# 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.

Tramadol. 2. Farmacocinética. 3. Metabolismo. 4. Diabetes.
 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 Titulo 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:
Prof. Dr	
Instituição:	Assinatura:
Prof. Dr	
Instituição:	Assinatura:
Prof. Dr	
Instituição:	Assinatura:
Prof. Dr	
Instituição:	Assinatura:

# A minha **mãe Jane**,

por todo amor e confiança en todos os momentos da minha vida.

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

Ao **meu innão 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 vicecoordenador 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 Arumant de-tudich

### 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<sup>®</sup> 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 razões metabólicas plasmáticas e urinárias do metoprolol/αquanto às 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  $\mu$ 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<sup>®</sup> 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/ $\alpha$ -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 liquido-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 <sub>urina</sub> ) e a razão metabólica de concentrações plasmáticas log <sub>10</sub> metoprolol/α-hidroximetoprolol (MR <sub>plasma</sub> )	125
Figura 22.	<i>Clearance</i> 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)	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 <sub>urina</sub> ) 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 <sub>plasma</sub> ) log <sub>10</sub> 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 <sub>urina</sub> ) 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 <sub>plasma</sub> ) log <sub>10</sub> 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 <i>clearance</i> total aparente do midazolam e o <i>clearance</i> total aparente (Cl <sub>T</sub> /F) do (+)-tramadol ou do (-)-tramadol	133
Figura 28.	Gráficos e equações de regressão ortogonal e seus respectivos coeficientes de correlação r entre o <i>clearance</i> 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 <sub>max</sub> )	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 <sub>10</sub> metoprolol/α-hidroximetoprolol (MR <sub>plasma</sub> ) nos pacientes portadores de dor neuropática (n=30)	123
Tabela 22.	Investigação da atividade <i>in vivo</i> do CYP3A avaliado através do CI <sub>T</sub> /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.	<i>Clearances</i> 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 de 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 neuropatica 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	Breast cancer resistance protein (proteína relacionada à
	resistência do câncer de mama)
BHE	Barreira hematoencefálica
CV	Coeficiente de variação
CYP	Citocromo P450
DEA	Dietilamina
DM	Diabetes mellitus
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	lonização 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	Lag time
LIQ	Limite de quantificação
[M+H] <sup>+</sup>	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	Multiple reaction monitoring
Mrp2	Multidrug resistance protein 2
Mrp4	Multidrug resistance protein 4
MS/MS	Espectrômetro de massas sequencial
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo adenina nicotinamida reduzido
NPA	Naive pooled analysis
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	Restriction Fragment Lenght Polymorphism – Polimerase Chain
	Reaction (Reação da Cadeia pela Polimerase – PCR)
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Single nucleotide polymorphism, polimorfismo de base única
ToABR	Brometo de tetraoctilamônio
UGT	UDP-glicuronosiltransferase
UI	Unidade internacional
US FDA	US Food and Drug Administration
SPRQ	Soma ponderada dos resíduos quadrados

# LISTA DE SÍMBOLOS

$\lambda_{ex}$	Comprimento de onda excitatório
$\lambda_{em}$	Comprimento de onda de emissão
γ	Coeficiente de Hill
Ae	Quantidade excretada
AUC	Área sob a curva concentração plasmática <i>versus</i> tempo
Ce	Concentração no compartimento de efeito
CI creatinina	Clearance de creatinina
CI <sub>T</sub> /F	Clearance total aparente
C <sub>e</sub>	Concentração no sítio de efeito
C <sub>max</sub>	Concentração plasmática máxima
C <sub>u</sub>	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 <sub>max</sub>	Efeito máximo
Fu	Fração livre
k <sub>01</sub>	Constante da velocidade de absorção
<b>k</b> <sub>10</sub>	Constante da velocidade de eliminação
k <sub>12</sub>	Constante da velocidade de transferência do compartimento 1 para
	o 2
k <sub>21</sub>	Constante da velocidade de transferência do compartimento 2 para
	1
Ke0	Constante da velocidade de transferência do compartimento central
	para o compartimento de efeito
K <sub>el</sub>	Constante da velocidade de eliminação
Ki	Constante de afinidade
LT	Lag time
MR	Razão metabólica

MR urinaRazão metabólica na urinat½Meia-vidat½aMeia-vida de absorçãot½fMeia-vida de formaçãot½αMeia-vida de distribuiçãot½βMeia-vida de eliminação
t <sub>½</sub> Meia-vidat <sub>½</sub> aMeia-vida de absorçãot½fMeia-vida de formaçãot½αMeia-vida de distribuiçãot½βMeia-vida de eliminação
t½aMeia-vida de absorçãot½fMeia-vida de formaçãot½αMeia-vida de distribuiçãot½βMeia-vida de eliminação
t½fMeia-vida de formaçãot½αMeia-vida de distribuiçãot½βMeia-vida de eliminação
t½αMeia-vida de distribuiçãot½βMeia-vida de eliminação
t <sub>½</sub> β Meia-vida de eliminação
t <sub>max</sub> Tempo para alcançar a concentração máxima
V1_F Volume de distribuição aparente do compartimento 1
Vd/F Volume de distribuição aparente
V <sub>u</sub> Volume de urina

# SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	25
Capítulo 1	28
<ol> <li>Introdução</li> <li>Objetivos</li></ol>	30 33 34 34 34 34
<ul> <li>3.1.3 Protocolo clínico</li></ul>	37 37 37 38 39
M1 e M2. 3.2.5 Determinação do efeito matriz. 3.2.6 Teste de racemização. 3.2.7 Validação. 3.2.7 Validação. 3.2.7.1 Curva de calibração/linearidade. 3.2.7.2 Limite inferior de quantificação. 3.2.7.3 Recuperação. 3.2.7.4 Precisão e exatidão. 3.2.7.5 Estabilidade. 3.3 Análise farmacocinética. 3.4 Análise estatística.	42 43 43 43 44 44 45 46 47
<ul> <li>4. Resultados</li></ul>	48 48 48 50 50 50 55 58 59 66
Capítulo 2	66
<ol> <li>Introdução</li> <li>Objetivos</li> <li>Casuística e métodos</li> <li>Casuística</li> <li>1.1 Cálculo do tamanho amostral</li> </ol>	68 73 74 74 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 Influênca do DM tipo 1 e DM tipo 2 na fração livre dos enantiômeros	
do tramadol, M1 e M2	96
5. Discussão	98
Canítulo 3	104
	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 $\alpha$ -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 in vivo do CYP2D6 empregando metoprolol	
como marcador	118
3.5.2 Avaliação da atividade in vivo do CYP3A empregando midazolam	
como marcador	119
3.6 Análise estatística	119
4. Resultados	120
4.1 Analise do metoprolol e $\alpha$ -hidroximetoprolol em urina	120
4.2 Fenotipo tipo metoprolol	122
4.3 Atividade in vivo do CYP3A	126
4.4 Genotipo do CYP2B6	128
4.5 Correlação entre a atividade <i>in vivo</i> do CYP2D6, atividade <i>in vivo</i> do	
CYP3A4 e o genotipo do CYP2B6 e a farmacocinética dos enantiômeros	
	129
5. DISCUSSAO	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 Analise farmacocinetia-farmacodinamica (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 plasmáticasdo (+)-	
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
total ou livre com a atenuação da dor neuropática	156 158
CONCLUSÕES	163
	103
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 principamente 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 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  $\mu$ . O (+)-tramadol inibe a recaptação de serotonina e o (-)-tramadol inibe a recaptação de norepinefrina (GROND; SABLOTZKI, 2004). A afinidade do (+)-M1 pelo receptor opióde  $\mu$  é aproximadamente 300 vezes maior do que a observada

para o fármaco inalterado (HENNIES; FRIDERICHS; 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 opióide 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 sadios 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 (Fu) 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)

# 2. OBJETIVOS

- Desenvolver e validar método enantiosseletivo de análise do tramadol e seus metabólitos M1 e M2 livre e total em plasma humano empregando LC/MS-MS.
- Avaliar a disposição cinética, a fração livre e o metabolismo enantiosseletivos do tramadol em pacientes portadores de dor neuropática.

# 3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

# 3.1 Casuística

## 3.1.1 Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP), de acordo com o Processo n° 1775/2008 (ANEXO A). Os pacientes portadores de dor neuropática foram selecionados no Ambulatório de Dor do HCFMRP-USP. Após serem informados do estudo, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO C). Foi garantida a liberdade ao paciente de recusar sua participação ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma ou prejuízo ao seu cuidado e/ou tratamento. No caso de intercorrências, como o aparecimento de efeitos adversos foi garantido o afastamento do paciente do protocolo de pesquisa.

# 3.1.2 Critérios de inclusão de pacientes

Os pacientes portadores de dor neuropática foram admitidos na Unidade de Pesquisa Clínica do HCFMRP-USP para partipação do protocolo de pesquisa. Foram investigados 12 pacientes portadores de dor neuropática autoreportada acima de 4 na Escala de Estimativa Numérica de Dor (0-10) (WILLIAMSON; HOGGART, 2005; TREEDE et al., 2008; GEBER et al., 2009). As características dos pacientes incluídos no estudo estão apresentadas na Tabela 1. Os critérios de inclusão foram: pacientes voluntários adultos jovens (18-59 anos), de ambos os sexos e com fenótipo oxidativo tipo metoprolol de metabolizador extensivo (dados apresentados no Capítulo 3). Todos os pacientes apresentaram função hepática (avaliada pela determinação laboratorial de AST, ALT e albumina sérica) e função renal (avaliada pela uréia e creatinina séricas e *clearance* de creatinina) dentro dos limites da normalidade. O clearance de creatinina foi determinado pela equação de Cockcroft e Gault: *clearance* de creatinina (mg/min) = {[140 – idade (anos)] x massa corpórea (kg) x 0,85 se mulher}/72 x creatinina sérica (mg/dL). A alteração de função renal é definida pelo clearance de creatinina < 60 mL/min

conforme o *Kidney Disease Outcome Quality Initiave Advisory Board* (NATIONAL KIDNEY FOUNDATION, 2002).

Todos os pacientes incluídos na investigação foram mantidos durante o estudo na Unidade de Pesquisa Clínica no HCFMRP-USP. Os pacientes investigados apresentam idade de 31 a 59 anos (mediana: 44 anos) e IMC de 17,16 a 38,9 kg/m<sup>2</sup> (mediana: 26,0 kg/m<sup>2</sup>). O diagnóstico de dor crônica neuropática teve diferentes causas, entre elas: hérnia de disco lombar L4-L5 (n=7), hérnia de disco cervical C5-C7 (n=3) e síndrome do túnel do carpo (n=2). Todos os pacientes apresentaram ressonância magnética lombar ou cervical e/ou eletroneuromiografia comparativa entre membros superiores comprobatórios de hérnia de disco lombar ou cervical e síndrome do túnel do carpo, respectivamente. A dor neuropática foi classificada por todos os pacientes como sensações de "burning" e "parestesia". Não foram incluídos pacientes portadores de dor neuropática diabética. Foram excluídos pacientes com dor nociceptiva somática, visceral ou autonômica associadas no período da pesquisa. Todos os pacientes investigados foram fenotipados como metabolisadores extensivos do CYP2D6 empregando o metoprolol (100 mg) como fármaco marcador, com razões de concentrações urinárias metoprolol/a-hidroximetoprolol menores que 12,6 (dados apresentados no Capítulo 3; MCGOURTY et al., 1985)

Daciantas	Gânoro	Idade	IMC	Glicemia <sup>ª</sup>	Creatinina	Cl creatinina	Uréia	Albumina	AST	ALT	Fármacos	Dor Nauronática
691998		(anos)	(kg/m²)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mL/min/1,73m <sup>2</sup> )	(mg/dL)	(g/dL)	(n/L)	(n/L)	associados	
-	ц	31	38,90	62	0'0	153,13	19	4,2	26	21	1,2	Hernia de disco cervical C5-C7
2	Σ	41	17,16	86	0,8	77,86	35	4,8	24	14	ę	Hérnia de disco lombar L4-L5
с	Σ	48	23,71	97	0,9	116,14	20	4,6	19	15		Hérnia de disco lombar L4-L5
4	Σ	23	21,16	78	0,8	92,36	4	4,5	16	7		Hérnia de disco lombar L4-L5
5 L	Σ	51	30,16	88	0,9	110,08	19	4,2	22	18		Hérnia de disco lombar L4-L5
9	ц	47	21,19	63	0,7	89,40	23	4,2	28	27		Síndrome do túnel do carpo
7	ц	59	30,63	63	0,9	80,22	50	4,4	32	30		Síndrome do túnel do carpo
ω	Σ	47	28,32	95	0,8	124,48	23	4,5	37	39		Hérnia de disco lombar L4-L5
σ	Ŀ	35	29,74	83	0'0	109,50	27	4,2	17	12		Hérnia de disco lombar L4-L5
10	Σ	29	19,68	88	0,9	92,93	24	4,8	17	15		Hernia de disco cervical C5-C7
7	Ŀ	33	22,39	96	0,6	113,16	33	ъ	16	ω		Hernia de disco cervical C5-C7
12	ш	41	34,88	75	0,8	122,43	52	4,0	15	10		Hérnia de disco lombar L4-L5
IMC: fndice glicemia de albumina: 3	de massa jejum: 70 a 5 a 4,8 g/d	corpóre a 100mg/ L; AST: a	o; Cl crea dL; creatin até 38U/L;	tinina: <i>clears</i> iina: 0,7 a 1, <del>(</del> ALT: até 41	<i>ince</i> de creati 5 mg/dL; c <i>lear</i> U/L; Medicam	nina; AST: aspart ance de creatinina iento associados:	ato aminoti a:72-110 ml 1: levonorg	ransferase;	ALT: alani <sup>2</sup> para mull nilestradiol	na aminot heres; 94- ; 3: Capto	ransferase; <sup>a</sup> glicerr 140mL/min/1,73m <sup>2</sup> pril	iia de jejum; Valores de referência: para homens; uréia: 10 a 50 mg/dL;

Tabela 1 - Características dos pacientes portadores de dor neuropática (n=12)
#### 3.1.3 Protocolo Clínico

Os pacientes investigados permaneram na Enfermaria da Unidade de Pesquisa Clínica do HCFMRP-USP para as colheitas de sangue.

No dia da investigação propriamente dita, os pacientes foram tratados em jejum de 10 horas com dose única de 100 mg de tramadol racêmico, em forma de cápsula (Tramal<sup>®</sup>, Pfizer, Brasil), acompanhada de 200 mL de água. O café foi servido 2 horas após a administração do medicamento. As amostras de sangue foram obtidas em seringas com heparina (Liquemine 5000 UI, Roche), via cateter intravenoso, nos tempos 0; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2; 3; 4; 6; 8; 10; 12; 16 e 24 horas. Os plasmas foram separados por centrifugação à 5° C e armazenados a -70° C até a análise.

# 3.2 Análise enantiosseletiva do tramadol e dos metabólitos M1 e M2 livre e total em plasma humano empregando LC-MS/MS

#### 3.2.1 Soluções padrão e reagentes

O cloridrato de tramadol racêmico e o metabólito O-desmetiltramadol (M1) racêmico (96,9%) foram gentilmente cedidos pela Janssen-Cilag Farmacêutica (São José dos Campos, SP, Brasil) e o N-desmetiltramadol (M2) foi adquirido da Toronto Research Chemicals Inc. (Ontário, Canadá).

Os solventes metanol, etanol (Merck, Darmstadt, Alemanha), éter metil-*terc*butílico (J.T. Baker, Xastoloc, México), e n-hexano 95% (Tedia Company, Fairfield, EUA) foram grau HPLC. A dietilamina (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA), o hidróxido de sódio (Synth, Diadema, Brasil) e o acetado de amônio (J.T. Baker, Xastoloc, México) foram grau P.A. Toda a água utilizada durante o experimento foi obtida em sistema de purificação Milli-Q<sup>®</sup> Plus (Millipore, Belford, MA, EUA).

Para a análise do fármaco total e livre em plasma, a solução estoque de tramadol racêmico foi preparada em metanol na concentração de 1 mg/mL e as soluções de uso foram preparadas nas concentrações de 0,004; 0,01; 0,02; 0,4; 1; 2; 4 e 12 µg de cada enantiômero/mL de metanol. As soluções estoque dos metabólitos M1 e M2 racêmicos foram preparadas nas concentrações de 0,2 mg/mL

e 0,1 mg/mL de metanol, respectivamente. As soluções de uso do M1 e M2 foram preparadas nas concentrações de 0,002; 0,005; 0,01; 0,2; 0,5; 1; 2 e 6 µg de cada enantiômero/mL de metanol.

Na análise do fármaco livre, foram utilizadas as soluções de uso nas concentrações 0,004; 0,01; 0,02; 0,1; 0,4; 1 e 2 µg de cada enantiômero do tramadol /mL de metanol e 0,002; 0,005; 0,01; 0,05; 0,2; 0,5 e 1 µg de cada enantiômero do M1 e M2/mL de metanol.

O fármaco verapamil (Sigma, St, Louis, EUA) foi empregado como padrão interno. A solução foi preparada em metanol na concentração de 100 ng/mL de metanol. Todas as soluções padrão foram armazenadas a -20° C.

#### 3.2.2 Análise Cromatográfica

A análise dos enantiômeros do tramadol, M1 e M2 livre e total foi realizada por LC-MS/MS. O sistema cromatográfico foi constituído por bomba LC 20AD e forno para acondicionamento de coluna CTO-10AS, provenientes da Shimadzu (Kyoto, Japão). O processo de injeção das amostras foi realizado no injetor automático modelo SIL-10AD VP da Shimadzu (Kyoto, Japão) com temperatura mantida a 12° C.

Os enantiômeros do tramadol, M1 e M2 foram separados na coluna quiral Chiralpak<sup>®</sup> AD (Chiral Technologies, Exion, PA, EUA) 250 x 4,6 mm com tamanho de partícula de 10  $\mu$ m, mantida a 24° C e fase móvel constituída por mistura de *n*-hexano:etanol (95,5:4,5, v/v) adicionada de 0,1 % de dietilamina, na vazão de 1,2 mL/min.

