (Grupo Controle).....	188
Tabela 29.	Dados individuais de disposição cinética enantiosseletiva do M1 em pacientes não diabéticos portadores de dor neuropática (Grupo Controle).....	189
Tabela 30.	Dados individuais de disposição cinética enantiosseletiva do M2 em pacientes não diabéticos portadores de dor neuropática (Grupo Controle).....	190
Tabela 31.	Dados individuais de disposição cinética enantiosseletiva do <i>tramadol</i> em pacientes com DM tipo 1 portadores de dor neuropática (Grupo DM tipo 1).....	191
Tabela 32.	Dados individuais de disposição cinética enantiosseletiva do M1 em pacientes não diabéticos portadores de dor neuropática (Grupo DM tipo 1).....	192
Tabela 33.	Dados individuais de disposição cinética enantiosseletiva do M2 em pacientes diabéticos portadores de dor neuropática (Grupo DM tipo 1).....	193
Tabela 34.	Dados individuais de disposição cinética enantiosseletiva do <i>tramadol</i> em pacientes com DM tipo 2 portadores de dor neuropática (Grupo DM tipo 2).....	194
Tabela 35.	Dados individuais de disposição cinética enantiosseletiva do M1 em pacientes com DM tipo 2 portadores de dor neuropática (Grupo DM tipo 2).....	195
Tabela 36.	Dados individuais de disposição cinética enantiosseletiva do M2 em pacientes com DM tipo 2 portadores de dor neuropática (Grupo DM tipo 2).....	196

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGP	Alfa-1 glicoproteína ácida
AIC	Critério de Informação de Akaike
ALT	Alanina aminotransferase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	Aspartato aminotransferase
Bcrp	<i>Breast cancer resistance protein</i> (proteína relacionada à resistência do câncer de mama)
BHE	Barreira hematoencefálica
CV	Coeficiente de variação
CYP	Citocromo P450
DEA	Dietilamina
DM	<i>Diabetes mellitus</i>
DPBEA	Complexo ácido difenilbórico-etanolamina
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGTA	Ácido N,N,N',N'-tetracético etileno glicol-bis (b-éter amino etílico)
EM	Metabolizador extensivo
ESI	Ionização por <i>electrospray</i>
FM	Fase móvel
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HCFMRP-USP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IMC	Índice de massa corporal
IV	Intravenoso
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas
LG	<i>Lag time</i>
LIQ	Limite de quantificação
[M+H] ⁺	Íon molecular protonado
M1	O-desmetiltramadol
M2	N-desmetiltramadol
M3	N,N-didesmetiltramadol

M4	N,N,O-tridesmetiltramadol
M5	N,O-desmetiltramadol
M6	4-hidroxi-ciclohexil tramadol
MDZ	Midazolam
MRM	<i>Multiple reaction monitoring</i>
Mrp2	Multidrug resistance protein 2
Mrp4	Multidrug resistance protein 4
MS/MS	Espectrômetro de massas sequencial
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo adenina nicotinamida reduzido
NPA	<i>Naive pooled analysis</i>
Oat2	Transportador de ânion orgânico 2
OMS	Organização Mundial de Saúde
P-gp	Glicoproteína P
PI	Padrão interno
PK-PD	Farmacocinética-farmacodinâmica
PM	Metabolizador lento
r	Coeficiente de correlação linear
RDNP	Retinopatia diabética não proliferativa
RDP	Retinopatia diabética proliferativa
RFLP-PCR	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism – Polymerase Chain Reaction</i> (Reação da Cadeia pela Polimerase – PCR)
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SNC	Sistema nervoso central
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> , polimorfismo de base única
ToABR	Brometo de tetraoctilamônio
UGT	UDP-glicuronosiltransferase
UI	Unidade internacional
US FDA	<i>US Food and Drug Administration</i>
SPRQ	Soma ponderada dos resíduos quadrados

LISTA DE SÍMBOLOS

λ_{ex}	Comprimento de onda excitatório
λ_{em}	Comprimento de onda de emissão
γ	Coeficiente de Hill
Ae	Quantidade excretada
AUC	Área sob a curva concentração plasmática <i>versus</i> tempo
C _e	Concentração no compartimento de efeito
Cl creatinina	<i>Clearance</i> de creatinina
Cl _T /F	<i>Clearance</i> total aparente
C _e	Concentração no sítio de efeito
C _{max}	Concentração plasmática máxima
C _u	Concentração urinária
CV	Coeficiente de variação
E	Efeito
EC ₅₀	Concentração plasmática do fármaco requerida para produzir 50 % do efeito máximo
EC _{e50}	Concentração do fármaco no compartimento de efeito requerida para produzir 50 % do efeito máximo
E _{max}	Efeito máximo
F _u	Fração livre
k ₀₁	Constante da velocidade de absorção
k ₁₀	Constante da velocidade de eliminação
k ₁₂	Constante da velocidade de transferência do compartimento 1 para o 2
k ₂₁	Constante da velocidade de transferência do compartimento 2 para 1
K _{e0}	Constante da velocidade de transferência do compartimento central para o compartimento de efeito
K _{el}	Constante da velocidade de eliminação
K _i	Constante de afinidade
LT	<i>Lag time</i>
MR	Razão metabólica

MR_{plasma}	Razão metabólica no plasma
MR_{urina}	Razão metabólica na urina
$t_{1/2}$	Meia-vida
$t_{1/2a}$	Meia-vida de absorção
$t_{1/2f}$	Meia-vida de formação
$t_{1/2\alpha}$	Meia-vida de distribuição
$t_{1/2\beta}$	Meia-vida de eliminação
t_{\max}	Tempo para alcançar a concentração máxima
$V1_F$	Volume de distribuição aparente do compartimento 1
Vd/F	Volume de distribuição aparente
V_u	Volume de urina

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	25
Capítulo 1.....	28
1. Introdução.....	30
2. Objetivos.....	33
3. Casuística e métodos.....	34
3.1 Casuística.....	34
3.1.1 Aspectos éticos.....	34
3.1.2 Critérios de inclusão de pacientes.....	34
3.1.3 Protocolo clínico.....	37
3.2 Análise enantiosseletiva do tramadol e dos metabólitos M1 e M2 livre e total em plasma humano empregando LC-MS/MS.....	37
3.2.1 Solução padrão e reagentes.....	37
3.2.2 Análise cromatográfica.....	38
3.2.3 Preparo de amostras.....	39
3.2.4 Determinação da ordem de eluição dos enantiômeros do tramadol, M1 e M2.....	42
3.2.5 Determinação do efeito matriz.....	42
3.2.6 Teste de racemização.....	43
3.2.7 Validação.....	43
3.2.7.1 Curva de calibração/linearidade.....	43
3.2.7.2 Limite inferior de quantificação.....	44
3.2.7.3 Recuperação.....	44
3.2.7.4 Precisão e exatidão.....	44
3.2.7.5 Estabilidade.....	45
3.3 Análise farmacocinética.....	46
3.4 Análise estatística.....	47
4. Resultados.....	48
4.1 Análise enantiosseletiva do tramadol, M1 e M2 livre e total em plasma humano.....	48
4.1.1 Ordem de eluição dos enantiômeros do tramadol, M1 e M2.....	48
4.1.2 Racemização.....	50
4.1.3 Estudo do efeito matriz.....	50
4.1.4 Validação do método de análise enantiosseletiva do tramadol, M1 e M2 livre e total em plasma humano.....	50
4.2 Farmacocinética dos enantiômeros do tramadol, M1 e M2 total em pacientes portadores de dor neuropática.....	55
4.3 Avaliação da fração livre dos enantiômeros do tramadol, M1 e M2 em plasma humano.....	58
5. Discussão.....	59
Capítulo 2.....	66
1. Introdução.....	68
2. Objetivos.....	73
3. Casuística e métodos.....	74
3.1 Casuística.....	74
3.1.1 Cálculo do tamanho amostral.....	78

3.1.2 Protocolo clínico.....	79
3.2 Métodos.....	79
3.2.1 Análise enantiosseletiva do tramadol, M1 e M2 livre e total.....	79
3.2.2 Análise farmacocinética.....	80
3.2.3 Análise estatística.....	80
4. Resultados.....	81
4.1 Farmacocinética dos enantiômeros do tramadol, M1 e M2 total nos pacientes do Grupo DM tipo 1.....	81
4.2 Farmacocinética dos enantiômeros do tramadol, M1 e M2 total nos pacientes do Grupo DM tipo 2.....	83
4.3 Estudo da influência do DM tipo 1 e DM tipo 2 na disposição cinética e metabolismo enantiosseletivos do tramadol.....	85
4.4 Fração livre dos enantiômeros do tramadol, M1 e M2 nos pacientes dos grupos DM tipo 1 e DM tipo 2.....	94
4.5 Influência do DM tipo 1 e DM tipo 2 na fração livre dos enantiômeros do tramadol, M1 e M2.....	96
5. Discussão.....	98
Capítulo 3.....	104
1. Introdução.....	106
2. Objetivo.....	109
3. Casuística e métodos.....	110
3.1 Casuística e protocolo clínico.....	110
3.2 Análise do metoprolol e α-hidroximetoprolol em urina e plasma.....	111
3.2.1 Soluções padrão e reagentes.....	111
3.2.2 Análise cromatográfica.....	111
3.2.3 Preparo das amostras.....	112
3.2.4 Validação do método analítico.....	114
3.2.4.1 Curva de calibração/linearidade	114
3.2.4.2 Limite inferior de quantificação.....	114
3.2.4.3 Recuperação.....	114
3.2.4.4 Precisão e exatidão.....	115
3.2.4.5 Estabilidade.....	115
3.3 Análise do midazolam em plasma.....	116
3.4 Análise das variantes alélicas do CYP2B6.....	117
3.5 Análise farmacocinética.....	118
3.5.1 Avaliação da atividade <i>in vivo</i> do CYP2D6 empregando metoprolol como marcador.....	118
3.5.2 Avaliação da atividade <i>in vivo</i> do CYP3A empregando midazolam como marcador.....	119
3.6 Análise estatística.....	119
4. Resultados.....	120
4.1 Análise do metoprolol e α-hidroximetoprolol em urina.....	120
4.2 Fenótipo tipo metoprolol.....	122
4.3 Atividade <i>in vivo</i> do CYP3A.....	126
4.4 Genótipo do CYP2B6.....	128
4.5 Correlação entre a atividade <i>in vivo</i> do CYP2D6, atividade <i>in vivo</i> do CYP3A4 e o genótipo do CYP2B6 e a farmacocinética dos enantiômeros do tramadol.....	129
5. Discussão.....	136