O efluente da coluna cromatográfica foi misturado com solução de etanol: acetato de amônio 10 mM (95:5 v/v), na vazão de 0,25 mL/min, sendo que 200  $\mu$ L/min da mistura foram dirigidos para o espectrômetro de massas sequencial (MS/MS) triplo quadrupolo Quattro Micro LC (Micromass, Manchester, Reino Unido). A análise por espectrometria de massas sequencial foi executada no modo eletronebulização positivo. A voltagem do capilar na ionização por eletronebulização foi de 3,0 kV. A temperatura da fonte e a temperatura de dessolvatação foram mantidas a 100° e 200° C, respectivamente. O nitrogênio foi utilizado como gás de nebulização na vazão de 365 L/h e o gás argônio, empregado como gás de colisão foi mantido na pressão de aproximadamente 6,3 x 10<sup>-4</sup> mbar. A voltagem do cone utilizada foi de 30 V para o tramadol, M1 e M2 e 45 V para o padrão interno. A energia de colisão empregada foi de 30 eV para o tramadol, M1 e M2 e 40 eV para o padrão interno.

As condições de otimização do MS-MS foram obtidas por infusão direta das soluções padrão de tramadol e metabólitos (10 µg/mL) preparadas na fase móvel e introduzidas com bomba de infusão na vazão de 20 µL/min. As análises foram executadas no modo MRM (*Multiple Reaction Monitoring*).

Os íons moleculares protonados [M+H]<sup>+</sup> e seus respectivos íons-produtos foram monitorados nas transições 264>58 para os enantiômeros do tramadol, 250>58 para os enantiômeros do M1, 250>44 para os enantiômeros do M2, 455>165 para o padrão interno (verapamil) (Figura 3).

A aquisição de dados e a quantificação das amostras foram realizadas utilizando o programa MassLynx, versão 4.1 (Micromass, Manchester, Reino Unido).

#### 3.2.3 Preparo de amostras

As amostras de plasma branco foram obtidas através de doação de voluntários sadios no Hemocentro do HCFMRP-USP.

Para a análise da concentração total dos enantiômeros do tramadol, M1 e M2, alíquotas de 500  $\mu$ L de plasma foram enriquecidas com 25  $\mu$ L da solução do padrão interno (verapamil, 100 ng/mL), 100  $\mu$ L de solução de hidróxido de sódio 1 M, 0,1 g de cloreto de sódio e 6 mL de éter metil-*terc*-butílico. Os tubos foram agitados em agitador horizontal de mesa reciprocante (modelo MA 139 / CTF da Marconi) durante 30 minutos e centrifugados a 1800 *g* durante 10 min a 5° C (Beckman modelo TJ-6, 6000 *g*). As fases orgânicas (5 mL) foram transferidas para tubos cônicos e evaporadas até a secura em sistema de evaporação à vácuo. Os resíduos foram retomados em 140  $\mu$ L de fase móvel, agitados por 10 segundos (agitador de tubos Phoenix modelo AP-56) e 120  $\mu$ L foram injetados na coluna cromatográfica (Figura 2).





Para a análise da concentração livre dos enantiômeros do tramadol, M1 e M2, alíquotas de 1 mL de plasma branco ou de amostras de plasma foram acondicionadas em dispositivo de ultrafiltração Centrifree<sup>®</sup> (Millipore, Carrigtwohill, Irlanda) e centrifugadas a 1875 *g* durante 40 minutos em centrífuga com rotor de eixo fixo (ângulo de 36 graus) (modelo NT 825, Nova Técnica, Piracicaba, Brasil), refrigerado a 4 °C para a obtenção do ultrafiltrado do plasma. O processo de ultrafiltração do plasma humano está descrito na Figura 3.



Figura 3 - Ultrafiltração do plasma humano. Antes da ultrafiltração, o fármaco encontra-se parcialmente livre no plasma e parcialmente ligado às proteínas plasmáticas (A). Durante a ultrafiltração, o fármaco livre atravessa a membrana junto com o solvente (plasma). Sua concentração no ultrafiltrado é a mesma da amostra acima da membrana (B) (MILLIPORE CORP., 2010, 2011)

Alíquotas de 200  $\mu$ L do ultrafiltrado foram adicionadas de 25  $\mu$ L da solução de padrão interno (verapamil, 100 ng/mL), 50  $\mu$ L de hidróxido de sódio 1 M, 50 mg de cloreto de sódio e 3 mL de éter metil-*terc*-butílico. Os tubos foram agitados durante 30 minutos em agitador horizontal de mesa reciprocante e centrifugados a 1800 *g* a 4° C, durante 10 minutos. As fases orgânicas (2,5 mL) foram transferidas para tubos cônicos e evaporadas a secura em evaporador rotacional a vácuo. Os resíduos foram retomados em 100  $\mu$ L de fase móvel, agitados em *mixer* por 10 segundos e uma alíquota de 70  $\mu$ L foi injetada no sistema HPLC (Figura 2).

# 3.2.4 Determinação da ordem de eluição dos enantiômeros do tramadol, M1 e M2

A ordem de eluição dos enantiômeros do tramadol e dos metabólitos M1 e M2 foi determinada com base na coleta dos picos individuais obtidos na coluna de fase quiral Chiralpak<sup>®</sup> AD, seguida de posterior injeção na coluna Chiralcel<sup>®</sup> OD-R e detecção por fluorescência, conforme o procedimeto descrito por Godoy et al. (2011).

Em resumo, uma alíquota de 50  $\mu$ L de solução estoque de tramadol, M1 e M2 racêmica (500  $\mu$ g de cada enantiômero do tramadol, 100  $\mu$ g de cada enantiômero do M1 e 50  $\mu$ g de cada enantiômero do M2/mL de metanol) foi evaporada até a secura e retomada em 100  $\mu$ L de fase móvel (*n*-hexano:etanol, 95,5:4,5 v/v adicionada de 0,1% de dietilamina), dos quais 80  $\mu$ L foram injetados no sistema HPLC com coluna Chiralpak<sup>®</sup> AD (250 x 4,6 mm) e detecção por fluorescência em 275 nm (excitação) e 300 nm (emissão). Os picos referentes a cada um dos enantiômeros foram coletados em tubos distintos e o solvente foi evaporado até a secura.

Os resíduos foram retomados em 100  $\mu$ L de fase móvel (tampão fosfato 0,05 M contendo perclorato de sódio 1M pH 2,5: acetonitrila: N,N-dimetiloctilamina 74,8:25:0,2 %), conforme descrito por Campanero et al. (2004). Uma alíquota de 25  $\mu$ L foi injetada no sistema HPLC com coluna OD-R e detector por fluorescência operando em 200 nm (excitação) e 301 nm (emissão).

## 3.2.5 Determinação do efeito matriz

O efeito da matriz foi avaliado através da comparação direta das áreas dos picos dos enantiômeros do tramadol e seus metabólitos e do padrão interno verapamil, injetados diretamente na fase móvel, com as áreas dos picos obtidas de soluções padrão (0,6; 200 e 480 ng de cada enantiômero do tramadol/mL de plasma e 0,3; 100 e 240 ng de cada enantiômero do M1 e M2/mL de plasma) adicionadas em extratos de plasma branco originários de 6 diferentes voluntários (conforme procedimento de extração descrito no item 3.2.3).

#### 3.2.6 Teste de racemização

Para verificar a ocorrência de racemização, os enantiômeros do tramadol, M1 e M2 foram separados e coletados no sistema HPLC com detector por fluorescência, operando em 275 nm (excitação) e 300 nm (emissão), utilizando coluna Chiralpak<sup>®</sup> AD (250 x 4,6 mm) e fase móvel *n*-hexano:etanol, 95,5:4,5 v/v adicionada de 0,1% de dietilamina em fluxo de 1,2 mL/min. As alíquotas referentes aos enantiômeros individuais foram coletadas separadamente e o solvente foi evaporado até a secura. Os resíduos correspondentes aos enantiômeros isolados foram retomados em fase móvel. Parte deles foi analisada diretamente no sistema LC-MS/MS; outra parte foi usada para enriquecer alíquotas de 500 µL de plasma branco que foram submetidas ao procedimento de extração (conforme descrito no item 3.2.3) e posteriomente analisadas no sistema LC-MS/MS (de acordo com o item 3.2.2).

#### 3.2.7 Validação

O método desenvolvido para a análise enantiosseletiva do tramadol e dos metabólitos M1 e M2 em plasma humano foi validado de acordo com as recomendações da ANVISA (Resolução n° 899, 29 de maio de 2003; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003) para validação de métodos bioanalíticos. O processo de validação incluiu todos os procedimentos requeridos para demonstrar que o método desenvolvido para análise dos enantiômeros do tramadol, M1 e M2 é compatível com a aplicação em estudos de disposição cinética.

### 3.2.7.1 Curva de calibração/linearidade

As curvas de calibração para análise do tramadol, M1 e M2 total em plasma humano foram construídas utilizando alíquotas de 500  $\mu$ L de plasma branco enriquecidas com 25  $\mu$ L de cada solução padrão de uso de tramadol, M1 e M2. As amostras foram extraídas e analisadas como descrito anteriormente (itens 3.2.2 e 3.2.3). As curvas de calibração foram construídas nas concentrações de 0,2; 0,5; 1; 20; 50; 100; 200 e 600 ng de cada enantiômero do tramadol/mL de plasma e de 0,1; 0,25; 0,5; 10; 25; 50; 100 e 300 ng de cada enantiômero do M1 e M2/mL de plasma. Para análise do tramadol, M1 e M2 livre em plasma, foram utilizados 200  $\mu$ L de ultrafiltrado branco enriquecidos com 25  $\mu$ L de cada solução padrão do tramadol, M1 e M2. As amostras foram preparadas conforme descrito no item 3.2.3 e as curvas de calibração foram construídas nas concentrações de 0,5; 1,25; 2,5; 12,5; 50; 125 e 250 ng de cada enantiômero do tramadol/mL plasma e 0,25; 0,625; 1,25; 6,25; 25; 62,5; 125 ng de cada enantiômero do M1 e M2/mL plasma.

### 3.2.7.2 Limite inferior de quantificação

O limite inferior de quantificação (LIQ) foi definido como a menor concentração quantificada de cada enantiômero com coeficiente de variação de até 20% e porcentagem de inexatidão de ± 20%. Foram avaliadas quintuplicatas de amostras enriquecidas com tramadol, M1 e M2 em concentrações decrescentes àquelas empregadas na curva de calibração.

### 3.2.7.3 Recuperação

A recuperação avalia a eficiência do procedimento de extração dos enantiômeros do tramadol, M1, M2 e padrão interno em plasma humano. A recuperação do tramadol, M1 e M2 foi avaliada em quintuplicata, nas concentrações de 0,6, 200 e 480 ng de cada enantiômero do tramadol/mL de plasma humano e nas concentrações de 0,3, 100 e 240 ng de cada enantiômero do M1 e M2/mL de plasma humano. A recuperação foi calculada através da comparação dos resultados analíticos de amostras extraídas com os resultados obtidos com soluções padrão adicionadas aos extratos do plasma branco.

#### 3.2.7.4 Precisão e exatidão

A precisão e a exatidão dos métodos foram avaliadas através dos estudos intraensaios e interensaios.

Para a análise dos enantiômeros do tramadol, M1 e M2 total, as amostras de plasma branco foram enriquecidas nas concentrações de 0,6; 200 e 480 ng de cada enantiômero do tramadol/mL de plasma e 0,3; 100 e 240 ng de cada enantiômero do M1 e M2/mL de plasma. Para a análise dos enantiômeros do tramadol, M1 e M2

livres no plasma, as amostras foram preparadas nas concentrações de 1, 80 e 200 ng de cada enantiômero do tramadol /mL de plasma e 0,5, 40 e 100 ng de cada enantômero do M1 e M2/mL de plasma. Todas as soluções foram separadas em alíquotas e armazenadas a -20° C.

Para avaliação de precisão e exatidão intraensaios, foram analisadas 5 alíquotas de cada amostra em uma única corrida analítica. E para avaliação de precisão e exatidão interensaios foram analisadas alíquotas, em quintuplicata, das amostras em 4 ensaios consecutivos.

A avaliação da precisão intraensaios e interensaios foi realizada através do cálculo do coeficiente de variação dos resultados obtidos e para que o método possa ser referido preciso, o coeficiente de variação deve ser igual ou inferior a 15%.

A exatidão intraensaios e interensaios é expressa pela porcentagem de inexatidão e definida pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente. Pode ser representada pela equação:

# % Inexatidão = <u>(concentração média experimental – concentração teórica)</u> x 100 concentração teórica

## 3.2.7.5 Estabilidade

Foram avaliadas as estabilidades de curta duração, pós-processamento, após 3 ciclos de congelamento e descongelamento e de longa duração. Para avaliação da estabilidade dos enantiômeros do tramadol, M1 e M2 foram preparadas amostras enriquecidas com concentrações baixa e alta (0,6 e 480 ng de cada enantiômero do tramadol/mL de plasma e 0,3 e 240 ng de cada enantiômero do M1 e M2/mL de plasma).

Para avaliação da estabilidade de curta duração as amostras enriquecidas foram mantidas em temperatura ambiente (23° C) por 6 horas. Após esse período, as amostras foram extraídas e analisadas.

Para avaliação da estabilidade pós-processamento, as amostras foram mantidas no auto-injetor a 12° C por um período de 12 horas, sendo então injetadas no sistema cromatográfico.

Para verificar a estabilidade após 3 ciclos de congelamento e descongelamento, as amostras enriquecidas foram congeladas a -20° C por pelo menos 24 horas. Após esse período, foram descongeladas e congeladas novamente por 12 horas, repetindo-se esse processo até o terceiro ciclo de descongelamento quando foram extraídas e analisadas.

Para avaliação da estabilidade de longa duração as amostras enriquecidas foram mantidas em temperatura de -20° C por 11 meses. Após esse período, as amostras foram extraídas e analisadas.

Os resultados foram comparados com aqueles obtidos com as amostras recém-preparadas e foram expressos em porcentagem de desvio.

#### 3.3 Análise farmacocinética

Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados com base nas curvas de concentração plasmática total *versus* tempo. Foi empregado o programa Winnonlin, versão 4.0 (Pharsight Corp., Mountain View, Califórnia, EUA). A disposição cinética enantiosseletiva do tramadol foi avaliada empregando o modelo bicompartimental aberto, cinética de primeira ordem e inclusão de *lag time*. A área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo (AUC<sup>0-∞</sup>) foi calculada pelo método dos trapezóides com extrapolação para o infinito. O *clearance* total aparente (CI<sub>T</sub>/F) foi obtido através da equação CI<sub>T</sub>/F= Dose/AUC<sup>0-∞</sup>. O volume de distribuição aparente (Vd/F) foi calculado pela equação padrão do *software* e refere-se a soma dos volumes de distribuição dos compartimentos 1 e 2 (GABRIELSSON; WEINER, 2000).

Na análise farmacocinética dos enantiômeros dos metabólitos M1 e M2 foi empregado o modelo monocompartimental aberto, cinética de primeira ordem e inclusão de *lag time*.

A concentração livre dos enantiômeros do tramadol, M1 e M2 foi avaliada no tempo de observação da concentração plasmática máxima total do tramadol para cada paciente. A fração livre no plasma (Fu) foi determinada conforme a equação:

Fu = [concentração livre no plasma] [concentração total no plasma]

## 3.4 Análise estatística

A análise estatística foi realizada empregando os softwares GraphPad Instat<sup>®</sup> (GraphPad Software, CA, EUA) e Origin versão 8.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, EUA). Os dados foram apresentados através das medianas (percentis 25 e 75) e médias. O teste de Wilcoxon foi empregado para avaliar as razões enantioméricas (+)-tramadol/(-)-tramadol, (+)-M1/(-)-M1, (+)-M2/(-)-M2 diferentes da unidade, com valores de  $p \le 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

## 4.1 Análise enantiosseletiva do tramadol, M1 e M2 livre e total em plasma humano

O estudo da disposição cinética dos enantiômeros do tramadol, M1 e M2 exigiu o desenvolvimento de métodos de análise em plasma com limites inferiores de quantificação compatíveis com a administração de doses únicas de 100 mg de tramadol por via oral.

Os enantiômeros do tramadol foram separados na coluna quiral Chiralpak<sup>®</sup> AD com a fase móvel constituída por mistura de *n*-hexano e etanol (95,5:4,5, v/v) adicionada de 0,1% de dietilamina. A Figura 4 apresenta os cromatogramas da análise de um plasma branco (Figura 4A), de um plasma enriquecido com tramadol, M1 e M2 na concentração de 200 ng de cada enantiômero do tramadol por mL de plasma e 100 ng de cada enantiômero do M1 e M2 por mL de plasma (Figura 4B), e da análise da concentração plasmática total (Figura 4C) e livre (Figura 4D) em um paciente portador de dor neuropática 3 horas após receber 100 mg de tramadol por via oral.

#### 4.1.1 Ordem de eluição dos enantiômeros do tramadol, M1 e M2

A ordem de eluição dos enantiômeros do tramadol e dos metabólitos M1 e M2 foi determinada conforme descrito por Godoy et al. (2011). Os tempos de retenção de cada enantiômero coletado de acordo com o procedimento desenvolvido no presente estudo e analisados de acordo com o método descrito por Campanero et al. (2004) foram comparados aos dos referidos autores para a identificação da ordem de eluição. A sequência de eluição dos enantiômeros no método desenvolvido foi: (+)-tramadol; (-)-tramadol; (+)-M1; (-)-M1; (+)-M2; padrão interno (PI) e (-)-M2 (Figura 4).



Figura 4 - Cromatogramas referentes a análise dos enantiômeros do tramadol, M1 e M2 em plasma humano. (A) plasma humano branco; (B) plasma humano enriquecido com tramadol na concentração de 200 ng de cada enantiômero/mL e M1 e M2 na concentração de 100 ng de cada enantiômero/mL e padrão interno (verapamil); análise da concentração livre+ligada às proteínas plasmáticas (C) e livre (D) dos enantiômeros do tramadol, M1 e M2 em plasma de paciente 3 horas após a administração de 100 mg de tramadol por via oral. Picos: 1- (+)-tramadol; 2- (-)-tramadol; 3-(+)-M1; 4- (-)-M1; 5- (+)-M2; 6- padrão interno (PI); 7- (-)-M2

#### 4.1.2 Racemização

O teste de racemização foi realizado numa etapa anterior à validação do método através da análise de amostras de plasma branco enriquecidas com os enantiômeros individuais. Foi demonstrada ausência de racemização durante o procedimento de extração.

#### 4.1.3 Estudo do efeito matriz

Os dados apresentados na Tabela 2 indicam que o efeito matriz na ionização dos enantiômeros do tramadol, M1 M2 e do padrão interno é praticamente ausente.

**Tabela 2 -** Estudo do efeito matriz para os enantiômeros do tramadol, M1, M2 e padrão interno (PI) em seis diferentes lotes de plasma humano. Resultados apresentados como porcentagem em relação ao sinal original

Concentração	(+) tramadal	() tramadal	(+) M4	( ) M4	(+) MO	() M2	וח
ng/mL	(+)-tramadoi	(-)-tramadol	(+)-141/1	(-)-14171	(+)-IVI∠	(-)-IVI∠	PI
0,3 ng/mL			107,79	102,14	102,90	100,89	
0,6 ng/mL	93,24	99,11					
100 ng/mL			104,75	105,73	104,27	97,42	102,90
200 ng/mL	100,18	97,58					
240 ng/mL			107,11	102,94	99,38	97,35	
480 ng/mL	101,31	92,84					

# 4.1.4 Validação do método de análise enantiosseletiva do tramadol, M1 e M2 livre e total em plasma humano

As Tabelas 3 e 5 apresentam os limites de confiança do método de análise da concentração livre dos enantiômeros do tramadol, M1 e M2 e as Tabelas 4 e 6 apresentam os limites de confiança do método de análise da concentração plasmática total dos enantiômeros do tramadol, M1 e M2 em plasma humano.

	(+)-tramadol	(-)-tramadol
Linearidade (0,5 - 250 ng/mL)	y=0,0101x-0,0011	y=0,0128x -0,0017
r	0,9996	0,9995
Limite de quantificação (0,5 ng/mL)		
Precisão (CV%, n=5)	11,21	8,16
Exatidão (Inexatidão %)	1,4	-8,13
Precisão Interensaios (CV%, n=15)		
1 ng/mL	7,69	8,59
80 ng/mL	7,97	10,27
200 ng/mL	10,00	10,16
Precisão Intra-ensaio (CV%, n=6)		
1 ng/mL	8,68	11,53
80 ng/mL	5,31	7,67
200 ng/mL	9,16	7,94
Exatidão Interensaios (% Inexatidão, n=15)		
1 ng/mL	-3,91	0,59
80 ng/mL	-5,47	-7,45
200 ng/mL	1,70	-2,77
Exatidão Intra-ensaio (% Inexatidão, n=6)		
1 ng/mL	-4,96	-1,71
80 ng/mL	5,20	5,17
200 ng/mL	9,02	3,34

**Tabela 3** - Parâmetros de validação do método de análise dos enantiômeros do tramadol

 livre em plasma humano

CV = coeficiente de variação [(desvio padrão/média) x 100]; r=coeficiente de correlação linear; % Inexatidão= [(concentração obtida-concentração real)/concentração real] x 100; \*Precisão e exatidão interensaios: avaliada em triplicata durante 5 dias

	(+)-tramadol	(-)-tramadol
Recuperação (%)		
0,6 ng/mL	91,95	91,12
200 ng/mL	92,34	102,35
480 ng/mL	98,18	85,90
Linearidade (0,2 - 600 ng/mL)	y = 0,097x - 0,254	y=0,125x-0,080
r	0,9991	0,9993
Limite de quantificação (0,2 ng/mL)		
Precisão (CV%, n=5)	6,04	7,59
Exatidão (Inexatidão %)	0,40	2,00
Precisão Interensaios (CV%, n=20)		
0,6 ng/mL	6,94	6,70
200 ng/mL	8,18	7,14
480 ng/mL	8,80	8,13
Precisão Intra-ensaio (CV%, n=5)		
0,6 ng/mL	6,76	5,34
200 ng/mL	10,06	3,99
480 ng/mL	12,94	10,66
Exatidão Interensaios (% Inexatidão, n=20)		
0,6 ng/mL	1,83	-0,08
200 ng/mL	-6,22	-5,32
480 ng/mL	-0,24	3,43
Exatidão Intra-ensaio (% Inexatidão, n=5)		
0,6 ng/mL	4,00	2,00
200 ng/mL	-9,46	-10,51
480 ng/mL	-5,14	-0,81
Estabilidade (% Inexatidão, n=5)		
<i>Curta Duração</i> (6h a 23° C)		
0,6 ng/mL	-11,86	-13,40
480ng/mL	7,23	3,88
Pós-processamento (12 h a 12° C)		
0,6 ng/mL	-2,88	-7,52
480ng/mL	13,73	10,86
Congelamento/descongelamento (3 ciclos)		
0,6 ng/mL	-9,96	-7,84
480 ng/mL	8,90	5,74
Longa Duração (11 meses a -20° C)		
0,6 ng/mL	0,01	-4,15
480 ng/mL	7,11	2,04

**Tabela 4** - Parâmetros de validação do método de análise da concentração total dos enantiômeros do tramadol em plasma humano

CV = coeficiente de variação [(desvio padrão/média) x 100]; r=coeficiente de correlação linear, % Inexatidão= [(concentração obtida-concentração real)/concentração real] x 100

	(+)-M1	(-)-M1	(+)-M2	(-)-M2
Linearidade (0,25 - 125 ng/mL)	y= 0,0487x-0,0103	y=0,0667x-0,015	y=0,0358x+0,0112	y=0,0273x+0,0198
L	0,9997	0,99905	0,9952	0,9952
Limite de quantificação (0,25 ng/mL)				
Precisão (CV%, n=5)	11,82	11,47	10,54	7,10
Exatidão (Inexatidão %)	-5,33	-3,00	0,87	-5,53
Precisão Interensaios* (CV%, n=15)				
0,5 ng/mL	8,62	5,67	10,68	8,12
40 ng/mL	9,70	5,11	11,08	11,99
100 ng/MI	9,78	11,08	12,58	11,13
Precisão Intra-ensaio (CV%, n=6)				
0.5 ng/mL	2,86	7,50	11,20	3,95
40 ng/mL	7,97	5,53	13,79	11,78
100 ng/MI	12,84	8,48	9,61	4,04
Exatidão Inter-ensaios* (% Inexatidão, n=15)				
0,5 ng/mL	-6,02	-6,98	-1,22	4,3
40 ng/mL	-6,67	-9,14	0,53	3,33
100 ng/mL	0,70	-1,90	-9,69	-10,46
Exatidão Intraensaio (% Inexatidão, n=6)				
0,5 ng/mL	-7,67	2,00	-0,17	-6,58
40 ng/mL	-6,48	-7,80	3,11	0,51
100 ng/mL	-8,10	-9,10	-6,47	-9,04
CV = coeficiente de variação [(desvio padrão/média) x 100]; r-	=coeficiente de correlacão lines	r. % Inexatidão= I(concentra	cão obtida-concentracão real)/	concentracão reall x

Tabela 5 - Parâmetros de validação do método de análise da concentração livre dos enantiômeros do M1 e M2 em plasma humano

CV = coeficiente de variação [(desvio padrão/média) x 100]; r=coeficiente de 100; \*Precisão e exatidão interensaios: avaliada em triplicata durante 5 dias

no
Ĕ
=
2
Ļ
μ
3
S
σ
-
F
5
Ψ
$\sim$
5
2
Ð
•
Ξ
$\geq$
_
<u> </u>
σ
3
õ
2
Ð
È
Ľ
ŝ
Ę
(D
Ç
Ð
S
0
σ
_
g
÷
2
-
Q
ğ
Q
σ
Ę
Ð
Õ
ō
ŏ
_
<u>0</u>
0
<b>a</b> >
(1)
ŝ
lise
álise
nálise
análise
enálise
le análise
de análise
o de análise
do de análise
odo de análise
todo de análise
étodo de análise
nétodo de análise
método de análise
o método de análise
do método de análise
o do método de análise
ăo do método de análise
ção do método de análise
ação do método de análise
tação do método de análise
idação do método de análise
alidação do método de análise
validação do método de análise
<ul> <li>validação do método de análise</li> </ul>
le validação do método de análise
de validação do método de análise
s de validação do método de análise
os de validação do método de análise
ros de validação do método de análise
stros de validação do método de análise
netros de validação do método de análise
metros de validação do método de análise
âmetros de validação do método de análise
irâmetros de validação do método de análise
<sup>2</sup> arâmetros de validação do método de análise
Parâmetros de validação do método de análise
<ul> <li>Parâmetros de validação do método de análise</li> </ul>
<ul> <li>Parâmetros de validação do método de análise</li> </ul>
6 - Parâmetros de validação do método de análise
a 6 - Parâmetros de validação do método de análise
i <b>la 6 -</b> Parâmetros de validação do método de análise
ela 6 - Parâmetros de validação do método de análise
bela 6 - Parâmetros de validação do método de análise
abela 6 - Parâmetros de validação do método de análise

	(+)-M1	(-)-M1	(+)-M2	(-)-M2
Recuperação (%)				
0.3 na/mL	94.06	93.72	93.85	90.69
100 no/ml	100 20	06 71	OF DE	80.05
	00,20	07 73	88 30	00,00
Linearidade (u,1 - 300 ng/mL)	y=0,467X+0,67Z	y=0,491X+Z	y=u,3U/X+U,0/6	y=0,244X-0,010 0.0001
	0,9997	0,9900	0,9969	0,9991
Limite de quantificação (0,1 ng/mL)				
Precisão (CV%, n=5)	2,95	4,63	8,50	7,99
Exatidão (Inexatidão %)	-4,00	-1,60	-2,40	-2,4
Precisão Interensaios (CV%, n=20)				
0.3 na/mL	8.11	9.49	7.16	7.24
100 nd/ml	9,83	5,29	4 55	5,83
240 ng/ml	10.04	2, <u>-</u> 0 7 16	9.06	6,70 6,70
Precisão Intraensaio (CV% n=5)	- 0.00-	)		)
	7 78	668	10.66	6 68
3,0 ng/mE		0,00 70 0,00	1 75	2000 2001
	07.4	0,4	5 - C	0,0- 0,00
Z40 ng/mL	8,29	2,92	0,95	9,26
Exatidão Interensaios (% Inexatidão, n=20)				
0,3 ng/mL	-5,33	-3,33	-1,50	-1,50
100 ng/mL	-1,11	4,86	5,68	2,72
240 ng/mL	-4.54	2.53	2.24	4.17
Exatidão Intraensaio (% Inexatidão. n=5)				
0.3 na/mL	-1.33	-6.67	-2.67	-6.67
100 ng/mL	-1.90	0.41	8.84	7.51
240 ng/ml	6.32	7 11	-6.86 -6.86	1 92
Estabilidada (0/ Inevatidão n-6)	0,01		0000	10,1
Curto durocco (Ab a 23° C)				
		ľ	1	C L
U,3 ng/mL	co'n-	5,71	4,79	00.6-
240 ng/mL	-12,67	-5,03	9,95	11,63
Pós-processamento (12h a 12° C)				
0,3 ng/mL	-1,30	0,71	3,42	4,28
240 ng/mL	-13,90	-2,68	12,19	1,72
Congelamento/descongelamento (3 ciclos)				
0,3 na/mL	-1,95	14.29	2.74	-7,14
240 ng/mL	-11,21	-13,64	12,43	0,44
<i>Longa duracão</i> (11 meses a -20° C)				
0,3 na/mĽ	1.82	13.79	4,93	5,42
240 ng/mL	-13,87	-14,93	9,58	5,15
- MV - montininato do vincinação [/domínio modrão/mádio) v	v 1001: r-cooficionto do corrolocão	linear 0/ Incontidão- Ma		rool)/concentracéo rooll v 100
	א וטטן, ו-נטפווטפוונים עם נטוו פומלמני	ullical, 70 ilicialuau- [(u	טווכבוונו פלפה החוומפ-כטווכבוונו פלפר	ה ובמו/החוורבוווו מלמה ובמון א והה

Capítulo 1 | **54** 

# 4.2 Farmacocinética dos enantiômeros do tramadol, M1 e M2 total em pacientes portadores de dor neuropática

A Figura 5 mostra as curvas de concentração plasmática total *versus* tempo e a Tabela 7 apresenta os parâmetros farmacocinéticos de cada enantiômero do tramadol, M1 e M2 dos pacientes portadores de dor neuropática após administração oral de 100 mg de tramadol racêmico (n=12).



Figura 5 - Curvas de concentração plasmática total *versus* 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

Tabela 7 - [ mg de trama	Disposição cinética do adol racêmico. Os dac	os enantiômeros do tra dos estão expressos co	imadol, M1 e M2 nos   omo mediana (percent	pacientes portadores d il 25 e 75) e média	e dor neuropática (n=´	12) tratados com 100
	(+)-tramadol	(-)-tramadol	(+)-M1	(-)-M1	(+)-M2	(-)-M2
AUC <sup>0-</sup> " (na.h/mL)	1311,80 (1042,23-2166,57)	1264,17 * (851,51-1496,44)	1246,64 (621,18-1413,96)	998,91 (689,39-1293,81)	402,28 (198,76-728,43)	80,92 * (47,09-104,52)
(6)	1655,77	1303,13	1152,60	1018,50	509,33 22 4 5	91,29 5.15 ±
C <sub>max</sub> (ng/mL)	167,47 (137,52-253,13) 186.63	159,47 (119,66-223,58) 170,30	83,04 (62,54-110,48) 85 73	85,56 (69,07-103,68) 84.70	36,15 (16,12-52,82) 36.20	9,16 * (4,63-13,45) 10 00
	1.53	1.46	1.54	1.66	2.12	1.53 *
t <sub>max</sub> (h)	(1,29-2,00) 1 60	(1,20-1,97) 1.52	(1,28-2,06) 1.67	(1,31-2,17) 1 86	(1,57-3,03) 2 75	(1,25-2,14) 1 85
t <sub>∿₂</sub> a (h)	0,34 (0,16-0,5) 0,34	., <u></u> 0,36 (0,2-0,44) 0,33	2 1	1	1	) ) ) ,
t <sub>%</sub> α (h)	0,82 (0,42-1,82) 1,19	0,88 (0,44-1,92) 1,25		,		
t <sub>%</sub> β (h)	7,61 (6,55-9,11) 53,51	7,09 * (6,25-8,88) 18,55	ı	ı	ı	ı
t <sub>%</sub> f (h)	r	ı	0,22 (0,13-0,31) 0,23	0,20 (0,15-0,39) 0,40	0,32 (0,21-0,75) 0,85	0,20 * (0,13-0,44) 0,35
t <sub>%</sub> (h)	ı	ı	7,53 (6,18-9,29) 8,28	6,47 (5,42-8,83) 6,94	6,50 (5,66-7,96) 7,21	5,51 * (4,26-6,37) 5,49
CI <sub>T</sub> /F (L/h)	38,31 (23,81-48,29) 38,52	39,87 (33,42-58,76) 44,64	ı	ı	ı	ı
Vd/F (L)	357,26 (286,68-509,11) 1031,91	368,43 (264,07-506,27) 378,71	ı	ı	ı	ı
AUC <sup>0-~</sup> (+)/(-)	1, (1,00. 1,1	13 -1,37) 27	1,1 (0,90-2 1,1	8 1,36) 15	4,8 (3,75-6 5,2	0 5,20) 8
AUC <sup>0-∞</sup> - área sí distribuição; t <sub>i∞</sub> β	ob a curva concentração plas – meia vida de eliminação; t $_{x^{4}}$	smática versus tempo; Cmax – f – meia vida de formação; $t_{\rm X^2}$ –	concentração plasmática más meia vida; Ch/F – <i>clearance</i> t	<pre><ima; t<sub="">max − tempo para alcanç otal aparente. Vd/F − volume de</ima;></pre>	ar C <sub>max</sub> ; t <sub>%</sub> a – meia vida de al e distribuição aparente. * Teste	bsorção; t <sub>i≾</sub> α – meia vida de de Wilcoxon (p ≤ 0,05)

Capítulo 1 | 56

A Figura 6 apresenta as medianas das razões enantioméricas (+)/(-) de concentrações plasmáticas totais do tramadol, M1 e M2 em pacientes portadores de dor neuropática (n=12).



Figura 6 - Razões enantioméricas (+)/(-) das concentrações plasmáticas totais do tramadol, M1 e M2 após administração de dose única oral de 100 mg de tramadol racêmico em pacientes portadores de dor neuropática. Dados apresentados como medianas (n=12)

# 4.3 Avaliação da fração livre dos enantiômeros do tramadol, M1 e M2 em plasma humano

As Tabela 8 mostra o estudo da fração livre dos enantiômeros do tramadol, M1 e M2 nos pacientes portadores de dor neuropática (n=12).