Capítulo 4.....	141
1. Introdução.....	143
2. Objetivo.....	145
3. Casuística e métodos.....	146
3.1 Casuística e protocolo clínico.....	146
3.2 Análise de noradrenalina em plasma.....	147
3.2.1 Soluções padrão e reagentes.....	147
3.2.2 Análise cromatográfica.....	147
3.2.3 Preparo de amostra.....	148
3.2.4 Curvas de calibração.....	148
3.3 Análise farmacocinética-farmacodinâmica (PK-PD).....	148
3.3.1 Análise PK-PD relacionando as concentrações plasmáticas do tramadol com a atenuação da dor neuropática.....	148
3.3.2 Análise PK-PD relacionando as concentrações plasmáticas do (+)-M1 total e livre com a atenuação da dor neuropática.....	150
3.4 Análise estatística.....	151
4. Resultados.....	152
4.1 Reações adversas.....	152
4.2 Avaliação das concentrações plasmáticas de noradrenalina.....	153
4.3 Análise PK-PD relacionando as concentrações plasmáticas do tramadol como enantiômeros individuais ou como mistura enantiomérica com a atenuação da dor neuropática.....	155
4.4 Análise PK-PD relacionando as concentrações plasmáticas do (+)-M1 total ou livre com a atenuação da dor neuropática.....	156
5. Discussão.....	158
CONCLUSÕES.....	163
REFERÊNCIAS.....	166
Apêndices.....	184
Anexos.....	197

Introdução

INTRODUÇÃO

O tramadol é um analgésico de ação central empregado no tratamento de diversas condições dolorosas agudas e crônicas, entre elas a dor neuropática. A dor neuropática é definida pela *International Association for the Study of Pain* como dor iniciada por lesão primária ou disfunção do sistema nervoso (ADRIAENSEN et al., 2005), sendo que a dor neuropática diabética é causada por alterações vasculares e danos metabólicos provocados pela hiperglicemia. A neuropatia diabética é considerada uma das complicações do *diabetes mellitus* (DM), e a dor neuropática resultante do diabetes é similar a dor neuropática não diabética em termos da sintomatologia e na resposta ao tratamento farmacológico (BANSAL; KALITA; MISRA, 2006; ATTAL et al., 2010).

O tramadol encontra-se disponível na clínica médica sob a forma de racemato dos enantiômeros (+)-tramadol e (-)-tramadol. O metabolismo do tramadol é mediado principalmente pelo CYP2D6 com formação do metabólito ativo O-desmetiltramadol (M1) e pelos CYPs 2B6 e 3A4 com formação do N-desmetiltramadol (M2). A atividade analgésica do tramadol se deve à atividade μ -opióide do (+)-M1, mas também à atividade monoaminérgica dos enantiômeros do (+)-tramadol e (-)-tramadol, atuando como inibidores da recaptação de serotonina e noradrenalina, respectivamente. Portanto, a atividade farmacológica do tramadol é considerada mista, de forma que a analgesia é mediada pelas atividades opióide e monoaminérgica de forma sinérgica e complementar (RAFFA et al., 1992; RAFFA et al., 1993; FRINK et al., 1996; GILLEN et al., 2000).

O DM pode alterar a absorção gastrintestinal, a distribuição, o metabolismo e a excreção renal dos fármacos em uso na clínica dependendo do tipo e do tempo de diagnóstico da doença, assim como do substrato investigado (PRESTON et al., 2001; PRESTON; EPSTEIN, 1999). Além disso, prejuízo nos processos de absorção de analgésicos com consequente perda da sua eficácia terapêutica são reportados em pacientes com dor aguda (KULMATYCKI; JAMALI, 2007; JAMALI; AGHAZADEH-HABASHI, 2008).

A presente tese tem como objetivo principal avaliar a influência do *diabetes mellitus* (DM) tipo 1 e tipo 2 descompensado na disposição cinética, metabolismo e farmacocinética-farmacodinâmica (PK-PD) dos enantiômeros do tramadol em

pacientes com dor neuropática. O presente estudo foi dividido em quatro capítulos, os quais incluem o desenvolvimento de métodos analíticos, o estudo clínico da influência do diabetes na farmacocinética do tramadol, a farmacogenética do tramadol e o estudo PK-PD em pacientes com dor neuropática.

O **Capítulo 1** apresenta o desenvolvimento e validação de métodos enantiosseletivos de análise do tramadol, M1 e M2 em plasma humano, sendo um método para análise da concentração plasmática total e outro para a análise da concentração não ligada às proteínas plasmáticas. Neste capítulo foram investigados a disposição cinética, a fração livre e o metabolismo enantiosseletivos do tramadol e dos seus principais metabólitos de fase I, M1 e M2, em pacientes não diabéticos portadores de dor neuropática.

Considerando o uso do tramadol no tratamento da dor neuropática diabética o **Capítulo 2** investiga a influência do DM tipo 1 e DM tipo 2 descompensados na disposição cinética e no metabolismo enantiosseletivos do tramadol em pacientes tratados com dose única do fármaco sob a forma de racemato e fenotipados como metabolizadores extensivos do CYP2D6.

O estudo da farmacogenética envolvido com a farmacocinética do tramadol foi tratado no **Capítulo 3**. Considerando a formação dos metabólitos (+)-M1 e (-)-M1 mediada pela atividade geneticamente determinada do CYP2D6, foram incluídos no estudo somente pacientes fenotipados como metabolizadores extensivos para o CYP2D6. Considerando ainda que a formação dos metabólitos (+)-M2 e (-)-M2 é mediada principalmente pela atividade do CYP2B6 e do CYP3A4, os pacientes foram avaliados quanto à atividade *in vivo* do CYP3A empregando o midazolam como fármaco marcador e genotipados para o CYP2B6.

O **Capítulo 4** mostra as concentrações plasmáticas de noradrenalina antes e até 24 horas após a administração de dose única do tramadol, assim como, o modelo farmacocinética-farmacodinâmica (PK-PD) relacionando as concentrações plasmáticas dos enantiômeros do tramadol e do metabólito ativo (+)-M1 com a atenuação da intensidade da dor neuropática em pacientes portadores ou não de DM.

Capítulo 1

Capítulo 1

Disposição cinética, fração livre e metabolismo enantiosseletivos do tramadol em pacientes portadores de dor neuropática fenotipados como metabolizadores extensivos do CYP2D6

1. INTRODUÇÃO

O tramadol, sintetizado pela primeira vez no ano de 1962, demonstrou-se um analgésico eficaz no tratamento da dor em um estudo clínico aberto multicêntrico no ano de 1977, na Alemanha (SCHENCK; AREND, 1978). Tornou-se um opióide frequentemente prescrito na Alemanha após demonstrar uma baixa incidência de efeitos adversos quando comparado aos outros analgésicos opióides disponíveis na época (BONO; CUFFARI, 1997). Seus registros no Reino Unido, nos EUA e no Brasil foram feitos nos anos de 1994, 1995 e 1996, respectivamente (BRASIL, 1996; GROND; SABLOTZKI, 2004).

O tramadol é um analgésico de ação central disponível na clínica sob várias formas farmacêuticas, tais como soluções injetáveis, cápsulas, comprimidos e supositórios (SWEETMAN et al., 2002; GROND; SABLOTZKI, 2004). O fármaco apresenta dois centros quirais, e portanto, quatro estereoisômeros. A mistura racêmica do tramadol utilizada no tratamento da dor aguda ou crônica, consiste de (+)-tramadol [(1R,2R)-(+)-cloridrato de 2-[(dimetilamina) metil]-1-(3-metoxifenil)-ciclohexanol] e (-)-tramadol [(1S,2S)-(-)-cloridrato de 2-[(dimetilamina) metil]-1-(3-metoxifenil)-ciclohexanol].

É metabolizado principalmente por O-desmetilação e N-desmetilação e por reações de conjugação com o ácido glicurônico ou com sulfonatos. A O-desmetilação do tramadol ao metabólito ativo O-desmetiltramadol (M1) é dependente do CYP2D6, enquanto a N-desmetilação com formação do metabólito N-desmetiltramadol (M2) é dependente do CYP2B6 e CYP3A4 (Figura 1). A eliminação do M2 também é influenciada pela atividade *in vivo* do CYP2D6 (GARCÍA-QUETGLAS et al., 2007b). Em menor extensão são formados o N,N-didesmetiltramadol (M3), N,N,O-tridesmetiltramadol (M4) e N,O-desmetiltramadol (M5). Os metabólitos do tramadol são eliminados principalmente na urina (aproximadamente 90%), sendo que 25-30% da dose é eliminada de forma inalterada (LINTZ et al., 1981; GROND; SABLOTZKI, 2004).

Os dois isômeros do tramadol contribuem para a atividade analgésica, sendo que o (+)-tramadol e o metabólito (+)-M1 agem como agonistas do receptor opióide do tipo μ . O (+)-tramadol inibe a recaptação de serotonina e o (-)-tramadol inibe a recaptação de norepinefrina (GROND; SABLOTZKI, 2004). A afinidade do (+)-M1 pelo receptor opióide μ é aproximadamente 300 vezes maior do que a observada

para o fármaco inalterado (HENNIES; FRIDERICHHS; SCHNEIDER, 1988; GROND; SABLOTZKI, 2004). O US FDA (*US Food and Drug Administration*) classifica o tramadol como um analgésico de ação central atípico devido a contribuição complementar e sinergística dos seus enantiômeros e metabólitos nos sistemas opioide e monoaminérgico (RAFFA et al., 1992; RAFFA et al., 1993).

A biodisponibilidade oral do tramadol é de 87-95 % em dose única e de 90-100 % em dose múltipla. A concentração plasmática máxima (C_{max}) ocorre 1,2 h após a administração de comprimidos (LINTZ et al., 1998) e 1,6-1,9 h após a administração de cápsulas (LINTZ et al., 1986). A administração de dose única oral de 100 mg de tramadol resulta em valores de C_{max} de aproximadamente 300 ng/mL (LINTZ et al., 1986; LINTZ et al., 1998). O volume de distribuição do tramadol é de 306 L na administração oral e a ligação às proteínas plasmáticas é de aproximadamente 20 % (LINTZ et al., 1986; LEE et al., 1993). Recentemente, foi demonstrado que os enantiômeros do tramadol e o M1 não são substratos do transportador de efluxo glicoproteína-P (P-gp) (KANAAN et al., 2009).