**Tabela 8 -** Fração livre dos enantiômeros do tramadol, M1 e M2 nos pacientes portadores de dor neuropática (n=12)

Pacientes	(+)-tramadol	(-)-tramadol	(+)-M1	(-)-M1	(+)-M2	(-)-M2
1	0,25	0,27	0,10	0,07	0,10	0,07
2	0,39	0,42	0,21	0,18	0,25	0,11
3	0,67	0,45	0,15	0,18	0,28	0,31
4	0,89	0,68	0,22	0,26	0,58	0,61
5	0,65	0,73	0,12	0,15	0,24	0,23
6	0,65	0,46	0,13	0,15	0,37	0,41
7	0,36	0,47	0,08	0,11	0,11	0,10
8	0,64	0,61	0,22	0,19	0,11	0,11
9	1,00	1,00	0,37	0,22	0,19	0,19
10	0,69	0,78	0,32	0,25	0,28	0,30
11	0,68	0,64	0,17	0,20	0,39	0,35
12	0,25	0,29	0,13	0,13	0,09	0,08
Mediana	0,65	0,54	0,16	0,18	0,24	0,21
Média	0,59	0,57	0,18	0,17	0,25	0,24
Percentil	0 37 0 68	0 43 0 70	0 12 0 22	0 14 0 21	0 11 0 33	0 10 0 33
25 – 75	0,37-0,00	0,43-0,70	0,12-0,22	0,14-0,21	0,11-0,33	0,10-0,33

\* Teste de Wilcoxon, p<0,05 [(+)-tramadol vs (-)-tramadol; (+)-M1 vs (-)-M1; (+)-M2 vs (-)-M2]

### 5. DISCUSSÃO

O presente estudo reporta a disposição cinética, a fração livre e o metabolismo dos enantiômeros do tramadol em 12 pacientes portadores de dor neuropática fenotipados como metabolizadores extensivos do CYP2D6. Os métodos desenvolvidos e validados permitiram a quantificação em plasma e o cálculo da fração livre (Fu) dos enantiômeros do tramadol e seus metabólitos M1 e M2 até 24 horas após a administração de dose única oral de 100 mg de tramadol racêmico.

A ligação de fármacos a proteínas plasmáticas é uma importante covariável em farmacocinética, visto que apenas a fração livre de fármacos no plasma encontra-se disponível para a distribuição e a eliminação. No entanto, poucos dados são disponíveis sobre a influência da ligação de fármacos às proteínas plasmáticas na farmacodinâmica e sempre que possível a concentração livre e não a concentração total deve ser usada nos modelos farmacocinética-farmacodinâmica (PK-PD) para os fármacos altamente ou pouco ligados às proteínas plasmáticas (SMITH; DI; KERNS, 2010).

O método de análise da concentração livre é semelhante ao método utilizado para a determinação do fármaco total em plasma, exceto pela exigência de um procedimento capaz de separar o fármaco livre do fármaco ligado às proteínas plasmáticas. No presente estudo, foi empregado o método de ultrafiltração utilizando o dispositivo Centrifree<sup>®</sup> adquirido da Millipore (Millipore, Carrigtwohill, Irlanda), um sistema que resulta na formação de um ultrafiltrado, no qual o fármaco livre encontra-se na mesma concentração da amostra. O fármaco ligado às proteínas plasmáticas não atravessa a membrana e não atinge o ultrafiltrado (Centrifree<sup>®</sup> user guide; MILLIPORE CORP., 2010, 2011). O procedimento de ultrafiltração vem sendo usado na determinação da concentração livre de outros fármacos, tais como o moxifloxacino, paclitaxel e ácido micofenólico (GARDNER et al., 2008; ZENG et al., 2009; PRANGER et al., 2010).

Os enantiômeros do tramadol e seus metabólitos M1 e M2 foram resolvidos em coluna de fase quiral Chiralpak<sup>®</sup> AD com a fase móvel constituída por mistura de *n*-hexano:etanol:dietilamina (95,5:4,5:0,1 v/v/v) com o tempo de corrida de aproximadamente 19 minutos. A Figura 4 apresenta os cromatogramas obtidos no sistema LC-MS/MS referentes a análise da concentração plasmática total (Figura 4C) e livre (Figura 4D) em plasma coletado de um paciente portador de dor neuropática 3 horas após a administração oral de 100 mg de tramadol. Diversos estudos reportam a separação dos enantiômeros do tramadol utilizando cromatografia líquida de alta eficiência. Os métodos empregam fases estacionárias guirais como as colunas Chiralpak<sup>®</sup> AD (CECCATO et al., 2000; MUSSHOFF et al., 2006; MEHVAR et al., 2007), Chiralcel<sup>®</sup> OD-R (CECCATO et al., 1997; CAMPANERO et al., 1999; CAMPANERO et al., 2004) e a coluna AGP (ARDAKANI et al., 2008), cujos seletores quirais são amilose tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato), cellulose tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato) е alfa-1 glicoproteína ácida. а respectivamente. A cromatografia gasosa já foi utilizada na separação dos enantiômeros do tramadol usando a coluna Rt-βDEXcst cujo seletor quiral é βciclodextrina (CHYTIL et al., 2009). A técnica de eletroforese capilar também já foi empregada na análise dos enantiômeros do tramadol utilizando β-ciclodextrinas ou  $\gamma$ -ciclodextrinas com alto grau de sulfatação como seletores quirais (RUDAZ et al., 1998; RUDAZ et al., 1999; RUDAZ et al., 2004).

O efeito matriz foi considerado ausente na análise dos enantiômeros do tramadol, M1 e M2 em plasma humano. Foram obtidos valores próximos a 100% quando as áreas dos picos resultantes da injeção direta de soluções padrão em fase móvel foram comparadas às áreas obtidas de soluções padrão adicionadas a extratos de plasma branco oriundos de seis diferentes voluntários (Tabela 2). Godoy et al. também reportaram ausência de efeito matriz ao empregarem plasma de ratos na análise dos enantiômeros do tramadol, M1 e M2 (GODOY et al., 2011). O teste de racemização foi realizado antes do procedimento de validação e não demonstrou inversão quiral para o tramadol, M1 e M2.

Os enatiômeros do tramadol, M1 e M2 foram extraídos do plasma humano em meio alcalino usando a técnica de *salting-out* com cloreto de sódio e o éter metil*terc*-butílico como solvente de extração. A recuperação (Tabelas 4 e 6) mostra valores de aproximadamente 90% para os enantiômeros do tramadol, M1 e M2 para as diferentes concentrações analisadas. Além da extração líquido-líquido usando o éter metil-*terc*-butílico (CAMPANERO et al., 2004), outros autores reportam o uso de acetato de etila como solvente extrator com recuperações que variam de aproximadamente 75 a 90% (ARDAKANI et al., 2007; ARDAKANI et al., 2008) e extração em fase sólida com recuperações de cerca de 90% (CECCATO et al., 2000).

Os limites de quantificação de 0,2, 0,1 e 0,1 ng de cada enantiômero do

tramadol, M1 e M2/mL de plasma foram observados nas análises da concentração plasmática total, enquanto os limites de 0,5, 0,25 e 0,25 de cada enantiômero do tramadol, M1 e M2/mL de plasma foram observados na análise da concentração livre, respectivamente (Tabelas 3, 4, 5 e 6). Esses dados foram obtidos com a extração de apenas 200 µL de ultrafiltrado provenientes de 1 mL de plasma na análise da concentração livre e de 500 µL de plasma na análise da concentração plasmática total. Tais resultados permitiram a determinação da concentração plasmática total desses analitos até 24 horas após a administração oral de 100 mg de tramadol racêmico. Outros autores que empregaram LC-MS/MS relatam limites de quantificação em termos da concentração plasmática total de 0,15, 3 e 1 ng/mL para cada enantiômero do tramadol empregando volumes de plasma de 1 mL (CECCATO et al., 2000), 500 µL (MUSSHOFF et al., 2006) e 200 µL (PATEL et al., 2009). Para o metabólito ativo M1, os mesmos autores reportaram limites quantificação de 0,3, 4 e 0,5 ng/mL para cada enantiômero, respectivamente. Portanto, o método desenvolvido no presente estudo é o mais sensível entre os já publicados na literatura empregando LC-MS/MS (CECCATO et al., 2000; MUSSHOFF et al., 2006; PATEL et al., 2009). Estudos anteriores relatam que a disposição cinética do (+)-M1 após administração oral a metabolizadores lentos do CYP2D6 não foi descrita pois as concentrações plasmáticas do (+)-M1 encontravamse abaixo do limite de quantificação (FLIEGERT; KURTH; GOHLER, 2005; PEDERSEN; DAMKIER; BROSEN, 2006). Assim, métodos enantiosseletivos sensíveis se fazem necessários para a análise da concentração dos metabólitos do tramadol inclusive em paciente metabolizadores lentos do CYP2D6.

Os coeficientes de variação obtidos nos estudos de precisão e a porcentagem de inexatidão interensaios e intraensaios inferiores a 15% para os enantiômeros do tramadol, M1 e M2 avaliados em três níves de concentração asseguram a repetibilidade e a exatidão dos resultados para os métodos de análise da concentração plasmática total e livre (Tabelas 3, 4, 5 e 6).

A estabilidade dos enantiômeros do tramadol, M1 e M2 para o método analítico desenvolvido foi avaliada em quatro modalidades: estabilidade de curta duração por 6 horas em temperatura ambiente, pós-processamento durante 12 horas a 12° C, após três ciclos de congelamento e descongelamento e de longa duração avaliada no período de 11 meses armazenada a -20° C. Foram determinados desvios inferiores a 15% em relação as amostras recém-preparadas, o

que garante a estabilidade das amostras em plasma sob as condições de armazenamento do estudo (Tabelas 4 e 6). Ausência de degradação ou inversão quiral para os enantiômeros do tramadol, M1 e M2 foi relatada por Ardakani et al. (2008) após armazenar amostras de plasma a -20° C durante 3 meses ou amostras de plasma e soluções estoques durante 24 h a 4°C.

Os limites de confiança obtidos no método de análise da concentração plasmática total são compatíveis com a aplicação em estudos de farmacocinética do tramadol, M1 e M2 após administração de dose única de tramadol racêmico. Considerando os métodos até então disponíveis para a análise simultânea dos enantiômeros do tramadol e seus metabólitos M1 e M2, podemos afirmar que o método desenvolvido é o mais sensível e o mais rápido entre os já publicados na literatura.

A disposição cinética dos enantiômeros do tramadol e seus principais metabólitos de fase I, M1 e M2, foi avaliada em pacientes portadores de dor neuropática após a administração de dose única oral de 100 mg de tramadol racêmico. As curvas de concentração plasmática total dos enantiômeros do tramadol *versus* tempo foram descritas através do modelo bicompartimental e as curvas de concentração plasmática do M1 e M2 foram descritas pelo modelo monocompartimental (Figura 5).

As concentrações plasmáticas totais *versus* tempo do (+)-tramadol foram significativamente maiores que as do (-)-tramadol (AUC: 1311,80 ng.h/mL e 1264,17 ng.h/mL, respectivamente) com a razão enantiomérica AUC<sub>(+)/(-)</sub> de 1,13. Tal acúmulo é acompanhado pela meia-vida de eliminação ( $t_{2\beta}$ ) mais prolongada do (+)-tramadol (7,61 h) em relação ao (-)-tramadol (7,09 h) embora não tenham sido observadas diferenças no *clearance* total aparente entre os enantiômeros (Figura 5; Tabela 7). A enantiosseletividade na farmacocinética do tramadol já havia sido demonstrada por outros autores na literatura com razão AUC<sub>(+)/(-)</sub> variando de 1,22 a 1,28 (GARCÍA-QUETGLAS et al., 2007a; GARCÍA-QUETGLAS et al., 2007b). Após administração de tramadol racêmico na forma de comprimidos de liberação controlada a voluntários sadios chineses em regime de dose múltipla, Liu et al. (2001a) observaram acúmulo do (+)-tramadol no estado de equilíbrio, com razão AUC<sub>(+)/(-)</sub> de 1,22.

A enantiosseletividade na farmacocinética pode ter como causa diversos fatores, entre eles o transporte através de membranas mediado por carreadores, a ligação às proteínas plasmáticas e o metabolismo preferencial para um dos enantiômeros. A ligação do tramadol como mistura enantiomérica às proteínas plasmáticas é baixa (GROND; SABLOTZKI, 2004) e dados de ligação às proteínas plasmáticas dos enantiômeros individuais do tramadol não estão disponíveis na literatura. Kanaan et al. (2009) demonstraram que o tramadol e o M1 não são substratos do transportador de efluxo glicoproteína-P. Entretanto, bombas de efluxo próton-dependentes parecem limitar a absorção gastrointestinal e favorecer a eliminação renal de forma similar para ambos os enantiômeros do tramadol (KANAAN et al., 2009). Um estudo experimental demonstrou que a distribuição dos enantiômeros do tramadol e M1 no SNC de ratos é enantiosseletiva, com maiores concentrações do (+)-tramadol e (-)-M1 no soro e nos tecidos cerebrais, guando comparados ao (-)-tramadol e ao (+)-M1, respectivamente (LIU et al., 2001b). Dessa forma, o metabolismo preferencial de um dos enantiômeros do tramadol parece ser o principal responsável pela enantiosseletividade em sua farmacocinética.

O (+)-M1 é o principal responsável pela atividade analgésica em receptores opióides do tipo  $\mu$ , e portanto, o estudo da sua farmacocinética é de particular interesse. No presente estudo, os pacientes portadores de dor neuropática não apresentaram diferenças significativas entre os enantiômeros do M1 em nenhum parâmetro farmacocinético (Figura 5; Tabela 7). Logo, não é possível explicar a eliminação preferencial do (-)-tramadol nos pacientes portadores de dor neuropática com base na formação do M1. Alguns autores relatam um acúmulo do (-)-M1 com razão AUC<sub>(+)/(-)</sub> de aproximadamente 0,9 em metabolizadores extensivos do CYP2D6 (GARCÍA-QUETGLAS et al., 2007b). Estudos *in vitro* usando microssomas hepáticos de ratos mostram que o metabólito (-)-M1 é preferencial mente formado em relação ao (+)-M1 (LIU et al., 2003). Assim, a eliminação preferencial do (-)-tramadol na forma de (-)-M1 seria uma justificativa plausível para o acúmulo do (+)-tramadol.

Ressalta-se que o M1 é um metabólito intermediário, formado a partir do tramadol e eliminado por reações de N-desmetilação, formando M5 e M4 e por reações de conjugação com o ácido glicurônico ou sulfonato. Em voluntários sadios, a reação de glicuronidação é favorecida para o (-)-M1 com observação de excreção urinária 4 vezes maior para o (-)-M1 quando comparado ao (+)-M1 (OVERBECK; BLASCHKE, 1999; SOETEBEER et al., 2001). Estudos empregando microssomos

hepáticos humanos demonstram que a glicuronidação do M1 é enantiosseletiva com maior formação do (-)-M1 glicuronídeo. As isoformas UGT 1A7, UGT 1A8, UGT1A9 e UGT1A10 catalisam apenas a glicuronidação do (+)-M1, enquanto que a UGT 2B15 e a UGT2B7 catalisam a de ambos enantiômeros do M1 (LEHTONEN et al., 2010). A eliminação preferencial do (-)-M1 glicuronídeo é, portanto, um fator determinante na enantiosseletivade observada na farmacocinética do tramadol em pacientes portadores de dor neuropática.

A farmacocinética do M2 é enantiosseletiva com concentrações plasmáticas do (+)-M2 significativamente maiores que as do (-)-M2 (AUC: 443,41 ng.h/mL e 74,93 ng.h/mL, respectivamente) com razão enantiomérica de  $AUC_{(+)/(-)}$  de 4,64 (Figura 5; Tabela 7). Resultados similares foram observados por García-Quetglas et al. (2007a) com razão  $AUC_{(+)/(-)}$  de 4,5 para o M2 após administração oral de tramadol racêmico. No entanto, as razões de concentrações plasmáticas (+)/(-) aumentam em função do tempo com a observação dos maiores valores (em torno de 7) aproximadamente 16 horas após a administração do fármaco sugerindo a formação preferencial do (+)-M2 e/ou a eliminação preferencial do (-)-M2 (Figura 6).

O método de análise da concentração livre mostrou parâmetros de validação compatíveis com a análise das amostras no tempo de observação da concentração plasmática total máxima (C<sub>max</sub>) e permitiu o cálculo da Fu dos enantiômeros do tramadol, M1 e M2 em cada paciente através da relação entre a concentração plasmática livre e a total. Os pacientes portadores de dor neuropática não mostram enantiosseletividade na fração livre do tramadol com observação de valores de aproximadamente 0,65 para o (+)-tramadol e de 0,55 para o (-)-tramadol (Tabela 8). Os dados da literatura relativos a Fu são escassos, e demonstram que 20 % da concentração plasmática do tramadol como mistura enantiomérica encontra-se ligada às proteínas e portanto, uma fração de 0,8 encontra-se livre no plasma (GROND; SABLOTZKI, 2004). A Fu do (+)-M1 de 0,16 e a do (-)-M1 de 0,18 foram consideradas não enantiosseletivas da mesma forma que as do (+)-M2 e (-)-M2, cujos valores foram de 0,25 e 0,22, respectivamente. Não há dados na literatura referentes a Fu dos metabólitos M1 e M2 como enantiômeros ou mistura enantiomérica.

Concluindo, a farmacocinética do tramadol e seus metabólitos é enantiosseletiva com acúmulo plasmático do (+)-tramadol e (+)-M2 em pacientes portadores de dor neuropática fenotipados como metabolizadores extensivos do CYP2D6 após a administração de dose única oral de tramadol racêmico. A ligação às proteínas plasmáticas não é enantiosseletiva para o tramadol, M1 e M2 e é aproximadamente 4 vezes maior para os enantiômeros do metabólito ativo M1, se comparados aos enantiômeros do tramadol.

# Capítulo 2

Capítulo 2

Influência do diabetes descompensado na disposição cinética e metabolismo dos enantiômeros do tramadol em pacientes portadores de dor neuropática

## 1. INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus (DM) é um grupo de doenças metabólicas de etiologia múltipla caracterizado por hiperglicemia resultante de alteração da secreção de insulina e/ou de alteração na ação da insulina. A hiperglicemia crônica do DM é associada com danos crônicos, disfunções ou falência em vários órgãos, entre eles os olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos (*AMERICAN DIABETES ASSOCIATION*, 2010).

A grande maioria dos casos de DM pode ser classificada em duas categorias. Em uma categoria, DM tipo 1, a causa é a destruição auto-imune ou idiopática das células β pancreáticas que resulta em uma deficiência absoluta da secreção de insulina. Na outra categoria, mais prevalente, DM tipo 2, a causa é uma combinação de resistência a ação da insulina com uma deficiência relativa ou resposta secretória de insulina inadequada (*AMERICAN DIABETES ASSOCIATION*, 2010).

O DM é um problema de importância crescente em saúde pública. Está associado a complicações que comprometem a produtividade, a qualidade de vida e a sobrevida dos pacientes. Além disso, acarreta altos custos para seu controle metabólico e tratamento de suas complicações (SOCIEDADE BRASILEIRA SOBRE DIABETES, 2002). Sua incidência e prevalência estão aumentando, e hoje, o DM é considerado uma pandemia emergente (VAN DIEREN et al., 2010). A doença atinge cerca de 8% da população mundial e é a principal causa de cegueira adquirida e de amputações de membros inferiores (SOCIEDADE BRASILEIRA SOBRE DIABETES, 2002; MOXEY et al., 2011). Cerca de 26% dos pacientes que ingressam em programas de diálise são diabéticos. Os pacientes diabéticos representam cerca de 30% dos pacientes internados em unidades coronarianas intensivas com dor precordial (SOCIEDADE BRASILEIRA SOBRE DIABETES, 2002). No ano 2000, 171 milhões de pessoas foram diagnosticadas com DM no mundo e estima-se que em 2030 serão 366 milhões de pessoas. Para o Brasil a estimativa é de 4,6 milhões e em 2030 será de 11,30 milhões de pessoas diagnosticadas (WILD et al., 2004).

As complicações do DM a longo prazo incluem retinopatia com potencial perda da visão; nefropatia que pode levar a falência renal; neuropatia periférica com risco de ulcerações nos pés e amputações; e neuropatia autonômica causando sintomas gastrointestinais, genitourinários e cardiovasculares e disfunção sexual (*AMERICAN DIABETES ASSOCIATION*, 2010).

A dor neuropática é uma complicação do DM definida por sinais e sintomas de neuropatia em pacientes nos quais outras causas de disfunção do sistema nervoso periférico foram excluídas (BANSAL; KALITA; MISRA, 2006). Os pacientes portadores de DM tipo 1, bem como os portadores de DM tipo 2, podem desenvolver a neuropatia diabética, sendo que a prevalência da neuropatia aumenta conforme aumenta o tempo de diagnóstico do DM (PIRART, 1977). A neuropatia simétrica distal é a forma mais comum ocorrendo em 75% dos casos (BANSAL; KALITA; MISRA, 2006). Em um estudo brasileiro, a incidência de dor em população diabética foi de 20% (população com viés por ser a de um hospital de referência) (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2006).

A fisiopatologia da neuropatia diabética têm sido explicada por diferentes teorias. Na teoria metabólica, o aumento do sorbitol e a redução de mioinositol resultantes da hiperglicemia alteram a bomba de sódio e potássio com consequente alteração na despolarização e na dinâmica do fluxo axoplasmático. Na teoria vascular, temos que o comprometimento da microcirculação resultante da ativação da proteinaquinase C e da endotelina I pela hiperglicemia causa lesões das fibras nervosas. Por fim, a teoria auto-imune propõe a participação do sistema imune no desenvolvimento da neuropatia diabética (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2006).

O DM pode alterar a disposição cinética e o metabolismo dos fármacos em uso na clínica dependendo do tipo e do tempo de diagnóstico da doença, assim como do substrato investigado. O DM pode alterar a absorção gastrintestinal, a distribuição, o metabolismo e a excreção renal dos fármacos em uso na clínica. O tempo de trânsito intestinal pode estar diminuído e retardado em 20-30% dos pacientes diabéticos (IIDA et al., 2000). Tal efeito é resultante da hiperglicemia crônica que causa um prejuízo simpático e parasimpático dos nervos responsáveis pela motilidade intestinal. O DM também pode alterar a ligação dos fármacos às proteínas plasmáticas alterando as fases de distribuição e eliminação. As altas concentrações de ácidos graxos livres e proteínas glicadas podem alterar a extensão da ligação dos fármacos às proteínas plasmáticas em pacientes diabéticos (SCHWARTZ et al., 1996; LIPP et al., 1997; PRESTON et al., 2001). Um aumento na expressão de Mrp2 na barreira hematoencefálica é observado no diabetes experimental induzido por estreptozotocina, e a distribuição de fármacos substratos desse transportador no sistema nervoso central pode ser alterada em pacientes

diabéticos (HAWKINS et al., 2007). Os níveis dos transportadores de fármacos do sangue para o túbulo renal Oct2 encontram-se reduzidos enquanto os de Oat2 e dos transportadores de efluxo renal Mrp2, Mrp4 e Bcrp encontram-se induzidos nos rins de ratos com diabetes tipo 2 (NOWICKI et al., 2008). Dependendo da duração do DM ou do estágio da nefropatia diabética, a velocidade de filtração glomerular pode estar aumentada, normal ou diminuída. Além disso, anormalidades na secreção tubular renal tanto em pacientes com DM tipo 1 ou DM tipo 2, podem influenciar o *clearance* renal de uma variedade de fármacos (PRESTON; EPSTEIN, 1999).

Estudos clínicos e experimentais têm demonstrado que o DM pode alterar o metabolismo de fármacos através de alterações em diversas enzimas, dentre as quais do sistema citocromo P450 (CYP) provocando modificações individualizadas na atividade de suas isoformas (PRESTON; EPSTEIN, 1999; CHENG; MORGAN, 2001; PRESTON et al., 2001). O diabetes experimental induzido em ratos tende a suprimir a expressão do CYP1A2, CYP2C11, CYP2C13 e CYP3A2 e a induzir a expressão do CYP2A1, CYP2B1, CYP2C12, CYP4A1 e CYP2E1 (SCHENKMAN, 1991; IBER et al., 2001). Matzke et al. (2000) reportam que o metabolismo da antipirina é induzido em pacientes portadores de DM tipo 1, sugerindo aumento na atividade do CYP1A2. Hannon-Fletcher et al. (2001) reportam que a expressão do CYP2E1 é elevada em pacientes portadores de DM tipo 1.

O tratamento com insulina mostrou ser efetivo na normalização das alterações do CYP tanto em relação ao conteúdo proteico quanto ao RNAm (DONG et al., 1988; YAMAZOE et al., 1989). Utilizando ratos espontaneamente diabéticos, Favreau e Schenkman (1988) observaram que o metabolismo da anilina que encontrava-se aumentado foi normalizado nos animais que receberam insulina.

Estudos clínicos e experimentais do nosso grupo de pesquisa têm mostrado que o diabetes resulta em alterações no metabolismo enantiosseletivo dos fármacos quirais disponíveis na clínica como misturas racêmicas. Rocha, Coelho e Lanchote (2002) investigaram a estereosseletividade na farmacocinética da fluvastatina em ratos com diabetes experimental induzido por estreptozotocina. Os autores relatam redução na razão AUC<sub>(-)/(+)</sub> em razão do aumento no *clearance* do enantiômero (3S,5R)-(-)-fluvastatina nos animais diabéticos. Marques et al. (2002) investigaram a enantiosseletividade na disposição cinética da nisoldipina em pacientes hipertensos portadores de DM tipo 2 e empregaram a lidocaína como fármaco marcador do CYP3A4. Os dados obtidos sugerem que o DM inibe o CYP3A4 com consequente

redução no *clearance* de ambos os enantiômeros da lidocaína. O DM tipo 2 promoveu uma redução nas concentrações plasmáticas do (S)-(-)-fenoprofeno e consequente alteração na farmacodinâmica quando comparados a voluntários sadios. Os mesmos autores reportaram ausência de alterações em pacientes portadores de DM tipo 1 (POGGI et al., 2006). Gestantes hipertensas portadoras de diabetes gestacional apresentaram redução na glicuronidação do labetalol com maiores concentrações plasmáticas do isômero responsável pela atividade  $\alpha$ -bloqueadora do fármaco quando comparadas a gestantes hipertensas não diabéticas (CARVALHO et al., 2011).

Entre os fármacos aprovados pelo *US Food and Drug Administration (US FDA)* para o tratatamento da dor neuropática temos a gabapentina, pregabalina, duloxetina, *patchs* de lidocaína a 5 % e carbamazepina. Outros fármacos que demonstraram eficácia em estudos múltiplos randomizados controlados por placebo incluem opióides, antidepressivos tricíclicos, venlafaxina e tramadol (DOBECKI; SCHOCKET; WALLACE, 2006; O'CONNOR; DWORKIN, 2009; DWORKIN et al., 2010).

O tratamento de dor neuropática diabética ou não diabética recomendado pela Organização Mundial de Saúde segue um guia de 3 etapas: a) inicialmente o tratamento deve ser feito com agentes não opióides como paracetamol, ibuprofeno e ácido acetil salicílico; b) em caso de persistência da dor, inicia-se então o tratamento com agentes considerados opióides "fracos", como o tramadol e a codeína; c) finalmente, em caso de persistência da dor, é recomendado o uso de agentes opióides como a morfina e a buprenorfina. Como terapia farmacológica adjuvante, a OMS sugere que o uso de corticosteróides, antidepressivos tricíclicos ou anticonvulsivantes podem aumentar a eficácia analgésica de opióides (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1990; ROSE; KAM, 2002).

O tramadol é um analgésico de ação central eficaz na atenuação de dores agudas (dor pós traumática, renal, pós-operatória e cólicas biliares) e crônicas (GROND; SABLOTZKI, 2004). Vários autores demonstram sua eficácia na atenuação da dor neuropática em pacientes diabéticos (HARATI et al., 1998; HARATI et al., 2000; GROND; SABLOTZKI, 2004; ADRIAENSEN et al., 2005).

Godoy (2009) observou que o diabetes experimental induzido por estreptozotocina em ratos inibe preferencialmente o metabolismo do (-)-tramadol, mas também o do (+)-tramadol e que o tratamento com insulina reverte a inibição preferencial no metabolismo do (-)-tramadol. Em voluntários sadios, o metabolismo do (+)-tramadol em (+)-M1 é exclusivamente mediado pelo CYP2D6 enquanto o metabolismo do (-)-tramadol em (-)-M1 é menos influenciado pelo fenótipo do CYP2D6 (GARCÍA-QUETGLAS et al., 2007b). Isso sugere que o diabetes experimental inibe além do CYP2D outras isoformas do CYP relacionadas ao metabolismo do tramadol em M1.

Considerando o uso do tramadol no tratamento da dor neuropática em pacientes diabéticos, o presente estudo visa avaliar a influência do DM tipo 1 e do DM tipo 2 na disposição cinética, na fração livre e no metabolismo enantiosseletivos do tramadol em pacientes com dor neuropática tratados com dose única do fármaco sob a forma de racemato. Não há dados de estudos clínicos na literatura sobre a influência do DM na farmacocinética do tramadol como mistura enantiomérica ou como enantiômeros individuais. Considerando a formação dos metabólitos (+)-M1 e (-)-M1 mediada pela atividade geneticamente determinada do CYP2D6, foram incluídos na presente investigação somente pacientes fenotipados como metabolizadores extensivos para o CYP2D6.
## 2. OBJETIVOS

- Investigar a influência do DM tipo 1 descompensado na disposição cinética e metabolismo enantiosseletivos do tramadol administrado em regime de dose única, sob a forma racêmica, a pacientes fenotipados como metabolizadores extensivos para o CYP2D6.
- Investigar a influência do DM tipo 2 descompensado na disposição cinética e metabolismo enantiosseletivos do tramadol administrado em regime de dose única, sob a forma racêmica, a pacientes fenotipados como metabolizadores extensivos para o CYP2D6.

## 3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

#### 3.1 Casuística

Pacientes com DM tipo 1 ou com DM tipo 2 portadores de dor neuropática foram selecionados no Ambulatório de Endocrinologia do HCFMRP-USP e no Ambulatório de Diabetes do Centro de Saúde Escola – Sumarezinho da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP. Foram investigados 18 pacientes portadores de dor neuropática diabética, sendo 9 pacientes portadores de DM tipo 1 e 9 pacientes portadores de DM tipo 2. O diagnóstico de DM tipo 1 e DM tipo 2 foi realizado de acordo com a American Diabetes Association (2010) através dos seguintes critérios: valores de glicemia de jejum maiores ou iguais a 126 mg/dL (considerando o período de jejum de pelo menos 8 horas); valores de glicose plasmática de 2h maiores ou iguais a 200 mg/dL durante o teste de tolerância oral a glicose (utilizando carga de glicose anidra de 75 g dissolvida em água); ou valores de glicemia aleatoriamente avaliados maiores ou iguais a 200 mg/dL em pacientes com sinais clássicos de hiperglicemia ou crise hiperglicêmica. Os sinais clássicos de hiperglicemia incluem: poliúria, polidipsia, polifagia e perda de peso inexplicada. Na ausência de hiperglicemia aleatoriamente avaliada, cada um dos testes deve ser confirmado no dia seguinte. O tempo de diagnóstico do DM variou de 3 a 24 anos. As características dos pacientes incluídos nos Grupos DM tipo 1 e DM tipo 2 estão apresentadas nas Tabelas 9 e 10.

Foram incluídos pacientes adultos jovens (18-59 anos) de ambos os sexos e fenotipados como metabolizadores extensivos do CYP2D6 empregando metoprolol como fármaco marcador (dados apresentados no Capítulo 3). Foram incluídos apenas pacientes portadores de dor neuropática diabética auto-reportada acima de 4 na Escala de Estimativa Numérica de Dor de 0 a 10 (WILLIAMSON; HOGGART, 2005; TREEDE et al., 2008; GEBER et al., 2009) e considerados com níveis glicêmicos descompensados (hemoglobina glicada acima de 8 %) apesar do uso regular de insulina ou hipoglicemiantes orais. Entre os fármacos comumente associados nos Grupos DM tipo 1 e DM tipo 2 temos: insulinas [ação ultra-rápida, rápida (Aspart, Regular), intermediária (NPH) е prolongada (Lantus)], hipoglicemiantes orais (metformina e glibenclamida), antihipertensivos (captopril, enalapril e propranolol), hipolipemiantes (sinvastatina, atorvastatina e benzofibrato) e diuréticos (hidroclorotiazida).

Tabela 9 - C	aracterística	s dos pacien	tes investigs	ados nos Gru	pos DM tipo 1	(n=9) e DM ti	po 2 (n=9)				
Pacientes	÷.	Idade	IMC	Glicemia ª	Hemoglobina	Creatinina	Cl creatinina	Uréia	Albumin	AST	ALT
urupo uw tipo 1	Genero	(anos)	(kg/m²)	(mg/dL)	glicada (%)	(mg/dL)	(mL/min/1,73m <sup>2</sup> )	(mg/dL)	a (g/dL)	(U/L)	(N/L)
13	Σ	34	20,86	232	11,6	0,8	121,6	26	3,9	21	20
14	ш	20	22,77	193	9,0	0,6	120,6	30	4,5	47	38
15	ш	27	21,16	91	10,6	0,8	81,5	14	4,5	29	13
16	Σ	36	18,94	280	13,0	0,9	91,0	34	4,3	16	ი
17	Σ	19	22,12	636	14,6	1,1	89,2	25	4,2	47	51
18	Σ	36	20,82	215	9,8	1,5	59,5	39	3,4	19	16
19	ш	44	25,71	326	9,2	0,9	93,3	33	4,1	21	27
20	Σ	42	33,45	292	9,0	0,8	147,5	30	4,0	20	29
21	Σ	29	25,91	58	10,0	0,8	150,3	29	4,4	27	17
Grupo DM											
tipo 2											
22	ш	54	38,70	181	10,9	0,7	131,4	25	4,2	16	16
23	Ŀ	46	26,28	295	14,8	0,6	133,9	15	4,4	45	57
24	ш	52	38,71	229	8,0	0,7	160,2	26	4,4	29	30
25	Σ	56	24,67	51	12,5	1,6	65,2	55	4,4	15	13
26	LL.	47	38,35	319	13,2	0,7	139,0	33	4,1	27	41
27	ш	57	30,51	277	10,8	1,2	61,7	29	4,1	26	21
28	ш	59	31,52	207	15,7	0,8	93,5	25	4,0	16	14
29	Σ	41	33,35	148	9,0	1,0	134,1	31	4,3	39	45
30	ш	59	26,18	120	8,7	0,6	98,9	23	4,4	22	22
IMC: índice de ma	issa corpóreo; (	Cl creatinina: c	learance de cr	eatinina; AST:	aspartato aminoti	ransferase; ALT:	alanina aminotrans	sferase; <sup>a</sup> glic	emia de jejum;	Valores de	referência:
glicemia de jejum:	70 a 100mg/dL;	creatinina: 0,7	a 1,5 mg/dL; c	<i>learance</i> de cre	atinina:72-110 ml	_/min/1,73m <sup>2</sup> par	a mulheres; 94-140	mL/min/1,73	m <sup>2</sup> para homens	s. uréia: 10 a	50 mg/dL;
albumina: 3,5 a 4,6	3 g/dL; AST: até	38U/L; ALT: ati	é 41 U/L								

(II=3) C DIVI tipo 2	(II=3)			
Pacientes Grupo DM tipo 1	Tempo de diagnóstic o	Complicações associadas	Fármacos associado s	Dor neuropática
13	8 anos	-	4,5	Neuropatia diabética
14	13 anos	-	4,5	Neuropatia diabética
15	24 anos	RDP, HAS, Dislipidemia	4,5, 6, 7	Neuropatia diabética
16	23 anos	RDNP	4,5	Neuropatia diabética
17	8 anos	-	4,5	Neuropatia diabética
18	12 anos	Nefropatia clínica RDNP, HAS	1,4,5	Neuropatia diabética
19	24 anos	Dislipidemia	4,5,9	Neuropatia diabética
20	-	Nefropatia incipiente, HAS	4, 8,10, 11	Neuropatia diabética
21	20 anos	RDNP	12,13	Neuropatia diabética
Grupo DM tipo 2				
22	17 anos	Obesidade, dislipidemia	4,8,9,11	Neuropatia diabética
23	5 anos	Nefropatia clínica, dislipidemia, HAS	1,4,8,14	Neuropatia diabética
24	3 anos	HAS, obesidade	8, 11	Neuropatia diabética
25	8 anos	HAS, dislipidemia Nefropatia clínica	4,5,6,15,16	Neuropatia diabética
26	16 anos	Nefropatia incipiente, RDNP, HAS, dislipidemia, obesidade	4,8,9,16	Neuropatia diabética
27	11 anos	Nefropatia incipiente, obesidade, HAS, dislipidemia	4,5,7,8,11, 17	Neuropatia diabética
28	20 anos	Nefropatia incipiente, RDNP, HAS, dislipidemia, obesidade	4,5,7,8,11	Neuropatia diabética
29	6 anos	RDP, nefropatia incipiente, obesidade, dislipidemia, HAS	6,7,8,18	Neuropatia diabética
30	23 anos	RDP, dislipidemia	4,5,8	Neuropatia diabética

**Tabela 10** - Características da doença dos pacientes investigados nos Grupos DM tipo 1 (n=9) e DM tipo 2 (n=9)

RDP: retinopatia diabética proliferativa; HAS: hipertensão arterial sistêmica; RDNP: retinopatia diabética não proliferativa.1: Captopril; 4: insulina NPH; 5: insulina regular; 6: enalapril; 7: sinvastatina; 8: metformina; 9: atorvastatina; 10: insulina ultra-rapida; 11: hidroclorotiazida; 12: insulina lantus; 13: insulin aspart; 14: sulfato ferroso; 15: benzofibrato; 16: atenolol; 17: propranolol; 18: glibenclamida

Todos os pacientes incluídos no Grupo DM tipo 1 e DM tipo 2 apresentam como causa de dor neuropática a neuropatia diabética. São sinais atribuídos à dor neuropática induzida pelo DM: i) dor diária crônica moderada a grave nas extremidades inferiores por período superior a 1 mês, mas principalmente superior a 3 meses; ii) *score* de dor de pelo menos 2,5 cm, mas principalmente superior a 4 cm numa Escala Analógica Numérica de Dor de 10 cm; iii) *score* de pelo menos 4 numa escala numérica de 11 pontos (0 = sem dor, 10 = pior dor possível). Foram considerados critérios de exclusão de pacientes: evidência de outra etiologia para dor neuropática; presença de outro tipo de dor tão grave quanto a dor neuropática (ADRIAENSEN et al., 2005).