Estudos relatam que o metabolismo e a excreção renal do tramadol são enantiosseletivos tanto após administração oral ou intravenosa. Em voluntários saudáveis a área sob a curva concentração plasmática versus tempo (AUC) é maior para o (+)-tramadol do que para o (-)-tramadol após administração oral de 100 mg de tramadol racêmico, com razão (+)/(-) de 1,28. A formação do M2 também é enantiosseletiva com maior AUC para o (+)-M2 (GARCÍA QUETGLAS et al., 2007a).

O conhecimento da enantiosseletividade na farmacocinética do tramadol requer para o presente estudo métodos de análise capazes de diferenciar entre os enantiômeros do tramadol, M1 e M2. Foi descrita a análise enantiosseletiva simultânea do tramadol, M1 e M2 em plasma humano empregando LC-MS-MS, e, pela primeira vez, a análise da concentração não ligada às proteínas plasmáticas dos mesmos analitos em plasma. Os métodos desenvolvidos e validados foram aplicados no estudo de disposição cinética, fração livre (F_u) e metabolismo em pacientes portadores de dor neuropática tratados com dose única oral de tramadol racêmico e fenotipados como metabolizadores extensivos do CYP2D6.

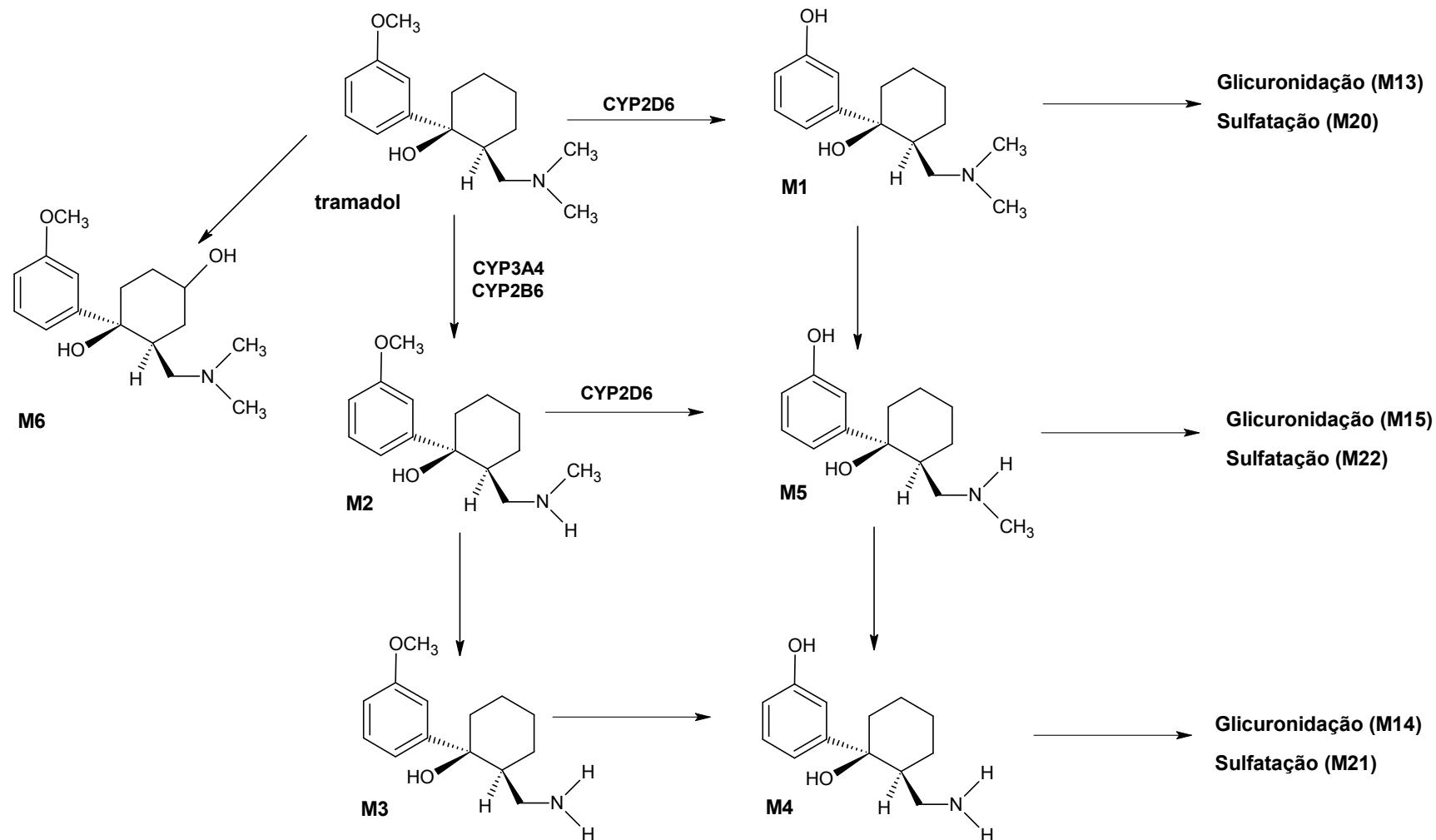


Figura 1 - Fórmulas estruturais do tramadol e seus principais metabólitos (modificado de SUBRAHMANYAM et al., 2001)

Conclusões

CONCLUSÕES

1. Os métodos de análise simultânea dos enantiômeros do tramadol e dos metabólitos M1 e M2 total e livre em plasma humano empregando a coluna Chiralpak® AD em sistema LC-MS/MS apresentam limites de confiança compatíveis com a aplicação em estudos de farmacocinética em dose única. Os limites de quantificação na análise dos fármacos total foram de 0,2 ng/mL para cada enantiômero do tramadol e de 0,1 ng de cada enantiômero/mL de plasma para o M1 e M2. Portanto, este é o método mais sensível para análise simultânea dos enantiômeros do tramadol, M1 e M2. Os limites de quantificação na análise da concentração livre foram de 0,5 ng/mL para cada enantiômero do tramadol e de 0,25 ng de cada enantiômero/mL de plasma para o M1 e M2.

2. A farmacocinética do tramadol e seus metabólitos é enantiosseletiva com acúmulo plasmático do (+)-tramadol e (+)-M2 em pacientes não diabéticos portadores de dor neuropática fenotipados como metabolizadores extensivos do CYP2D6. A ligação às proteínas plasmáticas não é enantiosseletiva, e a fração livre de ambos os enantiômeros do tramadol é aproximadamente 4 vezes maior que a fração livre de ambos os enantiômeros do metabólito M1.

3. O DM tipo 1 promove redução nas concentrações plasmáticas dos metabólitos (+)-M1 e (-)-M1 de aproximadamente 4 e 2 vezes, respectivamente. Paralelamente, a fração livre do (+)-M1 aumenta cerca de 4 vezes e a do (-)-M1 cerca de 2 vezes, em relação ao Grupo Controle.

4. O DM tipo 2 resulta em concentrações plasmáticas do (-)-M1 aproximadamente 2 vezes menores que o Grupo Controle, e um aumento de cerca de 2 vezes na sua fração livre.

5. Os pacientes portadores de dor neuropática investigados mostram correlações significativas entre as razões metabólicas de AUC (+)-tramadol/(+)-M1 ou (-)-tramadol/(-)-M1 com a atividade *in vivo* do CYP2D6 avaliada em plasma ou urina empregando o metoprolol como fármaco marcador, um indicativo da valia do tramadol como fármaco marcador do CYP2D6.

6. As concentrações plasmáticas de noradrenalina observadas antes da administração do tramadol não mostram diferenças entre os grupos de pacientes investigados portadores ou não de DM. As concentrações plasmáticas de noradrenalina avaliadas até 24 horas após a administração do tramadol para todos

os pacientes investigados ($n=25$) mostram tendência de redução após o tempo de observação da concentração plasmática máxima do metabólito ativo (+)-M1 e retorno aos valores basais 24 horas após a administração do tramadol.

7. O modelo farmacodinâmico sigmóide de efeito máximo foi empregado para relacionar as concentrações plasmáticas do (+)-M1 com a atenuação da dor neuropática dos pacientes dos Grupos Controle, DM tipo 1 e DM tipo 2. As concentrações plasmáticas livre do (+)-M1 necessárias para alcançar 50% do efeito máximo mostram menor variabilidade entre os grupos quando comparadas com as concentrações plasmáticas totais. Tais resultados demonstram que a determinação da concentração plasmática livre do enantiômero individual é a mais adequada para a aplicação em estudos de farmacocinética-farmacodinâmica.

Referências

REFERÊNCIAS

1. ABDEL-RAHMAN, S. M.; LEEDER, J. S.; WILSON, J. T.; GAEDIGK, A.; GOTSCHELL, R. R.; MEDVE, R.; LIAO, S.; SPIELBERG, S. P.; KEARNS, G. L. Concordance between tramadol and dextromethorphan parent/metabolite ratios: the influence of CYP2D6 and non-CYP2D6 pathways on biotransformation. *J. Clin. Pharmacol.*, Thousand Oaks, v. 42, n. 1, p. 24-29, 2002.
2. ADITHAN, C.; SRINIVAS, B.; INDHIRESAN, J.; SHASHINDRAN, C. H.; BAPNA, J. S.; THAKUR, L. C.; SWAMINATHAN, R. P. Influence of type I and type II diabetes mellitus on phenytoin steady-state levels. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, München, v. 29, n. 8, p. 310-313, 1991.
3. ADRIAENSEN, H.; PLAGHKI, L.; MATHIEU, C.; JOFFROY, A.; VISSERS, K. Critical review of oral drug treatments for diabetic neuropathic pain – clinical outcomes based on efficacy and safety data from placebo-controlled and direct comparative studies. *Diabetes Metab. Res. Rev.*, Oxford, v. 21, n. 3, p. 231-240, 2005.
4. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RE nº899 de 29 de maio de 2003. Guia para Validação de Métodos Bioanalíticos. *Diário Oficial*, Brasília, 30 de maio de 2003.
5. AGHAZADEH-HABASHI, A.; JAMALI, F. Pharmacokinetics of meloxicam administered as regular and fast dissolving formulations to the rat: influence of gastrointestinal dysfunction on the relative bioavailability of two formulations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, Stuttgart, v. 70, n. 3, p. 899-894, 2008.
6. AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, New York, v. 33, n. 1, S62-S69, 2010.
7. ARDAKANI, Y. H.; MEHVAR, R.; FOROUMADI, A.; ROUINI, M. R. Enantioselective determination of tramadol and its main phase I metabolites in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, Amsterdam, v. 864, n. 1-2, p. 109-115, 2008.
8. ARDAKANI, Y. H.; ROUINI, M. R. Improved liquid chromatographic method for the simultaneous determination of tramadol and its three main metabolites in human plasma, urine and saliva. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, London, v. 44, n. 5, p. 1168-1173, 2007.
9. ARIYOSHI, N.; MIYAZAKI, M.; TOIDE, K.; SAWAMURA, Y. I.; KAMATAKI, T. A single nucleotide polymorphism of CYP2B6 found in Japanese enhances catalytic activity by autoactivation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, New York, v. 281, n. 5, p. 1256-1260, 2001.
10. ATTAL, N.; CRUCCU, G.; BARON, R.; HAANPAA, M.; HANSSON, P.; JENSEN, T. S.; NURMIKKO, T.; EUROPEAN FEDERATION OF NEUROLOGICAL SOCIETIES. EFNS guidelines on the pharmacological

- treatment of neuropathic pain: 2010 revision. *Eur. J. Neurol.*, Oxford, v. 17, n. 9, p. 1113-e88, 2010.
11. BANSAL, V.; KALITA, J.; MISRA, U. K. Diabetic neuropathy. *Postgrad. Med. J.*, London, v. 82, n. 964, p. 95-100, 2006.
 12. BARANOWSKA, I.; WILCZEK, A. Simultaneous RP-HPLC determination of sotalol, metoprolol, alpha-hydroxymetoprolol, paracetamol and its glucuronide and sulfate metabolites in human urine. *Anal. Sci.*, Tokyo, v. 25, n. 6, p. 769-772, 2009.
 13. BARNETT, C. R.; FLATT, P. R., IOANNIDES, C. Induction of hepatic microsomal P450 I e IIB proteins by hyperketonaemia. *Biochem. Pharmacol.*, Oxford, v. 40, n. 2, p. 393-397, 1990.
 14. BECHTEL Y. C.; JOANNE, C.; GRANDMOTTET, M.; BECHTEL, P. R. The influence of insulin-dependent diabetes on the metabolism of caffeine and the expression of the debrisoquin oxidation phenotype. *Clin. Pharmacol. Ther.*, New York, v. 44, n. 4, p. 408-417, 1988.
 15. BEIER, H.; GARRIDO, M. J.; CHRISTOPH, T.; KASEL, D.; TROCÓNIZ, I. F. Semi-mechanistic pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling of the antinociceptive response in the presence of competitive antagonism: the interaction between tramadol and its active metabolite on μ -opioid agonism and monoamine reuptake inhibition, in the rat. *Pharm. Res.*, Stuttgart, v. 25, n. 8, p. 1789-1797, 2008.
 16. BELLWARD, G. D.; CHANG, T.; RODRIGUES, B.; MCNEILL, J. H.; MAINES, S.; RYAN, D. E.; LEVIN, W.; THOMAS, P. E. Hepatic cytochrome P-450 j induction in the spontaneously diabetic BB rat. *Mol. Pharmacol.*, New York, v. 33, n. 2, p. 140-143, 1988.
 17. BENET, L. Z. Clearance (née Rowland) concepts: a downdate and an update. *J Pharmacokinet. Pharmacodyn.*, Bristol, v. 37, n. 6, p. 529-539, 2010.
 18. BONO, A. V.; CUFFARI, S. Effectiveness and tolerance of tramadol in cancer pain. A comparative study with respect to buprenorphine. *Drugs*, New York, v. 53, n. 2, p. 40-49, 1997.
 19. BORBÁS,T.; BENKO, B.; DALMADI, B.; SZABÓ, I.; TIHANYI, K. Insulin in flavin-containing monooxygenase regulation. Flavin-containing monooxygenase and cytochrome P450 activities in experimental diabetes. *Eur. J. Pharm. Sci.*, Amsterdam, v. 28, n. 1-2, p. 51-58, 2006.
 20. BOUAZIZ, H.; TONG, C.; YOON, Y.; HOOD, D. D.; EISENACH, J. C. Intravenous opioids stimulate norepinephrine and acetylcholine release in spinal cord dorsal horn. Systematic studies in sheep and an observation in a human. *Anesthesiology*, Philadelphia, v. 84, n. 1, p. 143-154, 1996.
 21. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Departamento Técnico-Normativo. Portaria N°207, de 8 de maio de 1996. *Diário Oficial da União*, Poder Executivo, Brasília (DF) 1996 maio 10; Sec.1:141-6.

22. BRAUN, L.; COFFEY, M.J.; PUSKÁS, F.; KARDON, T.; NAGY, G. CONLEY, A.A.; BURCHELL, B.; MANDL, J. Molecular basis of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase induction in spontaneously diabetic rats, acetone-treated rats and starved rats. *Biochem. J.*, London, v. 336, p. 587-592, 1998.
23. CAMPANERO, M. A.; CALAHORRA, B.; VALLE, M.; TROCONIZ, I. F.; HONORATO, J. Enantiomeric separation of tramadol and its active metabolite in human plasma by chiral high-performance liquid chromatography: application to pharmacokinetic studies. *Chirality*, New York, v. 11, n. 4, p. 272-279, 1999.
24. CAMPANERO, M. A.; GARCÍA-QUETGLAS, E. G.; SÁBADA, B.; AZANZA, J. R. Simultaneous stereoselective analysis of tramadol and its primary phase I metabolites in plasma by liquid chromatography. Application to a pharmacokinetic study in humans. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v. 1031, p. 219-228, 2004.
25. CARVALHO, T. M.; CAVALLI, R. C.; CUNHA, S. P.; DE BARALDI, C. O.; MARQUES, M. P.; ANTUNES, N. J.; GODOY, A. L.; LANCHOTE, V. L. Influence of gestational diabetes mellitus on the stereoselective kinetic disposition and metabolism of labetalol in hypertensive patients. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, Berlin, v. 67, n. 1, p. 55-61, 2011.
26. CECCATO, A.; CHIAP, P.; HUBERT, P.; CROMMEN, J. Automated determination of tramadol enantiomers in human plasma using solid-phase extraction in combination with chiral liquid chromatography. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, Amsterdam, v. 698, n. 1-2, p. 161-170, 1997.
27. CECCATO, A.; VANDERBIST, F.; PABST, J. Y.; STREEL, B. Enantiomeric determination of tramadol and its main metabolite O-desmethyltramadol in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, Amsterdam, v. 748, n. 1, p. 65-76, 2000.
28. CHENG, P. Y.; MORGAN, E. T. Hepatic cytochrome P450 regulation in disease states. *Curr. Drug Metab.*, Hilversum, v. 2, n. 2, p. 165-183, 2001.
29. CHIU, F. C.; DAMANI, L. A.; LI, R. C.; TOMLINSON, B. Efficient high-performance liquid chromatography assay for the simultaneous determination of metoprolol and two main metabolites in human urine by solid-phase extraction and fluorescence detection. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, Amsterdam, v. 696, n. 1, p. 69-74, 1997.
30. CHYTIL, L.; STÍCHA, M.; MATOUSKOVÁ, O.; PERLÍK, F.; SLANAR, O. Enantiomeric determination of tramadol and O-desmethyltramadol in human urine by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, Amsterdam, v. 877, n. 20-21, p. 1937-1942, 2009.
31. COSSMANN, M.; KOHNEN, C.; LANGFORD, R.; MCCARTNEY, C. Tolerance and safety of tramadol use. Results of international studies and data from drug surveillance. *Drugs*, New York, v. 53, n. 2, p. 50-62, 1997.
32. CYP Alleles Nomenclature Committee. Homepage of the human cytochrome P450 (CYP) allele Nomenclature Committee. Disponível em:

- <http://www.cypalleles.ki.se/>. Acesso em: 18/03/2011.
33. DAVAALKHAM, J.; HAYASHIDA, T.; TSUCHIYA, K.; GATANAGA, H.; NYAMKHUU, D.; OKA, S. Allele and genotype frequencies of cytochrome P450 2B6 gene in a Mongolian population. *Drug Metab. Dispos.*, Bethesda, v. 37, n. 10, p. 1991-1993, 2009.
 34. DOBECKI, D. A.; SCHOCKET, S. M.; WALLACE, M. S. Update on pharmacotherapy guidelines for the treatment of neuropathic pain. *Curr. Pain Headache Rep.*, Philadelphia, v. 10, n. 3, p. 185-190, 2006.
 35. DONG, Z. G.; HONG, J. Y.; MA, Q. A.; LI, D. C.; BULLOCK, J.; GONZALEZ, F. J.; PARK, S. S.; GELBOIN, H. V.; YANG, C. S. Mechanism of induction of cytochrome P-450ac (P-450j) in chemically induced and spontaneously diabetic rats. *Arch. Biochem. Biophys.*, New York, v. 263, p. 29-35, 1988.
 36. DOUCET, J.; FRESEL, J.; HUE, G.; MOORE, N. Protein binding of digitoxin, valproate and phenytoin in sera from diabetics. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, Berlin, v. 45, n. 6, p. 577-579, 1993.
 37. DUKE, A. N.; BIGELOW, G. E.; LANIER, R. K.; STRAIN, E. C. Discriminative stimulus effects of tramadol in humans. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Baltimore, v. 338, n. 1, p. 255-262, 2011.
 38. DUPONT, W. D.; PLUMMER, W. D. PS power and sample size program available for free on the Internet. *Control Clin. Trials*, New York, v. 18, n. 3, p. 274, 1997.
 39. DWORKIN, R. H.; O'CONNOR, A. B.; AUDETTE, J.; BARON, R.; GOURLAY, G. K.; HAANPÄÄ, M. L.; KENT, J. L.; KRANE, E. J.; LEBEL, A. A.; LEVY, R. M.; MACKEY, S. C.; MAYER, J.; MIASKOWSKI, C.; RAJA, S. N.; RICE, A. S.; SCHMADER, K. E.; STACEY, B.; STANOS, S.; TREEDE, R. D.; TURK, D. C.; WALCO, G. A.; WELLS, C. D. Recommendations for the pharmacological management of neuropathic pain: an overview and literature update. *Mayo Clin. Proc.*, Rochester, v. 85, n. 3, p. S3-14, 2010.
 40. ENGGAARD, T. P.; POULSEN, L.; ARENDT-NIELSEN, L.; BRØSEN, K.; OSSIG, J.; SINDRUP, S. H. The analgesic effect of tramadol after intravenous injection in healthy volunteers in relation to CYP2D6. *Anesth Analg*, Cleveland, v. 102, n. 1, p. 146-150, 2006.
 41. FAVREAU, L. V.; SCHENKMAN, J. B. Cytochrome P-450 alterations in the BB/Wor spontaneously diabetic rat. *Biochem. Pharmacol.*, Oxford, v. 37, n. 18, p. 3505-3509, 1988.
 42. FLIEGERT, F.; KURTH, B.; GÖHLER, K. The effects of tramadol on static and dynamic pupillometry in healthy subjects – the relationship between pharmacodynamics, pharmacokinetics and CYP2D6 metaboliser status. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, Berlin, v. 61, n. 4, p. 257-266, 2005.
 43. FORSTER, C. D.; MACDONALD, I. A.; The assay of the catecholamine content of small volumes of human plasma. *Biomed. Chromatogr.*, London, v. 13, n. 3,