Foram excluídos pacientes portadores de dor nociceptiva somática, visceral ou autonômica associadas no período da pesquisa, bem como os portadores de obesidade mórbida (IMC>40), portadores de insuficiência cardíada congestiva, pacientes hipertensos graves, pacientes que sofreram infarto agudo do miocárdio ou acidente vascular cerebral há menos de 6 meses do período da investigação. Foram excluídos ainda os pacientes com história de doença pulmonar obstrutiva crônica e os pacientes que faziam uso crônico concomitante de analgésicos, inibidores do CYP2D6 e de indutores ou inibidores do CYP3A4. Foram excluídas pacientes gestantes e lactantes.

A função hepática dos pacientes investigados foi avaliada pela determinação laboratorial de AST, ALT e albumina sérica e a função renal foi avaliada pela uréia e creatinina séricas e *clearance* de creatinina. O *clearance* de creatinina foi determinado pela equação de Cockcroft e Gault: *clearance* de creatinina (mg/min) = {[140 – idade (anos)] x massa corpórea (kg) x 0,85 se mulher}/[72 x creatinina sérica (mg/dL)]. A alteração de função renal é definida pelo *clearance* de creatinina < 60 mL/min conforme o *Kidney Disease Outcome Quality Initiave Advisory Board* (NATIONAL KIDNEY FOUNDATION, 2002).

A internação dos pacientes selecionados para a pesquisa foi realizada na Unidade de Pesquisa Clínica do HCFMRP-USP durante toda a investigação. Os pacientes foram informados dos procedimentos a serem realizados no estudo, bem como dos possíveis riscos e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO C). Foi garantida a liberdade do paciente se recusar a participar ou retirar o seu consentimento em qualquer etapa da pesquisa, sem penalização alguma ou prejuízo ao seu cuidado e tratamento. No caso de intercorrências, como a apresentação de efeitos adversos, foi garantido o afastamento do paciente do protocolo de pesquisa e o tratamento apropriado no HCFMRP-USP. O protocolo clínico foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP (Ofício n° 1775/2008; ANEXO A) e pela Direção Acadêmica de Ensino e Pesquisa do Centro de Saúde Escola – Sumarezinho da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Protocolo n° 35/2009; ANEXO B).

#### 3.1.1 Cálculo do tamanho amostral

O cálculo do tamanho amostral foi obtido através do programa *Power and Sample Calculation* versão 2.1.30 (DUPONT; PLUMMER, 1997) com base na variabilidade da farmacocinética do tramadol previamente estudada em voluntários sadios (GARCÍA-QUETGLAS et al., 2007b). Neste estudo a média  $\pm$  desvio padrão da área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo (AUC) foi 0,898  $\pm$  0,323 mg.h.L<sup>-1</sup> para o (+)-tramadol (enantiômero com maior variabilidade na farmacocinética).

Nossa hipótese de trabalho é a de que o DM tipo 1 ou tipo 2 irá elevar em pelo menos 50% a AUC do (+)-tramadol quando comparada com o Grupo Controle. Para o cálculo do tamanho amostral fixou-se o nível de significância em 5%, poder de 0,80, diferença entre as médias de AUC do (+)-tramadol em 50%. A Figura 7 mostra a variação do poder do teste de acordo com o tamanho amostral. Como pode ser observada na Figura 2, a inclusão de 9 pacientes em cada grupo irá acarretar poder do teste acima de 80%, ou seja, serão incluídos 9 pacientes no Grupo Controle e 9 pacientes no Grupo DM tipo 1 e 9 pacientes no Grupo DM tipo 2.



Figura 7 - Estudo do tamanho amostral em relação ao poder de teste

#### 3.1.2 Protocolo clínico

Os pacientes incluídos nos Grupos DM tipo 1 (n=9) e DM tipo 2 (n=9) permaneceram na Enfermaria da Unidade de Pesquisa Clínica do HCFMRP – USP, durante todo o período da pesquisa para as colheitas de sangue e urina.

Os pacientes em estado de jejum de 10 horas receberam dose única oral de 100 mg de tramadol racêmico (Tramal<sup>®</sup>, Pfizer, Brasil) com 200 mL de água. A dieta padrão do hospital para pacientes diabéticos foi servida 2 horas após a administração do medicamento. As amostras de sangue seriadas foram colhidas em seringas heparinizadas (Liquemine<sup>®</sup> 5000 UI, Roche, Brasil) nos tempos 0; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2; 3; 4; 6; 8; 10; 12; 16 e 24 horas após a administração do tramadol racêmico. Os plasmas foram obtidos por centrifugação a 1800 g durante 10 minutos e estocados a -70° C até o momento da análise. Durante o período de internação hospitalar foram empregadas terapêuticas de eficácia previamente comprovadas: dieta, insulina e hipoglicemiantes orais (conforme indicações individualizadas).

#### 3.2 Métodos

#### 3.2.1 Análise enantiosseletiva do tramadol, M1 e M2 livre e total

A análise dos enantiômeros do tramadol, M1 e M2 foi realizada em sistema LC-MS/MS conforme descrito no **Capítulo 1**.

## 3.2.2 Análise farmacocinética

A disposição cinética dos enantiômeros do tramadol, M1 e M2 após administração oral nos pacientes dos Grupos DM tipo 1 e DM tipo 2 foi avaliada como descrito no **Capítulo 1** para os pacientes não diabéticos portadores de dor neuropática.

## 3.2.3 Análise estatística

O software GraphPad Instat (GraphPad Software, CA, EUA) e o software Origin versão 8.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, EUA) foram utilizados na análise estatística para o cálculo das medianas (percentis 25 e 75) e médias. O teste de Wilcoxon ( $p \le 0,05$ ) foi empregado para avaliar as razões enantioméricas (+)tramadol *vs* (-)-tramadol, (+)-M1 *vs* (-)-M1, (+)-M2 *vs* (-)-M2. Os pacientes portadores de dor neuropática não diabética, investigados no **Capítulo 1**, foram considerados Grupo Controle (n=12). Para comparação entre grupos foi empregado o teste de Kruskal-Wallis ( $p \le 0,05$ ) com pós-teste de Dunn.

#### 4. RESULTADOS

# 4.1 Farmacocinética dos enantiômeros do tramadol, M1 e M2 total nos pacientes do Grupo DM tipo 1

A Figura 8 mostra as curvas de concentração plasmática total *versus* tempo e a Tabela 11 apresenta os parâmetros farmacocinéticos dos enantiômeros do tramadol, M1 e M2 referentes aos pacientes do Grupo DM tipo 1 após administração oral de 100 mg de tramadol racêmico (n=9). Os dados estão apresentados como mediana na Figura 8 e como mediana (percentil 25 e 75) e média na Tabela 11. O teste de Wilcoxon (p<0,05) foi empregado para avaliar a diferença entre os enantiômeros.



Figura 8. Curvas de concentração plasmática total *versus* tempo dos enantiômeros do tramadol, M1 e M2 total em pacientes do Grupo DM tipo 1. Dados apresentados como mediana

	(+)-tramadol	(-)-tramadol	(+)-M1	(-)-M1	(+)-M2	(-)-M2
°-0	850,72	623,08 *	313,11	392,42	431,67	83,29 *
	(818,25-1204,76)	(582,42-935,79)	(146,38-425,53)	(288,81-566,37)	(114,54-543,88)	(33,77-90,27)
ניוואיוישיו	1054,7	822,66	305,82	478,96	572,88	100,94
¢	99,01	81,80 *	26,42	41,22	25,09	7,78 *
⊂ max	(77,29-125,00)	(64,17-106,15)	(14,58-33,86)	(28,67-52,55)	(10,57-31,49)	(4,17-12,05)
(III)/IIIL)	101,16	83,64	25,27	40,81	26,01	9,01
	2,35	2,15	2,21	2,44	3,80	2,23 *
max (A)	(1,36-2,70)	(1,43-2,44)	(1,64-2,68)	(1,47-3,42)	(1,89-4,89)	(1,61-4,37)
	2,28	2,08	2,25	2,60	3,61	2,77
	00,0	0,39				
(h)	(0,28-0,85) 0 63	(0,27-0,79) 0 51	•		·	·
	0,00	1.56				
. <sub>½</sub> α	() 78_2 75)	() 68-4 22)	I	1	1	1
(H	1 78	0,00-4,22)				
	6.27	5,-3 5,06				
א <sub>2</sub> א	(5 75-7 65)	(4 93-7 12)	I	ı	1	ı
(H	6.93	8,76				
4			0,40	0,39	0,86	0,46
1/2 L	·		(0.22-0.57)	(0.22-0.91)	(0.31-1.31)	(0.22-1.10)
(u			0.46	0.70	0.88	0.77
			6,80	5,55	8,31	4,85 *
72 10	ı	ı	(5,22-8,00)	(5,13-6,00)	(5,92-11,25)	(4,17-6,24)
1			7,34	6,16	9,94	5,28
21_/E	58,77	80,25				
(L/h)	(41,50-61,11)	(53,43-85,85)	ı	ı	ı	ı
	90',20 100 70	12,29				
/d/F	420,18	4/0,93				
(L)	(359,35-536,27) 453,38	(421,15-687,55) 611,60	ı	ı	I	I
		13	0	82	5,6	38
AUC <sup>2</sup> (+)/(-)	(1,00)	-1,37) 27	(0,54 0,0	-1,08) 84	(4,44- 5,0	5,86) )2

# 4.2 Farmacocinética dos enantiômeros do tramadol, M1 e M2 total nos pacientes do Grupo DM tipo 2

A Figura 9 mostra as curvas de concentração plasmática total *versus* tempo e a Tabela 12 apresenta os parâmetros farmacocinéticos dos enantiômeros do tramadol, M1 e M2 referentes aos pacientes do Grupo DM tipo 2 após administração oral de 100 mg de tramadol racêmico (n=9). Os dados foram expressos como mediana na Figura 9 e como mediana (percentil 25 e 75) e média na Tabela 12. O teste de Wilcoxon (p<0,05) foi empregado para avaliar a diferença entre enantiômeros.



Figura 9 - Curvas de concentração plasmática total versus tempo dos enantiômeros do tramadol, M1 e M2 total em pacientes do Grupo DM tipo 2. Dados apresentados como mediana

tramadol rac	cêmico. Os dados est	ão expressos como me	ediana (percentil 25 e	75) e média		
	(+)-tramadol	(-)-tramadol	(+)-M1	(-)-M1	(+)-M2	(-)-M2
	977,48	1222,90	538,65	459,48 *	436,15	74,34 *
(na.h/ml.)	(912,22-1432,28)	(870,79-2081,28)	(475,47-587,69)	(325,97-482,38)	(162,23-614,09)	(40,80-94,51)
(R)	1300,90	1595,00	595,06	406,75	398,55	68,67
ر	144,76	128,68	48,56	45,74	34,07	8,92 *
(max	(139,20-149,04)	(123,71-156,81)	(36,39-58,50)	(26,24-47,60)	(18,94-41,78)	(5,50-9,59)
(III)/IIIL/	151,46	155,13	47,78	38,94	29,23	8,09
	1,29	1,31	2,21	1,98 *	1,88	1,41 *
Lmax (h)	(1,21-1,81)	(1,15-1,96)	(1,4-2,91)	(1,19-2,22)	(1,56-2,27)	(1,36-2,07)
(11)	1,70	1,75	2,59	2,04	2,58	2,01
t, a	0,24	0,21				
(h)	(0,17-0,44)	(0,17-0,42)	I	ı	ı	I
	0,32	0,41				
t, a	0,84	0, 30				
(h)	(0,36-1,72)	(0,37-1,66)	ı			ı
	1,69	1,33				
t <sub>1</sub> ,B	/,54 (0,10,100)	1,30				
(h)	(6,16-11,23)	(6,09-16,58)	I	I	I	I
	14,50	31,60				
			0,41	0,28 *	0,26	0,19 *
(A)	I	I	(0,15-1,49)	(0,13-0,46)	(0,15-0,38)	(0,09-0,37)
(11)			0,70	0,36	0,59	0,37
			6,53	6,16	5,83	4,07 *
رام) (م)	·	I	(3,38-7,56)	(5,27-6,80)	(5,46-8,99)	(3,80-4,95)
(II)			7,42	6,75	7,11	4,58
ų C	51,15	40,89				
	(35,13-54,81)	(24,02-57,42)	ı	ı	ı	I
	45,81	40,58				
	384,20	446,82				
(L)	(382,28-400,39) 522 72	(392,59-512,65)	I	ı	ı	
	022,12	923,00		00		
AUC <sup>0</sup> (+)/(-)	0, (0,78	92 -0,96)	1,' (1,12-	z9 -1,54)	4,7	1 3,35)
	0	00	1,	45	5,5	-
AUC <sup>0-</sup> - área : - maia-vida da	sob a curva concentração distribuição: taga - maia-v	plasmática versus tempo; C ida da aliminacão: CI-/E _ c	m <sub>ax</sub> – concentração plasma Jearance total aparente Vid	ática máxima; t <sub>max</sub> – tempo l ME – volume de distribuicão	para alcançar C <sub>max</sub> ; t <sub>½</sub> a – m aparente * Teste de Wilco	eia-vida de absorção; t <sub>i%</sub> α von
<ul> <li>meia-vida de</li> </ul>	distribuição; t½β – meia-v	ida de eliminação; $CI_T/F - c$	<i>learance</i> total aparente. vo	1/F − volume de distribuiçao	aparente. * Teste de WIIco)	xon

## 4.3 Estudo da influência do DM tipo 1 e DM tipo 2 na disposição cinética e metabolismo enantiosseletivos do tramadol

As Figuras 10 e 11 apresentam os perfis farmacocinéticos do tramadol em função dos diferentes tempos de coleta para os pacientes do Grupo Controle (n=12), Grupo DM tipo 1 (n=9) e Grupo DM tipo 2 (n=9). Os dados estão apresentados como mediana.



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. Dados apresentados como mediana



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. Dados apresentados como mediana

As Figuras 12 e 13 apresentam os perfis farmacocinéticos do M1 em função dos diferentes tempos de coleta para os pacientes do Grupo Controle (n=12), Grupo DM tipo 1 (n=9) e Grupo DM tipo 2 (n=9). Os dados estão apresentados como mediana.



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. Dados apresentados como mediana



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. Dados apresentados como mediana

A Figura 14 apresenta os perfis farmacocinéticos do M2 em função dos diferentes tempos de coleta para os pacientes do Grupo Controle (n=12), Grupo DM tipo 1 (n=9) e Grupo DM tipo 2 (n=9). Os dados estão apresentados como mediana.



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. Dados apresentados como mediana

As Tabelas 13, 14 e 15 mostram os parâmetros farmacocinéticos dos enantiômeros do tramadol, M1 e M2 total, respectivamente, nos pacientes do Grupo Controle (n=12), Grupo DM tipo 1 (n=9) e Grupo DM tipo 2 (n=9). Os dados estão apresentados como mediana (percentil 25-75) e média. O teste de Kruskal-Wallis (p<0,05) com pós-teste de Dunn foi utilizado para a comparação entre os grupos.