- p. 209-215, 1999.
44. FRANK, D.; JAEHDE, U.; FUHR, U. Evaluation of probe drugs and pharmacokinetic metrics for CYP2D6. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, Berlin, v. 63, n. 4, p. 321-333, 2007.
 45. FRINK, M. C.; HENNIES, H. H.; ENGLBERGER, W.; HAURAND, M.; WILFFERT, B. Influence of tramadol on neurotransmitter systems of the rat brain. *Arzneimittelforschung*, Aulendorf, v. 46, n. 11, p. 1029-1036, 1996.
 46. GABRIELSSON, J. L.; WEINER, D. L. Methodology for pharmacokinetic/pharmacodynamic data analysis. *Pharm. Sci. Technolo. Today*, Oxford, v. 2, n. 6, p. 244-252, 1999.
 47. GABRIELSSON, J. L.; WEINER, D. L. Pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis: concepts and applications. 3rd ed. Swedish Pharmaceutical Press: Sweeden, 2000
 48. GARCIA QUETGLAS, E.; AZANZA, J. R.; CARDENAS, E.; SÁDABA, B.; CAMPANERO, M. A. Stereoselective pharmacokinetic analysis of tramadol and its main phase I metabolites in healthy subjects after intravenous and oral administration of racemic tramadol. *Biopharm. Drug Dispos.*, Chichester, v. 28, n. 1, p. 19-33, 2007a.
 49. GARCIA-QUETGLAS, E.; AZANZA, J. R.; SÁDABA, B.; MUÑOZ, M. J.; GIL, I.; CAMPANERO, M. A. Pharmacokinetics of tramadol enantiomers and their respective phase I metabolites in relation to CYP2D6 phenotype. *Pharmacol. Res.*, London, v. 55, n. 2, p. 122-130, 2007b.
 50. GARDNER, E. R.; DAHUT, W.; FIGG, W. D. Quantitative determination of total and unbound paclitaxel in human plasma following Abraxane treatment. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, Amsterdam, v. 862, n. 1-2, p. 213-218, 2008.
 51. GARRIDO, M. J.; HABRE, W.; ROMBOUT, F.; TROCÓNIZ, I. F. Population pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling of the analgesic effects of tramadol in pediatrics. *Pharm. Res.*, Stuttgart, v. 23, n. 9, p. 2014-2023, 2006.
 52. GARRIDO, M. J.; SAYAR, O.; SEGURA, C.; RAPADO, J.; DIOS-VIÉTEZ, M. C.; RENEDO, M. J.; TROCÓNIZ, I. F. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling of the antinociceptive effects of (+)-tramadol in the rat: role of cytochrome P450 2D activity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Baltimore, v. 305, n. 2, p. 710-718, 2003.
 53. GARRIDO, M. J.; VALLE, M.; CAMPANERO, M. A.; CALVO, R.; TROCÓNIZ, I. F. Modeling of the in vivo antinociceptive interaction between an opioid agonist, (+)-O-desmethyltramadol, and a monoamine reuptake inhibitor, (-)-O-desmethyltramadol, in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Baltimore, v. 295, n. 1, p. 352-359, 2000.
 54. GATANAGA, H.; HAYASHIDA, T.; TSUCHIYA, K.; YOSHINO, M.; KUWAHARA, T.; TSUKADA, H.; FUJIMOTO, K.; SATO, I.; UEDA, M.; HORIBA, M.;

- HAMAGUCHI, M.; YAMAMOTO, M.; TAKATA, N.; KIMURA, A.; KOIKE, T.; GEJYO, F.; MATSUSHITA, S.; SHIRASAKA, T.; KIMURA, S.; OKA, S. Successful efavirenz dose reduction in HIV type 1-infected individuals with cytochrome P450 2B6*6 and *26. *Clin. Infect. Dis.*, Chicago, v. 45, n. 9, p. 1230-1237, 2007.
55. GATTI, G.; CREMA, F.; ATTARDO-PARRINELLO, G.; FRATINO, P.; AGUZZI, F.; PERUCCA, E. Serum protein binding of phenytoin and valproic acid in insulin-dependent diabetes mellitus. *Ther. Drug. Monit.*, New York, v. 9, n. 4, p. 389-91, 1987.
56. GEBER, C.; BAUMGÄRTNER, U.; SCHWAB, R.; MÜLLER, H.; STOEBER, P.; DIETERICH, M.; SOMMER, C.; BIRKLEIN, F.; TREDE, R. D. Revised definition of neuropathic pain and its grading system: an open case series illustrating its use in clinical practice. *Am. J. Med.*, New York, v. 122, n. 10, p. S3-12, 2009.
57. GENGO, F. M.; ZIEMNIAK, M. A.; KINKEL, W. R.; MCHUGH, W. B. High-performance liquid chromatographic determination of metoprolol and alpha-hydroxymetoprolol concentrations in human serum, urine, and cerebrospinal fluid. *J. Pharm. Sci.*, Easton, v. 73, n. 7, p. 961-963, 1984.
58. GILLEN, C.; HAURAND, M.; KOBELT, D. J.; WNENDT, S. Affinity, potency and efficacy of tramadol and its metabolites at the cloned human mu-opioid receptor. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, Berlin, v. 362, n. 2, p. 116-121, 2000.
59. GODBILLON, J.; DUVAL, M. Determination of two metoprolol metabolites in human urine by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v. 309, n. 1, p. 198-202, 1984.
60. GODOY, A. L. P. C. Influência do diabetes experimental na disposição cinética e no metabolismo estereosseletivos do *trans*-tramadol em ratos. 2009. 116 f. Tese (Doutorado em Toxicologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.
61. GODOY, A. L.; DE MORAES, N. V.; MARTINEZ, E. Z.; CARVALHO, T. M.; MARQUES, M. P.; LANCHOTE, V. L. Simultaneous analysis of tramadol, O-desmethyltramadol, and N-desmethyltramadol enantiomers in rat plasma by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: application to pharmacokinetics. *Chirality*, New York, v. 23, n. 4, p. 287-293, 2011.
62. GROND, S.; MEUSER, T.; ZECH, D.; HENNIG, U.; LEHMANN, K. A. Analgesic efficacy and safety of tramadol enantiomers in comparison with the racemate: a randomized, double-blind study with gynaecological patients using intravenous patient-controlled analgesia. *Pain*, Amsterdam, v. 62, n. 3, p. 313-320, 1995.
63. GROND, S.; SABLOTZKI, A. Clinical pharmacology of tramadol. *Clin. Pharmacokinet.*, New York, v. 43, n. 13, p. 879-923, 2004.

64. HANNON-FLETCHER, M. P.; O'KANE M. J.; MOLES K. W.; BARNETT Y. A.; BARNETT C. R. Lymphocyte cytochrome P450-CYP2E1 expression in human IDDM subjects. *Food Chem. Toxicol.*, Oxford, v. 39, n. 2, p. 125-132, 2001.
65. HARATI, Y.; GOOCH, C.; SWENSON, M.; EDELMAN, S.; GREENE, D.; RASKIN, P.; DONOFRIO, P.; CORNBLATH, D.; SACHDEO, R.; SIU, C. O.; KAMIN, M. Double-blind randomized trial of tramadol for the treatment of the pain of diabetic neuropathy. *Neurology*, Minneapolis, v. 50, n. 6, p. 1842-46, 1998.
66. HARATI, Y.; GOOCH, C.; SWENSON, M.; EDELMAN, S.V.; GREENE, D.; RASKIN, P.; DONOFRIO, P.; CORNBLATH, D.; OLSON, W. H.; KAMIN, M. Maintenance of long-term effectiveness of tramadol in treatment of the pain of diabetic neuropathy. *J. Diabetes Complications*, New York, v. 14, n. 2, p. 65-70, 2000.
67. HAWKINS, B. T.; OCHELTREE, S. M.; NORWOOD, K. M.; EGLETON, R. D. Decreased blood-brain barrier permeability to fluorescein in streptozotocin-treated rats. *Neurosci. Lett.*, Amsterdam, v. 411, n. 1, p. 1-5, 2007.
68. HENNIES, H. H.; FRIDERICHHS, E.; SCHNEIDER, J. Receptor binding, analgesic and antitussive potency of tramadol and other selected opioids. *Arzneimittelforschung*, Aulendorf, v. 38, n. 7, p. 877-880, 1988.
69. HOFMANN, M. H.; BLIEVERNICHT, J. K.; KLEIN, K.; SAUSSELE, T.; SCHAEFFELER, E.; SCHWAB, M.; ZANGER, U. M. Aberrant splicing caused by single nucleotide polymorphism c.516G>T [Q172H], a marker of CYP2B6*6, is responsible for decreased expression and activity of CYP2B6 in liver. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Baltimore, v. 325, n. 1, p. 284-292, 2008.
70. HOLLENBACH, E.; SCHULZ, C.; LEHNERT, H. Rapid and sensitive determination of catecholamines and the metabolite 3-methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol using HPLC following novel extraction procedures. *Life Sci.*, Oxford, v. 63, n. 9, p. 737-750, 1998.
71. HORAI, Y.; NAKANO, M.; ISHIZAKI, T.; ISHIKAWA, K.; ZHOU, H. H.; ZHOU, B. I.; LIAO, C. L.; ZHANG, L. M. Metoprolol and mephenytoin oxidation polymorphisms in Far Eastern Oriental subjects: Japanese versus mainland Chinese. *Clin. Pharmacol. Ther.*, St. Louis, v. 46, n. 2, p. 198-207, 1989.
72. HOROWITZ, M.; WISHART, J. M.; JONES, K. L.; HEBBARD, G. S. Gastric emptying in diabetes: an overview. *Diabet. Med.*, Chichester, v. 13, n. 9, p. S16-22, 1996.
73. IBER, R.; LI-MASTERS, T.; CHEN, Q.; YU, S.; MORGAN, E. T. Regulation of hepatic cytochrome P450 2C11 via cAMP: implications for down-regulation in diabetes, fasting and inflammation. *J. Phamacol. Exp. Ther.*, Baltimore, v. 297, n. 1, p. 174-180, 2001.
74. IIDA, M.; IKEDA, M.; KISHIMOTO, M.; TSUJINO, T.; KANETO, H.; MATSUHISA, M.; KAJIMOTO, Y.; WATARAI, T.; YAMASAKI, Y.; HORI, M.

- Evaluation of gut motility in type II diabetes by the radiopaque marker method. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, Melbourne, v. 15, n. 4, p. 381-385, 2000.
75. ISMAIL, R.; TEH, L. K. The relevance of CYP2D6 genetic polymorphism on chronic metoprolol therapy in cardiovascular patients. *J. Clin. Pharm. Ther.*, Oxford, v. 31, n. 1, p. 99-109, 2006.
76. JABOR, V. A. P.; COELHO, E. B.; DOS SANTOS, N. A.; BONATO, P. S.; LANCHOTE, V. L. A highly sensitive LC-MS-MS assay for analysis of midazolam and its major metabolite in human plasma: applications to drug metabolism. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, Amsterdam, v. 822, n. 1-2, p. 27-32, 2005.
77. JACOB, R. M.; JOHNSTONE, E. C.; NEVILLE, M. J.; WALTON, R. T. Identification of CYP2B6 sequence variants by use of multiplex PCR with allele-specific genotyping. *Clin. Chem.*, Baltimore, v. 50, n. 8, p. 1372-1377, 2004.
78. JAMALI, F.; AGHAZADEH-HABASHI, A. Rapidly dissolving formulations for quick absorption during pain episodes: ibuprofen. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, Munchen, v. 46, n. 2, p. 55-63, 2008.
79. JAMALI, F.; KUNZ-DOBER, C. M. Pain-mediated altered absorption and metabolism of ibuprofen: an explanation for decreased serum enantiomer concentration after dental surgery. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, London, v. 47, n. 4, p. 391-396, 1999.
80. JAMES, M. F.; HEIJKE, S. A.; GORDON, P. C. Intravenous tramadol versus epidural morphine for postthoracotomy pain relief: a placebo-controlled double-blind trial. *Anesth. Analg.*, Cleveland, v. 83, n. 1, p. 87-91, 1996.
81. JINNO, H.; TANAKA-KAGAWA, T.; OHNO, A.; MAKINO, Y.; MATSUSHIMA, E.; HANIOKA, N.; ANDO, M. Functional characterization of cytochrome P450 2B6 allelic variants. *Drug Metab. Dispos.*, Bethesda, v. 31, n. 4, p. 398-403, 2003.
82. KANAAN, M.; DAALI, Y.; DAYER, P.; DESMEULES, J. Uptake/efflux transport of tramadol enantiomers and O-desmethyl-tramadol: focus on P-glycoprotein. *Basic Clinic. Pharmacol. Toxicol.*, Copenhagen, v. 105; n. 3, p. 199-206, 2009.
83. KAWAHITO, S.; KITAHATA, H.; OSHITA, S. Problems associated with glucose toxicity: role of hyperglycemia-induced oxidative stress. *World J. Gastroenterol.*, Beijing, v. 15, n. 33, p. 4137-4142, 2009.
84. KIRCHHEINER, J.; KEULEN, J. T. H. A.; BAUER, S.; ROOTS, I.; BROCKMÖLLER, J. Effects of the CYP2D6 gene duplication on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of tramadol. *J. Clin. Psychopharmacol.*, Baltimore, v. 28, n. 1, p. 78-83, 2008.
85. KLEIN, K.; LANG, T.; SAUSSELE, T.; BARBOSA-SICARD, E.; SCHUNCK, W. H.; EICHELBAUM, M.; SCHWAB, M.; ZANGER, U. M. Genetic variability of CYP2B6 in populations of African and Asian origin: allele frequencies, novel functional variants, and possible implications for anti-HIV therapy with efavirenz. *Pharmacogenet. Genomics*, Hagerstown, v. 15, n. 12, p. 861-873, 2005.

86. KOYAMA, H.; SUGIOKA, N.; UNO, A.; MORI, S.; NAKAJIMA, K. Effect of glycosylation on carbamazepin-serum protein binding in humans. *J. Clin. Pharmacol.*, Stamford, v. 37, n. 11, p. 1048-1055, 1997.
87. KULMATYCKI, K. M.; JAMALI, F. Drug disease interactions: role of inflammatory mediators in pain and variability in analgesic drug response. *J. Pharm. Pharm. Sci.*, Edmonton, v. 10, n. 4, p. 554-566, 2007.
88. LALANI, E. N.; BURCHELL, B. Stimulation of defective Gunn-rat liver uridine diphosphate glucuronyltransferase activity in vitro by alkyl ketones. *Biochem. J.*, London, v. 177, n. 3, p. 993-995, 1979.
89. LALANI, E. N.; WEATHERILL, P. J.; KENNEDY, S. M.; BURCHELL, B. The inherited deficiency of hepatic UDP-glucuronosyltransferase: structure-activity relationships of in vitro stimulators. *Biochem. Pharmacol.*, Oxford, v. 29, n. 17, p. 2367-2371, 1980.
90. LAMBA, J. K.; LIN, Y. S.; SCHUETZ, E. G.; THUMMEL, K. E. Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, Amsterdam, v. 54, n. 10, p. 1271-1294, 2002.
91. LANG, T.; KLEIN, K.; FISCHER, J.; NÜSSLER, A. K.; NEUHAUS, P.; HOFMANN, U.; EICHELBAUM, M.; SCHWAB, M.; ZANGER, U. M. Extensive genetic polymorphism in the human CYP2B6 gene with impact on expression and function in human liver. *Pharmacogenetics*, London, v. 11, n. 5, p. 399-415, 2001.
92. LANIER R. K.; LOFWALL, M. R.; MINTZER, M. Z.; BIGELOW, G. E.; STRAIN, E. C. Physical dependence potential of daily tramadol dosing in humans. *Psychopharmacology (Berl.)*, Berlin, v. 211, n. 4, p. 457-466, 2010.
93. LAUGESEN, S.; ENGGAARD, T. P.; PEDERSEN, R. S.; SINDRUP, S. H.; BRØSEN, K. Paroxetine, a cytochrome P450 2D6 inhibitor, diminishes the stereoselective O-demethylation and reduces the hypoalgesic effect of tramadol. *Clin. Pharmacol. Ther.*, St. Louis, v. 77, n. 4, p. 312-323, 2005.
94. LEE, C. R.; MCTAVISH, D.; SORKIN, E.M. Tramadol. A preliminary review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic in acute and chronic pain states. *Drugs*, New York, v. 46, n. 2, p. 313-340, 1993.
95. LEHMANN, K. A.; KRATZENBERG, U.; SCHROEDER-BARK, B.; HORRICHSH-AERMEYER, G. Postoperative patient-controlled analgesia with tramadol: analgesic efficacy and minimum effective concentrations. *Clin. J. Pain*, Hagerstown, v. 6, n. 3, p. 212-220, 1990.
96. LEHTONEN, P.; STEN, T.; AITIO, O.; KURKELA, M.; VUORENSOLA, K.; FINEL, M.; KOSTIAINEN, R. Glucuronidation of racemic O-desmethyltramadol, the active metabolite of tramadol. *Eur. J. Pharm. Sci.*, Amsterdam, v. 41, n. 3-4, p. 523-530, 2010.
97. LENNARD, M. S. Quantitative analysis of metoprolol and three of its metabolites in urine and liver microsomes by high-performance liquid chromatography. *J*

- Chromatogr*, Amsterdam, v. 342, n. 1, p. 199-205, 1985.
98. LEVO, A.; KOSKI, A.; OJANPERÄ, I.; VUORI, E.; SAJANTILA, A. Post-mortem SNP analysis of CYP2D6 gene reveals correlation between genotype and opioid drug (tramadol) metabolite ratios in blood. *Forensic Sci. Int.*, Lausanne, v. 135, n. 1, p. 9-15, 2003.
99. LI, Q.; WANG, R. Simultaneous analysis of tramadol, metoprolol and their metabolites in human plasma and urine by high performance liquid chromatography. *Chin. Med. J. (Engl.)*, Beijing, v. 119, n. 23, p. 2013-2017, 2006.
100. LI, Q.; WANG, R.; GUO, Y.; WEN, S.; XU, L.; WANG, S. Relationship of CYP2D6 genetic polymorphisms and the pharmacokinetics of tramadol in Chinese volunteers. *J. Clin. Pharm. Ther.*, Oxford, v. 35, n. 2, p. 239-247, 2010.
101. LIN, Y. S.; LOCKWOOD, G. F; GRAHAM, M. A.; BRIAN, W. R.; LOI, C. M.; DOBRINSKA, M. R.; SHEN, D. D.; WATKINS, P. B.; WILKINSON, G. R.; KHARASCH, E. D.; THUMMEL, K. E. In-vivo phenotyping for CYP3A by a single-point determination of midazolam plasma concentrations. *Pharmacogenetics*, London, v. 11, n. 9, p. 781-791, 2001.
102. LINTZ, W.; BARTH H.; OSTERLOH, G.; SCHIMIDT-BÖTHELT, E. Bioavailability of enteral tramadol formulations. 1st communication: capsules. *Arzneimittelforschung*, Aulendorf, v. 36, n. 8, p. 1278-83, 1986.
103. LINTZ, W.; BARTH, H.; BECKER, R.; FRANKUS, E.; SCHIMIDT-BÖTHELT, E. Pharmacokinetics of tramadol and bioavailability of enteral tramadol formulations. 2nd communication: drops with ethanol. *Arzneimittelforschung*, Aulendorf, v. 48, n. 5, p. 436-45, 1998.
104. LINTZ, W.; ERLACIN, S.; FRANKUS, E.; URAGG, H. Biotransformation of tramadol in man and animal. *Arzneimittelforschung*, Aulendorf, v. 31, n. 11, p. 1932-1943, 1981.
105. LIPP, R. W.; SCHNEDL, J.; HAMMER, H. F.; KOTANKO, P.; LEB, G.; KREJS, G. J. Evidence of accelerated gastric emptying in longstanding diabetic patients after ingestion of a semisolid meal. *J. Nucl. Med.*, Chicago, v. 38, n. 5, p. 814-818, 1997.
106. LIU, H. C.; LIU, T. J.; YANG, Y. Y.; HOU, Y. N. Pharmacokinetics of enantiomers of *trans*-tramadol and its active metabolite, *trans*-O-demethyltramadol, in human subjects. *Acta Pharmacol. Sin.*, Beijing, v. 22, n. 1; p. 91-96, 2001a.
107. LIU, H. C.; WANG, N.; LIU, C. S.; HU, Y. Q.; LIU, J. F.; HOU, Y. N. Distribution of enantiomers of *trans*-tramadol and *trans*-O-demethyltramadol in central nervous system of rats. *Acta Pharmacol. Sin.*, Beijing, v. 22, n. 10, p. 871-875, 2001b.
108. LIU, H. C.; HU, Y. Q.; LIU, J. F.; WANG, N.; HOU, Y. N. Transportation of the enantiomers of trans tramadol and O-demethyltramadol across blood-brain