		(+)-tramadol			(-)-tramadol	
	Controle	DM tipo 1	DM tipo 2	Controle	DM tipo 1	DM tipo 2
°-0 <b>011</b>	1311,8	850,72	977,48	1264,2	623,08	1222,90
	(1042,23-2166,57)	(818,25-1204,76)	(912,22-1432,28)	(851,51-1496,44)	(582,42-935,79)	(870,79-2081,28
lg.n/mL)	1655,8	1054,7	1300,90	1303,1	822,66	1595,00
ç	167,47	99,01 <sup>a</sup>	144,76	159,47	81,80 <sup>a</sup>	128,68 <sup>c</sup>
C max	(137,52-253,13)	(77,29-125,00)	(139,20-149,04)	(119,66-223,58)	(64,17-106,15)	(123,71-156,81)
ng/mL)	185,63	101,16	151,46	170,39	83,64	155,13
4	1,53	2,35	1,29	1,46	2,15	1,31
Lmax	(1,29-2,00)	(1,36-2,70)	(1,21-1,81)	(1,20-1,97)	(1,43-2,44)	(1,15-1,96)
(II)	1,60	2,28	1,70	1,52	2,08	1,75
(	0,34	0,56	0,24	0,36	0,39	0,21
	(0,16-0,5)	(0,28-0,85)	(0,17-0,44)	(0,2-0,44)	(0,27-0,79)	(0,17-0,42)
(u)	0,34	0,63	0.32	0.33	0,51	0,41
;	0.82	1.57	0,94	0.88	1,56	0,95
1 <sub>1/2</sub> 0	(0,42-1,82)	(0,78-2,75)	(0,36-1,72)	(0,44-1,92)	(0,68-4,22)	(0,37-1,66)
(u)	1,19	1,78	1,69	1,25	2,19	1,33
c •	7,61	6,27	7,54	7,09	5,96	7,30
	(6,55-9,11)	(5,75-7,65)	(6,16-11,23)	(6,25-8,88)	(4,93-7,12)	(6,09-16,58)
(u)	53,51	6,93	14,50	18,55	8,76	31,60
	38,31	58,77	51,15	39,87	80,25	40,89
	(23,81-48,29)	(41,50-61,11)	(35,13-54,81)	(33,42-58,76)	(53,43-85,85)	(24,02-57,42)
(L/U)	38,52	56,26	45,81	44,64	72,29	40,58
	357,26	420,78	384,20	368,43	478,93	446,82
	(286,68-509,11)	(359,35-536,27)	(382,28-400,39)	(264,07-506,27)	(421,15-687,55)	(392,59-512,65
1	1031,91	453,38	522,72	378,71	611,60	929,65
	Cor	ntrole	DM ti	ipo 1	DM ti	ipo 2
	L	,13	1,3	32	6'0	92°
JC <sup>0-"</sup> (+)/(-)	(1,00	)-1,37) 27	(1,24-	.1,35) 30	(0,78-	-0,96)
		, 21	1, 2	23	0,5	30

 

 Tabela 13 - Disposição cinética dos enantiômeros do tramadol total nos Grupos Controle (n=12), DM tipo 1 (n=9) e DM tipo 2 (n=9) - pacientes

 

		(+)-M1			(-)-M1	
	Controle	DM tipo 1	DM tipo 2	Controle	DM tipo 1	DM tipo 2
∞-0 <b>~</b> v	1246,6	313,11 <sup>a</sup>	538,65	998,91	392,42 <sup>a</sup>	459,48 <sup>b</sup>
	(621,18-1413,96)	(146,38-425,53)	(475,47-587,69)	(689,39-1293,81)	(288,81-566,37)	(325,97-482,38)
(R	1152,6	305,82 26.42ª	595,06 40 E6	1018,50 05 56	478,96	406,75 4 E 74b
Cmax	00,04 (62.54-110.48)	20,42 (14.58-33.86)	40,30 (36.39-58.50)	(69.07-103.68)	+1,22 (28.67-52.55)	43,74 (26.24-47.60)
(ng/mL)	85,73	25,27	47,78	84,70	40,81	38,94
	1,54	2,21	2,21	1,66	2,44	1,98
נmax אבאל	(1,28-2,06)	(1,64-2,68)	(1,4-2,91)	(1,31-2,17)	(1,47-3,42)	(1,19-2,22)
(11)	1,67	2,25	2,59	1,86	2,60	2,04
4	0,22	0,40	0,41	0,20	0,39	0,28
ا%) (۲/	(0,13-0,31)	(0,22-0,57)	(0,15-1,49)	(0,15-0,39)	(0,22-0,91)	(0,13-0,46)
(11)	0,23	0,46	0,70	0,40	0,70	0,36
	7,53	6,80	6,53	6,47	5,55	6,16
الم 1	(6,18-9,29)	(5,22-8,00)	(3,38-7,56)	(5,42-8,83)	(5,13-6,00)	(5,27-6,80)
(11)	8,28	7,34	7,42	6,94	6,16	6,75
	Con	trole	DM	1 tipo 1	DM ti	ipo 2
		18		0,82	1,2	
AUC <sup>0-</sup> "(+)/(-)	(0,90-	1,36)	(0,5	54-1,08)	(1,12-	-1,54)
	1,	15	1	0,84	1,1	45

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

		(+)-M2			(-)-M2	
I	Controle	DM tipo 1	DM tipo 2	Controle	DM tipo 1	DM tipo 2
°-0 <b>C</b>	402,28	431,67	436,15	80,92	83,29	74,34
	(198,76-728,43)	(114,54-543,88)	(162,23-614,09)	(47,09-104,52)	(33,77-90,27)	(40,80-94,51
.n/mL)	509,33	572,88	398,55	91,29	100,94	68,67
,	36,15	25,09	34,07	9,16	7,78	8,92
max	(16,12-52,82)	(10,57-31,49)	(18,94-41,78)	(4,63-13,45)	(4,17-12,05)	(5,50-9,59)
g/mL)	36,20	26,01	29,23	10,09	9,01	8,09
	2,12	3,80	1,88	1,53	2,23	1,41
[max	(1,57-3,03)	(1,89-4,89)	(1,56-2,27)	(1,25-2,14)	(1,61-4,37)	(1,36-2,07)
(u)	2,75	3,61	2,58	1,85	2,77	2,01
4	0,32	0,86	0,26	0,20	0,46	0,19
1/2	(0,21-0,75)	(0, 31 - 1, 31)	(0,15-0,38)	(0,13-0,44)	(0,22-1,10)	(0,09-0,37)
(u)	0,85	0,88	0,59	0,35	0,77	0,37
	6,50	8,31	5,83	5,51	4,85	4,07
L12	(5,66-7,96)	(5,92-11,25)	(5,46-8,99)	(4,26-6,37)	(4,17-6,24)	(3,80-4,95)
(II)	7,21	9,94	7,11	5,49	5,28	4,58
	Co	ntrole	DM	tipo 1	DM ti	tipo 2
		Vo		00		74
	1   !	,00		,00		
<b>C</b> <sup></sup> (+)/(-)	(3,7: 5	5-6,20) 5.28	(4,44	1-5,86) 02	(4,55- 5 <u>5</u>	-6,35) 51

**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 mo de tramadol racêmico. Os dados estão expressos como mediana (nercentil 25 e 75) e média

(A) 10 Grupo Controle - Grupo DM tipo 1 - Grupo DM tipo 1 Razão (+)-tramadol/(-)-tramadol 8 6 2 0 24 12 16 20 Tempo (h) 10 (B) Grupo Controle . Grupo DM tipo 1 Grupo DM tipo 2 8 Razão (+)-M1/(-)-M1 6 4 2 0 24 12 20 16 8 Tempo (h) (C) 10 8 Razão (+)-M2/(-)-M2 6 - Grupo Controle 2 Grupo DM tipo 1 Grupo DM tipo 2 0 ò 12 16 20 24 Tempo (h)

A Figura 15 apresenta as razões (+)/(-) obtidas em função dos tempos nos pacientes dos Grupos Controle (n=12), DM tipo 1 (n=9) e DM tipo 2 (n=9).

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). Dados apresentados como mediana

# 4.4 Fração livre dos enantiômeros do tramadol, M1 e M2 nos pacientes dos grupos DM tipo 1 e DM tipo 2.

As Tabelas 16 e 17 apresentam a fração livre dos enantiômeros do tramadol, M1 e M2 nos pacientes dos Grupos DM tipo 1 (n=9) e DM tipo 2 (n=9), respectivamente. O teste de Wilcoxon (p<0,05) foi empregado na comparação entre enantiômeros.

	1					
Pacientes	(+)-tramadol	(_)-tramadol	(+)_M1	(_)_M1	(+)-M2	(_)_M2
Grupo DM 1	(•)-trainador	(-)-(18118001	(,)-141 1	(-)-141 1	(')-1012	(-)-1012
13	0,69	0,65	0,43	0,34	0,42	0,53
14	0,90	0,97	0,59	0,47	0,52	0,49
15	0,45	0,88	1,00	0,29	0,43	0,50
16	0,54	0,58	0,25	0,18	0,20	0,23
17	0,93	1,00	0,61	0,32	0,42	0,57
18	0,86	0,94	0,73	0,37	0,29	0,18
19	0,88	1,00	0,47	0,62	0,36	0,34
20	0,97	1,00	0,85	1,00	0,63	0,34
21	0,91	1,00	0,48	0,55	0,28	0,27
Mediana	0,88	0,97*	0,59	0,37	0,42	0,34
Média	0,79	0,89	0,60	0,46	0,39	0,38
Percentil	0.60.0.01	0 99 1 00	0 47 0 72	0 22 0 55	0 20 0 42	0 27 0 50
25 – 75	0,09-0,91	0,00-1,00	0,47-0,73	0,32-0,33	0,29-0,43	0,27-0,50

**Tabela 16 -** Fração livre dos enantiômeros do tramadol, M1 e M2 nos pacientes do Grupo DM tipo 1 (n=9)

\* Teste de Wilcoxon, p<0,05 [(+)-tramadol vs (-)-tramadol; (+)-M1 vs (-)-M1; (+)-M2 vs (-)-M2]

Pacientes	(+)-tramadol	(-)-tramadol	(+)-M1	(-)-M1	(+)-M2	(-)-M2
Grupo Divi z						
22	0,52	0,54	0,34	0,37	0,23	0,20
23	0,72	0,71	0,35	0,31	0,36	0,43
24	0,76	0,85	0,18	0,24	0,45	0,53
25	0,45	0,42	0,24	0,34	0,26	0,26
26	0,68	0,53	0,27	0,48	0,54	0,59
27	0,51	0,44	0,18	0,31	0,19	0,28
28	0,49	0,53	0,28	0,34	0,18	0,17
29	0,43	0,47	0,22	0,31	0,14	0,16
30	0,70	0,60	0,31	0,53	0,65	0,79
Mediana	0,52	0,53	0,27	0,34*	0,26	0,28
Média	0,58	0,57	0,26	0,36	0,33	0,38
Percentil 25 – 75	0,49-0,70	0,47-0,60	0,22-0,31	0,31-0,37	0,19-0,45	0,20-0,53

**Tabela 17 -** Fração livre dos enantiômeros do tramadol, M1 e M2 nos pacientes do Grupo DM tipo 2 (n=9)

\* Teste de Wilcoxon, p<0,05 [(+)-tramadol vs (-)-tramadol; (+)-M1 vs (-)-M1; (+)-M2 vs (-)-M2]

# 4.5 Influência do DM tipo 1 e DM tipo 2 na fração livre dos enantiômeros do tramadol, M1 e M2.

A Tabela 18 e a Figura 16 mostra o estudo da influência do DM tipo 1 e DM tipo 2 na fração livre dos enantiômeros do tramadol, M1 e M2. Os dados estão apresentados como mediana (percentil 25 – 75) e média na Tabela 18 e mediana (percentil 25-75) na Figura 16. A comparação entre grupos foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis (p<0,05) com pós-teste de Dunn.

**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. Os dados estão expressos como mediana (percentil 25 e 75) e média

	Controle	DM tipo 1	DM tipo 2
(+)-tramadol	0,65 (0,37-0,68)	0,88 (0,69-0,91)	0,52 (0,49-0,70)
	0,59	0,79	0,58
(-)-tramadol	0,54 (0,43-0,70)	0,97ª (0,88-1,00)	0,53 <sup>c</sup> (0,47-0,60)
	0,57	0,89	0,57
(+)-M1	0,16 (0,12-0,22)	0,59ª (0,47-0,73)	0,27 <sup>c</sup> (0,22-0,31)
	0,18	0,60	0,26
(-)-M1	0,18 (0,14-0,21)	0,37 <sup>a</sup> (0,32-0,55)	0,34 <sup>b</sup> (0,31-0,37)
	0,17	0,46	0,36
(+)-M2	0,24 (0,11-0,33)	0,42 (0,29-0,43)	0,26 (0,19-0,45)
	0,25	0,39	0,33
(-)-M2	0,21(0,11-0,33)	0,35 (0,27-0,50)	0,28 (0,20-0,54)
	0,24	0,39	0,38

Teste de Kruskal-Wallis (p<0,05) com pós-teste de Dunn: <sup>a</sup>Controle *versus* DM tipo 1; <sup>b</sup>Controle *versus* DM tipo 2; <sup>c</sup>DM tipo 1 *versus* DM tipo 2



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). Pacientes tratados com 100 mg de tramadol racêmico. Os dados estão expressos como percentil 25 e 75 e mediana

#### 5. DISCUSSÃO

A influência de doenças na farmacocinética estereosseletiva dos medicamentos em uso na clínica ainda é pouco investigada para os fármacos quirais. No presente estudo, foi investigada pela primeira vez a influência do DM tipo 1 e tipo 2 na disposição cinética e metabolismo dos enantiômeros do tramadol. O presente estudo justifica-se em função de um estudo anterior do grupo ter observado que o diabetes induzido por estreptozotocina em ratos altera a farmacocinética do tramadol de maneira enantiosseletiva (GODOY, 2009).

Considerando a alta variabilidade da farmacocinética do tramadol e considerando que tal variabilidade é consequente principalmente do polimorfismo do CYP2D6 (GARCÍA-QUETGLAS et al. 2007b), o estudo da influência do DM tipo 1 e tipo 2 na disposição cinética e metabolismo do tramadol incluiu somente pacientes fenotipados como metabolizadores extensivos do CYP2D6 (dados apresentados no **Capítulo 3**).

Quando comparado ao Grupo Controle, o Grupo DM tipo 1 mostra redução no C<sub>max</sub> de ambos enantiômeros (+)-tramadol e (-)-tramadol de 40 e 50 %, respectivamente. O tempo para atingir o  $C_{max}$  ( $t_{max}$ ), entretanto, não apresenta diferença significativa quando comparado ao Grupo Controle (Figuras 10 e 11; Tabela 13). Os pacientes portadores de DM podem apresentar aumento ou redução no tempo de esvaziamento gástrico. O atraso no esvaziamento gástrico é a alteração mais comum com uma prevalência que varia de 30 a 50 % em pacientes portadores de DM tipo 1 (LIPP et al., 1997). Estudos demonstram que há uma relação inversa entre a velocidade de esvaziamento gástrico e os níveis glicêmicos, de forma que o esvaziamento é mais lento durante a hiperglicemia (HOROWITZ et al., 1996). Outro mecanismo proposto para o atraso no tempo de esvaziamento gástrico é a neuropatia do nervo vago (PRESTON; EPSTEIN, 1999). Considerando que o intestino delgado é o principal sítio de absorção de fármacos no trato gastrointestinal, o retardo no esvaziamento gástrico pode diminuir a velocidade de absorção e/ou a extensão da absorção (PRESTON; EPSTEIN, 1999), o que explica a redução no C<sub>max</sub> dos enantiômeros do tramadol observada no Grupo DM tipo 1 (Figuras 10 e 11; Tabela 13). Por outro lado, estudos demonstram que pacientes portadores de DM tipo 2 que não apresentam disfunções neuronais apresentam maior velocidade de esvaziamento gástrico quando comparados a pacientes não portadores de DM (SCHWARTZ et al., 1996; HOROWITZ et al., 1996). Os pacientes do Grupo DM tipo 2 não mostram alterações no  $C_{max}$  e  $t_{max}$  dos enantiômeros do tramadol em relação aos pacientes do Grupo Controle (Figuras 10 e 11; Tabela 13).

No presente estudo foram incluídos apenas pacientes com dor neuropática portadores ou não de DM, e ressaltamos que a dor neuropática nos pacientes investigados é considerada crônica. Prejuízo nos processos de absorção de analgésicos com conseguente perda da sua eficácia terapêutica são reportados em pacientes com dor aguda (JAMALI; KUNZ-DOBER, 1999; KULMATYCKI; JAMALI, 2007; JAMALI; AGHAZADEH-HABASHI, 2008). Pacientes sob efeito de dor aguda pós-cirurgia dentária apresentam redução de 2 a 3 vezes nas concentrações plasmáticas dos enantiômeros do ibuprofeno, bem como um aumento de 4 a 6 vezes no tempo para atingir a concentração máxima se comparados a pacientes tratados com ibuprofeno 1 semana antes da cirurgia (JAMALI; KUNZ-DOBER, 1999). Os autores relacionam como prováveis mecanismos: a ingesta nutricional prejudicada, o deslocamento do fluxo sanguíneo do trato gastrointestinal com consequente alteração na motilidade e secreção intestinal e a diminuição na motilidade intestinal provocada pela dor. Aghazadeh-Habashi; Jamali (2008) acreditam que a dor aguda suprime o nervo vago com consequente prejuízo na secreção e motilidade gastrointestinal. O Grupo Controle (CI/F: 23,8 - 48,3 L/h para o (+)-tramadol e 33,4 – 58,8 L/h para o (-)-tramadol) quando comparado aos dados de voluntários sadios disponíveis na literatura (CI/F: 0,54 L/kg/h para o (+)-tramadol e 0,67 L/kg/h para o (-)-tramadol) não mostram diferenças nos valores de *clearance* aparente (CI/F), inferindo que a dor crônica presente no Grupo Controle não altera a biodisponibilidade do tramadol (GARCIA-QUETGLAS et al., 2007b).