- barrier. *Yao Xue Xue Bao*, Beijing, v. 36, n. 9, p. 644-647, 2001c.
109. LIU, H. C.; WANG, N.; YU, Y.; HOU, Y. N. Stereoselectivity in *trans*-tramadol metabolism and *trans*-O-demethyltramadol formation in rat liver microsomes. *Acta Pharmacol. Sin.*, Beijing, v. 24, n. 1, p. 85-90, 2003.
110. MARQUES, M. P.; COELHO, E. B.; DOS SANTOS, N. A.; GELEILETE, T. J.; LANCHOTE, V. L. Dynamic and kinetic disposition of nisoldipine enantiomers in hypertensive patients presenting with type-2 diabetes *mellitus*. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, Berlin, v. 58, n. 9, p. 607-614, 2002.
111. MATZKE, G. R.; FRYE, R. F.; EARLY, J. J.; STRAKA, R. J.; CARSON, S. W. Evaluation of the influence of diabetes *mellitus* on antipyrine metabolism and CYP1A2 and CYP2D6 activity. *Pharmacotherapy*, Carlisle, v. 20, n. 2, p. 182-190, 2000.
112. MCGOURTY, J. C.; SILAS, J. H.; LENNARD, M. S.; TUCKER, G. T.; WOODS, H. F. Metoprolol metabolism and debrisoquine oxidation polymorphism-population and family studies. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, London, v. 20, n. 6, p. 555-566, 1985.
113. MEHVAR, R.; ELLIOTT, K.; PARASRAMPURIA, R.; ERADIRI, O. Stereospecific high-performance liquid chromatographic analysis of tramadol and its O-demethylated (M1) and N,O-demethylated (M5) metabolites in human plasma. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, Amsterdam, v. 852, n. 1-2, p. 152-159, 2007.
114. MILDH, L. H.; LEINO, K. A.; KIRVELÄ, O. A. Effects of tramadol and meperidine on respiration, plasma catecholamine concentrations, and hemodynamics. *J. Clin. Anesth.*, Stoneham, v. 11, n. 4, p. 310-316, 1999.
115. MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.*, London, v. 16, n. 3, p. 1215, 1988.
116. MILLIPORE CORPORATION. Assay of free anticonvulsant drugs, Application note, AN1002EN00. Disponível em: www.millipore.com/publications (Acesso em 15/fev/2011).
117. MILLIPORE CORPORATION. Centrifree® Ultrafiltration Devices, User guide. Disponível em: www.millipore.com/techlibrary (acesso em 10/dez/2010).
118. MONCRIEFF, J.; SIMPSON, D. Determination of metoprolol and its alpha-hydroxy metabolite in urine by direct-injection reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v. 488, n. 2, p. 498-502, 1989.
119. MOXEY, P. W.; GOGALNICEANU, P.; HINCHLIFFE, R. J.; LOFTUS, I. M.; JONES, K. J.; THOMPSON, M. M.; HOLT, P. J. Lower extremity amputations-a review of global variability in incidence. *Diabet. Med.*, Chichester, v. 28, n. 10, p. 1144-1153, 2011.

120. MÜLLER-OERLINGHAUSEN, B.; HASSELBLATT, A.; JAHNS, R. Impaired hepatic synthesis of glucuronic acid conjugates in diabetic rats. *Life Sci.*, Oxford, v. 6, n. 14, p. 1529-1533, 1967.
121. MUSSHOF, F.; MADEA, B.; STUBER, F.; STAMER, U.M. Enantiomeric determination of tramadol and O-desmethyltramadol by liquid chromatography-mass spectrometry and application to postoperative patients receiving tramadol. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v. 30, n. 7, p. 463-467, 2006.
122. NATIONAL KIDNEY FOUNDATION. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am. J. Kidney Dis.*, New York, v. 39, p. S1-266, 2002.
123. NEGRE-SALVAYRE, A.; SALVAYRE, R.; AUGÉ, N.; PAMPLONA, R.; PORTERO-OTÍN, M. Hyperglycemia and glycation in diabetic complications. *Antioxid. Redox Signal.*, Larchmont, v. 11, n. 12, p. 3071-3109, 2009.
124. NOWICKI, M. T.; ALEKSUNES, L. M.; SAWANT, S. P.; DNYANMOTÉ, A. V.; MEHENDALE, H. M.; MANAUTOU, J. E. Renal and hepatic transporter expression in type 2 diabetic rats. *Drug Metab. Lett.*, Saif Zone, v. 2, n. 1, p. 11-17, 2008.
125. O'CONNOR, A. B.; DWORKIN, R. H. Treatment of neuropathic pain: an overview of recent guidelines. *Am. J. Med.*, New York, v. 122, n. 10, p. S22-32, 2009.
126. OVERBECK, P.; BLASCHKE, G. Direct determination of tramadol glucuronides in human urine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, Amsterdam, v. 732, n. 1, p. 185-192, 1999.
127. PARASRAMPURIA, R.; VUPPUGALLA, R.; ELLIOT, K.; MEHVAR, R. Route-dependent stereoselective pharmacokinetics of tramadol and its active O-demethylated metabolite in rats. *Chirality*, New York, v. 19, n. 3, p. 190-6, 2007.
128. PATEL, B. N.; SHARMA, N.; SANYAL, M.; SHRIVASTAV, P. S. An accurate, rapid and sensitive determination of tramadol and its active metabolite O-desmethyltramadol in human plasma by LC-MS/MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, Oxford, v. 49, n. 2, p. 354-366, 2009.
129. PEDERSEN, R. S.; DAMKIER, P.; BRØSEN, K. Enantioselective pharmacokinetics of tramadol in CYP2D6 extensive and poor metabolizers. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, Berlin, v. 62, n. 7, p. 513-521, 2006.
130. PEDERSEN, R. S.; DAMKIER, P.; BROSEN, K. Tramadol as a new probe for cytochrome P450 2D6 phenotyping: a population study. *Clin. Pharmacol. Ther.*, St. Louis, v. 77, n. 6, p. 458-467, 2005.
131. PIRART, J. Diabetes *mellitus* and its degenerative complications: a prospective study of 4400 patients observed between 1947 and 1973 (third and last part). *Diabetes Metab.*, Paris, v. 3, n. 4, p. 245-56, 1977.

132. POGGI, J. C.; BARISSA, G. R.; DONADI, E. A.; FOSS, M. C.; CUNHA, F. Q.; LANCHOTE, V. L.; DOS REIS, M. L. Pharmacodynamics, chiral pharmacokinetics, and pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of fenoprofen in patients with diabetes mellitus. *J. Clin. Pharmacol.*, Stamford, v. 46, n. 11, p. 1328-1336, 2006.
133. POULSEN, L.; ARENDT-NIELSEN, L.; BRØSEN, K.; SINDRUP, S. H. The hypoalgesic effect of tramadol in relation to CYP2D6. *Clin. Pharmacol. Ther.*, St. Louis, v. 60, n. 6, p. 636-644, 1996.
134. PRANGER, A. D.; ALFFENAAR, J. W.; WESSELS, A. M.; GREIJDANUS, B.; UGES, D. R. Determination of moxifloxacin in human plasma, plasma ultrafiltrate, and cerebrospinal fluid by a rapid and simple liquid chromatography-tandem mass spectrometry method. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v. 34, n. 3, p. 135-141, 2010.
135. PRESTON, R. A.; CHUNG, M.; GAFFNEY, M.; ALONSO, A.; BALTOPDANO, N. M.; EPSTEIN, M. Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of amlodipine in hypertensive patients with and without type II diabetes *mellitus*. *J. Clin. Pharmacol.*, Stamford, v. 41, n. 11, p. 1215-1224, 2001.
136. PRESTON, R. A.; EPSTEIN, M. Effects of diabetes on cardiovascular drug metabolism. Emerging clinical implications. *Diabetes Care*, New York, v. 22, n. 6, p. 982-988, 1999.
137. RAFFA, R. B.; FRIDERICH, E.; REIMANN, W.; SHANK, R. P.; CODD, E. E.; VAUGHT, J. L. Opioid and nonopioid components independently contribute to the mechanism of action of tramadol, an 'atypical' opioid. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Baltimore, v. 260, n. 1, p. 275-285, 1992.
138. RAFFA, R. B.; FRIDERICH, E.; REIMANN, W.; SHANK, R. P.; CODD, E. E.; VAUGHT, J. L.; JACOBY, H. I.; SELVE, N. Complementary and synergistic antinociceptive interaction between the enantiomers of tramadol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Baltimore, v. 267, n. 1, p. 331-340, 1993.
139. ROCHA, A.; COELHO, E. B.; LANCHOTE, V. L. Stereospecific disposition of fluvastatin in streptozotocin-induced diabetic rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, Ottawa, v. 80, n. 11, p. 1071-1075, 2002.
140. ROSE, M. A.; KAM, P. C. Gabapentin: pharmacology and its use in pain management. *Anaesthesia*, London, v. 57, n. 5, p. 451-462, 2002.
141. RUDAZ, S.; LE SAUX, T.; PRAT, J.; GAREIL, P.; VEUTHEY, J. L. Ultrashort partial-filling technique in capillary electrophoresis for infinite resolution of tramadol enantiomers and its metabolites with highly sulfated cyclodextrins. *Electrophoresis*, Weinheim, v. 25, n. 16, p. 2761-2771, 2004.
142. RUDAZ, S.; VEUTHEY, J. L.; DESIDERIO, C.; FANALI, S. Simultaneous stereoselective analysis by capillary electrophoresis of tramadol enantiomers and their main phase I metabolites in urine. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v. 846, n. 1-2, p. 227-237, 1999.

143. RUDAZ, S.; VEUTHEY, J. L.; DESIDERIO, C.; FANALI, S. Use of cyclodextrins in capillary electrophoresis: resolution of tramadol enantiomers. *Electrophoresis*, Weinheim, v. 19, n. 16-17, p. 2883-2889, 1998.
144. RUIZ-CABELLO, F.; ERILL, S. Abnormal serum protein binding of acidic drugs in diabetes mellitus. *Clin. Pharmacol. Ther.*, St. Louis, v. 36, n. 5, p. 691-695, 1984.
145. SAITO, A.; SARLES, E.; CAPPARELLI, E.; AWEEKA, F.; KOVACS, A.; BURCHETT, S. K.; WIZNIA, A.; NACHMAN, S.; FENTON, T.; SPECTOR, S. A. CYP2B6 genetic variants are associated with nevirapine pharmacokinetics and clinical response in HIV-1-infected children. *AIDS*, London, v. 21, n. 16, p. 2191-2199, 2007.
146. SCHELLENS, J. H.; VAN DER WART, J. H.; DANHOF, M.; VAN DER VELDE, E. A.; BREIMER, D. D. Relationship between the metabolism of antipyirine, hexobarbitone and theophylline in man as assessed by a 'cocktail' approach. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, London, v. 26, n. 4, p. 373-384, 1988.
147. SCHENCK, E. G.; AREND, I. The effect of tramadol in an open clinical trial (author's transl). *Arzneimittelforschung*, Aulendorf, v. 28, n. 1a, p. 209-212, 1978.
148. SCHENKMAN, J. B. Induction of diabetes and evaluation of diabetic state on P450 expression. *Methods Enzymol.*, New York, v. 206, p. 325-331, 1991.
149. SCHWARTZ, J. G.; GREEN, G. M.; GUAN, D.; MCMAHAN, C. A.; PHILLIPS, W. T. Rapid gastric emptying of a solid pancake meal in type II diabetic patient. *Diabetes Care*, New York, v. 19, n. 5, p. 468-471, 1996.
150. SILVA, F. G. Influência do diabetes *mellitus* e da insuficiência renal crônica em tratamento dialítico na farmacocinética e farmacodinâmica do carvedilol em pacientes hipertensos. 2008. 145 f. Tese (Doutorado em Toxicologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.
151. SMITH, D. A.; DI, L.; KERNS, E. H. The effect of plasma protein binding on in vivo efficacy: misconceptions in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.*, London, v. 9, n. 12, p. 929-939, 2010.
152. SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. *Atualização Brasileira sobre Diabetes*. Rio de Janeiro: Diagraphic, 2006, 140p.
153. SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. *Consenso Brasileiro sobre Diabetes, Diagnóstico e classificação do diabetes melito e tratamento do diabetes melito tipo 2*. Rio de Janeiro: SBD, 2002. 73p.
154. SOETEBEER, U. B.; SCHIERENBERG, M. O.; SCHULZ, H.; ANDRESEN, P.; BLASCHKE, G. Direct chiral assay of tramadol and detection of the phase II metabolite O-demethyl tramadol glucuronide in human urine using capillary electrophoresis with laser-induced native fluorescence detection. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, Amsterdam, v. 765, n. 1, p. 3-13, 2001.

155. SOHN, D. R.; KUSAKA, M.; SHIN, S. G.; JANG, I. J.; CHIBA, K.; ISHIZAKI, T. Utility of a one-point (3-hours postdose) plasma metabolic ratio as a phenotyping test using metoprolol in two east asian populations. *Ther. Drug Monit.*, Hagerstown, v. 14, n. 3, p. 184-189, 1992.
156. SOHN, D. R.; SHIN, S. G.; PARK, C. W.; KUSAKA, M.; CHIBA, K.; ISHIZAKI, T. Metoprolol oxidation polymorphism in a Korean population: comparison with native Japanese and Chinese populations. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, London, v. 32, n. 4, p. 504-507, 1991.
157. STAMER, U. M.; MUSSHOFF, F.; KOBILAY, M.; MADEA, B.; HOEFT, A.; STUBER, F. Concentrations of tramadol and O-desmethyltramadol enantiomers in different CYP2D6 genotypes. *Clin. Pharmacol. Ther.*, St. Louis, v. 82, n. 1, p. 41-47, 2007.
158. STREETMAN, D. S.; BERTINO, J. S. Jr.; NAFZIGER, A. N. Phenotyping of drug metabolizing enzymes in adults: a review of in-vivo cytochrome P450 phenotyping probes. *Pharmacogenetics*, London, v. 10, n. 3, p. 187-216, 2000.
159. SUBRAHMANYAM, V.; RENWICK, A. B.; WALTERS, D. G.; YOUNG, P. J.; PRICE, R. J.; TONELLI, A. P.; LAKE, B. G. Identification of cytochrome P-450 isoforms responsible for cis-tramadol metabolism in human liver microsomes. *Drug Metab. Dispos.*, Bethesda, v. 29, n. 8, p. 1146-1155, 2001.
160. SWEETMAN, S. C.; BLAKE, P. S.; McGLASHAN, J. M.; PARSONS, A. V. *Martindale, The complete drug reference*, London, Pharmaceutical Press, 33 ed., p.932-2, 2002.
161. TAO, Q.; STONE, D. J.; BORENSTEIN, M. R.; CODD, E. E.; COOGAN, T. P.; DESAI-KRIEGER, D.; LIAO, S.; RAFFA, R. B. Differential tramadol and O-desmethyl metabolite levels in brain vs. plasma of mice and rats administered tramadol hydrochloride orally. *J. Clin. Pharm. Ther.*, Oxford, v. 27, n. 2, p. 99-106, 2002.
162. TREEDE, R. D.; JENSEN, T. S.; CAMPBELL, J. N.; CRUCCU, G.; DOSTROVSKY, J. O.; GRIFFIN, J. W.; HANSSON, P.; HUGHES, R.; NURMIKKO, T.; SERRA, J. Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes. *Neurology*, Minneapolis, v. 70, n. 18, p. 1630-1635, 2008.
163. TSIGOS, C.; REED, P.; WEINKOVE, C.; WHITE, A.; YOUNG, R. J. Plasma norepinephrine in sensory diabetic polyneuropathy. *Diabetes Care*, New York, v. 16, n. 5, p. 722-777, 1993.
164. TSUCHIYA, K.; GATANAGA, H.; TACHIKAWA, N.; TERUYA, K.; KIKUCHI, Y.; YOSHINO, M.; KUWAHARA, T.; SHIRASAKA, T.; KIMURA, S.; OKA, S. Homozygous CYP2B6*6 (Q172H and K262R) correlates with high plasma efavirenz concentrations in HIV-1 patients treated with standard efavirenz-containing regimens. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, New York, v. 319, n. 4, p. 1322-1326, 2004.

165. TUCKER, G. T.; SILAS, J. H.; IYUN, A. O.; LENNARD, M. S.; SMITH, A. J. Polymorphic hydroxylation of debrisoquine. *Lancet*, London, v. 310, n. 8040, p. 718, 1977.
166. VALLE, M.; GARRIDO, M. J.; PAVÓN, J. M.; CALVO, R.; TROCÓNIZ, I. F. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of the antinociceptive effects of main active metabolites of tramadol, (+)-O-desmethyltramadol and (-)-O-desmethyltramadol, in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Baltimore, v. 293, n. 2, p. 646-653, 2000.
167. VAN DIEREN, S.; BEULENS, J. W.; VAN DER SCHOUW, Y. T.; GROBBEE, D. E.; NEAL, B. The global burden of diabetes and its complications: an emerging pandemic. *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil.*, London, v. 17, n. 1, p. S3-8, 2010.
168. VEGA, P.; GAULE, C.; MACILLA, J.; DEL VILLAR, E. Comparison of alloxan and streptozotocin induced diabetes in rats: differential effects on microsomal drug metabolism. *Gen. Pharmacol.*, Oxford, v. 24, n. 2, p. 489-495, 1993.
169. VEGA, P.; GAULE, C.; SANCHEZ, E.; DEL VILLAR, E. Inhibition and activation of UDP-glucuronyltransferase in alloxanic-diabetic rats. *Gen. Pharmacol.*, Oxford, v. 17, n. 6, p. 641-645, 1986.
170. WIEBALCK, A.; ZENZ, M.; TRYBA, M.; KINDLER, D.; DONNER, B.; CZEKALLA, U. Are tramadol enantiomers for postoperative pain therapy better suited than the racemate? A randomized, placebo- and morphine-controlled double blind study. *Anaesthesia*, Berlin, v. 47, n. 5, p. 387-394, 1998.
171. WILD, S.; ROGLIC, G.; GREEN, A.; SICREE, R.; KING H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*, New York, v. 27, n. 5, p. 1047-1053, 2004.
172. WILLIAMSON, A.; HOGGART, B. Pain: a review of three commonly used pain rating scales. *J. Clin Nurs*, Oxford, v. 14, n. 7, p. 798-804, 2005.
173. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Cancer pain relief and palliative care: report of a WHO Expert Committee. *World Health Organ. Tech. Rep. Ser.*, Geneva, v. 804, p. 1-75, 1990.
174. XIE, H. J.; YASAR, U.; LUNDGREN, S.; GRISKEVICIUS, L.; TERELIUS, Y.; HASSAN, M.; RANE, A. Role of polymorphic human CYP2B6 in cyclophosphamide bioactivation. *Pharmacogenomics J.*, Avenet, v. 3, n. 1, p. 53-61, 2003.
175. XIE, H.; GRISKEVICIUS, L.; STAHLÉ, L.; HASSAN, Z.; YASAR, U.; RANE, A.; BROBERG, U.; KIMBY E.; HASSAN, M. Pharmacogenetics of cyclophosphamide in patients with hematological malignancies. *Eur. J. Pharm. Sci.*, Amsterdam, v. 27, n. 1, p. 54-61, 2005.
176. YAMAZOE, Y.; MURAYAMA, N.; SHIMADA, M.; YAMAUCHI, K.; KATO, R. Cytochrome P450 in livers of diabetic rats: regulation by growth hormone and insulin. *Arch. Biochem. Biophys.*, New York, v. 268, n. 2, p. 567-575, 1989.

177. ZANGER, U. M.; RAIMUNDO, S.; EICHELBAUM, M. Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, Berlin, v. 369, n. 1, p. 23-37, 2004.
178. ZENG, L.; NATH, C. E.; SHAW, P. J.; EARL, J. W.; MCLACHLAN, A. J. HPLC-UV assay for monitoring total and unbound mycophenolic acid concentration in children. *Biomed. Chromatogr.*, London, v. 23, n. 1, p. 92-100, 2009.