A disposição cinética de ambos os enantiômeros do tramadol, avaliada com base nos parâmetros  $t_{max}$ , AUC, CI<sub>T</sub>/F Vd/F e  $t_{1/2}\beta$ , não mostra diferenças com significância estatística entre os Grupos Controle e DM tipo 1 (Figuras 10 e 11; Tabela 13). Em ambos os grupos são observados maiores valores de C<sub>max</sub> e AUC para (+)-tramadol quando comparado ao (-)-tramadol (Figura 8; Tabela 11).

Por outro lado, os pacientes do Grupo DM tipo 2 mostram perda da enantiosseletividade nos parâmetros  $C_{max}$  e AUC, embora sem observação de diferenças nos parâmetros farmacocinéticos quando comparado aos Grupos Controle e DM tipo 1 (Figuras 9, 10 e 11; Tabelas 12 e 13). O Grupo DM tipo 2 é um grupo mais heterogêneo que o DM tipo 1 em função de nem todos os pacientes

fazerem uso de insulina (77 % fazem uso de insulina e 22 % não fazem uso de insulina), dos fármacos associados e da presença de outras comorbidades como a obesidade, dislipidemias e hipertensão.

Os dados obtidos com os pacientes portadores de DM não são comparáveis aos dados reportados por Godoy (2009) na investigação da influência do diabetes experimental na farmacocinética enantiosseletiva do tramadol em ratos. A autora relata acúmulo plasmático do enantiômero (+)-tramadol em relação ao (-)-tramadol à semelhança dos resultados reportados para os pacientes portadores de DM tipo 1. O diabetes experimental inibiu de maneira preferencial o metabolismo do (-)-tramadol, com relatos de aumento da AUC de aproximadamente 5 vezes para o (+)-tramadol e de 10 vezes para o (-)-tramadol, em relação ao Grupo Controle. Ressalta-se no entanto, que os pacientes do Grupo DM tipo 1 e a maioria dos pacientes do Grupo DM tipo 2 investigados no presente estudo faziam uso regular de insulina. Godoy (2009) também relata que o tratamento dos ratos com diabetes experimental com insulina até a observação de glicemia dentro dos valores da normalidade reverte as alterações relatadas na farmacocinética do tramadol. Outros estudos na literatura confirmam que a insulina reverte as alterações causadas pelo DM na atividade de isoformas do CYP (DONG et al., 1988; YAMAZOE et al., 1989).

Todos os pacientes investigados portadores de DM tipo 1 e DM tipo 2 mostram hemoglobina glicada com valores acima de 8%, portanto considerados com DM descompensado. A importância da hiperglicemia na atividade do CYP foi relatada por Borbás et al., (2006) com observação de que o conteúdo total de CYP, a atividade do CYP1A hepático assim como a atividade do CYP3A hepático correlacionam-se com os níveis de glicose no sangue de ratos com diabetes experimental. A glicação de proteínas circulantes como a albumina, a hemoglobina e a insulina, bem como a formação de produtos finais da glicação avançada, representados por um grupo heterogêneo de produtos guímicos resultantes da reação não enzimática entre açúcares e proteínas, lípides e/ou ácidos nucleicos implica em intermediários reativos que resultam no estresse oxidativo, complicações disfunção endotelial (NEGRE-SALVAYRE et microvaculares е al., 2009; KAWAHITO; KITAHATA; OSHITA, 2009). Os elevados níveis de corpos cetônicos também tem sido relacionados as alterações enzimáticas no DM (BARNETT; FLATT; IOANNIDES, 1990). Bellward et al. (1988) reportam que a indução enzimática do CYP bem como a hidroxilação hepática da anilina apresentam forte correlação com os níveis de corpos cetônicos na forma de β-hidroxibutirato plasmático em ratos espontaneamente diabéticos.

As concentrações plasmáticas do metabólito ativo (+)-M1 no Grupo DM tipo 1 são significavamente menores quando comparadas ao Grupo Controle, com redução de aproximadamente 70 % no  $C_{max}$  (Controle: 83,04 ng/mL; DM tipo 1: 26,42 ng/mL) e de aproximadamente 75 % na AUC<sup>0-∞</sup> (Controle: 1246,60 ng.h/mL; DM tipo 1: 313, 11 ng.h/mL; Figura 12; Tabela 14). Para o metabólito (-)-M1 há redução de 50% no  $C_{max}$  (Controle: 85,56 ng/mL; DM tipo 1: 41,22 ng/mL) e de 60 % na AUC<sup>0-∞</sup> (Controle 998,91 ng.h/mL; DM tipo 1: 392,42 ng.h/mL) quando comparado ao Grupo Controle (Figura 13; Tabela 14). Enquanto isso, os pacientes do Grupo DM tipo 2 mostram uma redução de aproximadamente 50 % nas concentrações plasmáticas do (-)-M1, mas não nas do (+)-M1 quando comparado ao Grupo Controle (Figuras 12 e 13; Tabela 14). De maneira contrária, em ratos com diabetes experimental, Godoy (2009) mostra aumento de 3 vezes nas concentrações plasmáticas do (-)-M1.

Os pacientes do Grupo DM tipo 2, apresentam disposição cinética enantiosseletiva dos enantiômeros do M1 com acúmulo plasmático do (+)-M1 e razão  $AUC_{(+)/(-)}$  de 1,29 (Figura 9; Tabela 12). A meia-vida de formação do (+)-M1 é significativamente maior que a do (-)-M1 (0,41 h e 0,28 h, respectivamente), bem como o tempo para atingir a concentração máxima (2,21 h e 1,98 h, respectivamente). Por outro lado, Godoy (2009) relata acúmulo plasmático do (-)-M1 em relação do (+)-M1 em ratos com diabetes experimental.

A formação do metabólito M1 nos microssomas humanos hepáticos é mediada pelo CYP2D6 e sua eliminação se dá por excreção renal ou ainda por reações de conjugação com o ácido glicurônico e sulfonatos (LINTZ et al., 1981; GROND; SABLOTZKI, 2004). Logo, as menores concentrações plasmáticas dos enantiômeros do M1 nos pacientes portadores de DM tipo 1 e DM tipo 2 sugerem que a doença inibe o CYP2D6 ou induz a UDP-glicuronosil-transferase (UGT).

A conjugação do M1 com o ácido glicurônico é enantiosseletiva, sendo que as isoformas UGT 1A7, UGT 1A8, UGT 1A9 e UGT 1A10 são responsáveis pela glicuronidação do (+)-M1, enquanto as isoformas UGT 2B15, e UGT 2B7 catalisam a conjugação de ambos enantiômeros do M1 (LEHTONEN et al., 2010). Estudos experimentais demonstram que o conteúdo hepático das UGTs encontra-se alterado em ratos com diabetes experimental induzido por aloxano e estreptozotocina (VEGA et al., 1986; VEGA et al., 1993), sendo que as isoformas UGT 1A1, UGT 2B7

encontram-se induzidas e a UGT 1A6 encontra-se inibida (VEGA et al., 1986). Um estudo envolvendo ratos com diabetes induzido por anticorpos anti-insulina mostrou uma redução na síntese de conjugados do ácido glicurônico (MÜLLER-OERLINGHAUSEN; HASSELBLATT; JAHNS, 1967). Por outro lado, um estudo realizado em ratos espontaneamente diabéticos demonstrou que os níveis protéicos da enzima UGT 1A1 encontram-se aumentados nos microssomas hepáticos (BRAUN et al., 1998). A indução da atividade da UGT é mediada pelos corpos cetônicos, bem como pelas alterações hormonais do diabetes (LALANI; BURCHELL, 1979; LALANI et al., 1980). A insulina parece aumentar a atividade da UDPglicuronosil-desidrogenase envolvida na restauração dos níveis de UDP-ácido glicurônico necessário às reações de conjugação em ratos diabéticos (MÜLLER-OERLINGHAUSEN; HASSELBLATT; JAHNS, 1967). Assim, a indução da atividade da isoforma da UGT 2B7 em ratos com diabetes experimental (VEGA et al., 1986) ou a indução da atividade da UDP-glicuronosil-desidrogenase pelo tratamento com insulina (MÜLLER-OERLINGHAUSEN; HASSELBLATT; JAHNS, 1967) parecem explicar a redução nas concentrações plasmáticas dos enantiômeros do M1 nos pacientes dos Grupos DM tipo 1 e DM tipo 2.

Com relação a formação do metabólito M2, sua disposiçao cinética é enantiosseletiva nos Grupos Controle (**Capítulo 1**), DM tipo 1 (Figura 8; Tabela 11) e DM tipo 2 (Figura 9; Tabela 12) com razões  $AUC_{(+/-)}$  de 4,80, 5,68 e 4,71, respectivamente. A enantiosseletividade na farmacocinética do M2, entretanto, não explica a eliminação preferencial do (-)-tramadol nos Grupos Controle e DM tipo 1. Os parâmetros farmacocinéticos AUC,  $C_{max}$ ,  $t_{max}$ ,  $t_{1/2}$ f e  $t_{1/2}$  do (+)-M2 e (-)-M2 foram bastante similares entre os três grupos investigados (Figura 14; Tabela 15) e também similares aos observados por García-Quetglas et al. (2007a) com razão  $AUC_{(+)/(-)}$  de 4,5 para o M2 após administração oral de tramadol racêmico a voluntários sadios. Godoy (2009) também não relata alterações na farmacocinética de ambos enantiômeros do M2 em ratos com diabetes experimental tratados ou não com insulina.

Os pacientes do Grupo DM tipo 1 apresentam um aumento da fração livre do (-)-tramadol quando comparados ao Grupo Controle (Controle: 54,38 % vs DM tipo 1: 97,07 %). O Grupo DM tipo 2 apresenta fração livre dos enantiômeros do tramadol semelhantes as do Grupo Controle. A fração livre dos enantiômeros do M1 nos pacientes do Grupo Controle é baixa e não enantiosseletiva, sendo 16,49 % para o

(+)-M1 e 18,21 % para o (-)-M1 (**Capítulo 1**). Quando comparados ao Grupo Controle, os pacientes do Grupo DM tipo 1 apresentam um aumento significativo da fração livre de 3,6 vezes para o metabólito ativo (+)-M1 e de 2 vezes para o (-)-M1. Já o Grupo DM tipo 2 apresentou aumento apenas na fração livre do (-)-M1 de aproximadamente 2 vezes (Tabela 18).

Estudos clínicos demonstram que o DM reduz a ligação às proteínas plasmáticas de vários fármacos, entre eles ácido valpróico (GATTI et al.; 1987; DOUCET et al., 1993), fenitoína (ADITHAN et al., 1991; DOUCET et al., 1993), diazepam (RUIZ-CABELLO; ERILL, 1984), carbamazepina (KOYAMA et al., 1997) entre outros. Entre os mecanismos relacionados a alteração na ligação de fármacos a proteínas plasmáticas em pacientes diabéticos, temos o aumento nos ácidos graxos livres no plasma que ligam-se as proteínas plasmáticas (GATTI et al., 1987; RUIZ-CABELLO; ERILL, 1984), bem como a glicação dessas proteínas (RUIZ-CABELLO; ERILL, 1984), bem como a glicação dessas proteínas (RUIZ-CABELLO; ERILL, 1984), bem como a glicação dessas proteínas (RUIZ-CABELLO; ERILL, 1984; KOYAMA et al., 1997).

A fração livre dos enantiômeros do M2 nos Grupos Controle, DM tipo 1 e DM tipo 2 varia de 20 a 40%, não é enantiosseletiva (Tabelas 16 e 17) e não existem diferenças significativas entre os grupos (Tabela 18).

Em conclusão, 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 3,6 vezes e a do (-)-M1 cerca de 2 vezes, em relação ao Grupo Controle. 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. Considerando que a concentração plasmática livre do metabólito ativo (+)-M1 permanece praticamente inalterada, provavelmente os pacientes portadores de DM tipo 1 e DM tipo 2 não apresentem prejuízo na atividade farmacológica mediada principalmente pelo M1 quando comparados aos pacientes do Grupo Controle. O estudo da influência do DM tipo 1 e tipo 2 na farmacocinética e metabolismo dos enantiômeros do tramadol ressalta a importância da análise da concentração plasmática livre enantiosseletiva em estudos que correlacionam a farmacocinética com a farmacodinâmica.

# Capítulo 3

Capítulo 3

Influência da farmacogenética na disposição cinética e metabolismo dos enantiômeros do tramadol em pacientes portadores de dor neuropática

## 1. INTRODUÇÃO

O tramadol é um fármaco eliminado principalmente por metabolismo oxidativo dependente de diferentes isoformas polimórficas do CYP. O metabolismo do tramadol dependente de NADPH resulta na formação dos metabólitos primários Odesmetiltramadol (M1) e N-desmetiltramadol (M2) e dos metabólitos secundários N.N-didesmetiltramadol (M3), N,N,O-tridesmetiltramadol (M4) N.Oе didesmetiltramadol (M5). Múltiplas isoformas do CYP estão envolvidas no metabolismo do tramadol a M1 e M2, sendo o CYP2D6 o principal responsável pela formação do M1 e o CYP2B6 e CYP3A4 na formação do M2. As isoformas CYP2B6 e CYP2C19 também participam, ainda que em menor extensão, da formação do M1 enquanto as isoformas CYP2C9, CYP2C19 e CYP2D6 também participam da formação do M2 (SUBRAHMANYAM et al. 2001). A eliminação do M2 se dá por Odesmetilação, mediada pelo CYP2D6, formando os metabólitos M4 e M5 (GARCÍA-QUETGLAS et al., 2007b). A conjugação dos metabólitos O-desmetilados com ácido glicurônico e sulfonatos mediada pela enzima UDP-glicuronosil-transferase (UGT) é outra importante via do metabolismo (Figura 1). A eliminação do tramadol e seus metabólitos se dá via excreção renal (aproximadamente 90% da dose), sendo que 30% correspondem a excreção do fármaco inalterado (LINTZ et al., 1981; SUBRAHMANYAM et al., 2001).

O efeito analgésico do tramadol é dependente principalmente da sua bioativação pelo CYP2D6 ao metabólito M1, agonista do receptor μ-opióide. Os efeitos clínicos decorrentes do polimorfismo do CYP2D6 foram observados tanto em voluntários sadios como em pacientes tratados com tramadol racêmico, sendo que as concentrações plasmáticas de ambos enantiômeros do tramadol são 2 a 3 vezes maiores em metabolizadores lentos (PM) quando comparados aos metabolizadores extensivos (EM) (POULSEN et al., 1996; FLIEGERT; KURTH; GOHLER, et al., 2005; ENGGAARD et al., 2006; STAMER et al., 2007; GARCÍA-QUETGLAS et al., 2007b; KIRCHHEINER et al., 2008; LI et al., 2010). Voluntários sadios tratados com paroxetina, um inibidor da atividade do CYP2D6, mostram diminuição do efeito analgésico do tramadol em modelos experimentais de dor em função da incapacidade de formação do metabólito M1 (LAUGESEN et al., 2005).

O CYP2D6 está envolvido com o metabolismo oxidativo de aproximadamente 25% dos fármacos comumente prescritos na clínica. É também a principal enzima

responsável pela variabilidade interinvidual na farmacocinética do tramadol (GARCÍA-QUETGLAS et al. 2007b). Tal variabilidade é resultante principalmente de polimorfismos genéticos, sendo que aproximadamente 80 variantes alélicas foram descritas até o momento (ZANGER; RAIMUNDO; EICHELBAUM, 2004; CYP alleles Nomenclature Committee, 2011; <u>http://www.cypalleles.ki.se/</u>).

A debrisoquina, o dextrometorfano, a esparteína e o metoprolol são fármacos marcadores da atividade in vivo do CYP2D6 (TUCKER et al., 1977; ZANGER; RAIMUNDO; EICHELBAUM, 2004) e o tramadol tem sido considerado um novo biomarcador (PEDERSEN; DAMKIER; BROSEN, 2005). A eliminação da debrisoquina no homem se dá principalmente através da formação da 4hidroxidebrisoquina dependente do CYP2D6 (TUCKER et al., 1977). O metoprolol tem sido proposto como uma alternativa adequada para fenotipagem da atividade do CYP2D6 em países como o Brasil onde a debrisoquina não é registrada nos órgãos competentes para a sua comercialização (MCGOURTY et al., 1985). Estudos anteriores mostram forte correlação entre a a-hidroxilação do metoprolol e a 4hidroxilação da debrisoquina, e entre a razão metoprolol/α-hidroximetoprolol e debrisoquina/hidroxidebrisoquina na urina de 0-8h (r=0,81, p<0,001). Num estudo populacional em 143 pacientes hipertensos, a razão metabólica metoprolol/αhidroximetoprolol na urina menor ou igual a 12,6 definiu os EM e a razão maior que 12,6 definiu os PM, sendo que 131 pacientes foram fenotipados como EM e 12 pacientes como PM (MCGOURTY et al., 1985; HORAI et al., 1989; SOHN et al., 1991).

Estudos *in vitro* demonstram que o CYP2B6 é a enzima de maior afinidade na formação do M2. No entanto, a formação do metabólito M2 também pode ser mediada pelo CYP3A4, e em razão de sua alta atividade no fígado, o CYP3A4 passa a contribuir substancialmente para a formação do M2, principalmente em indivíduos com níveis reduzidos ou ausentes de CYP2B6 (SUBRAHMANYAM et al., 2001). Pacientes que expressam polimorfismo de base única (SNP- *Single Nucleotide Polymorphism*) presente no exon 4 do gene que codifica o CYP2B6, apresentam alterações no metabolismo de fármacos em relação aos portadores da variante selvagem (\*1) (XIE et al., 2005; SAITOH et al., 2007). Este polimorfismo de base única leva à substituição do aminoácido glicina pela histidina na posição 172 da proteína e está presente nas variantes alélicas \*6, \*7 e \*9. Trata-se de uma das mutações mais comuns do gene CYP2B6, com freqüência variando de 15,9% a

46,9% (KLEIN et al., 2005; ARIYOSHI et al., 2001; JACOB et al., 2004; LANG et al., 2001; XIE et al., 2003).

A atividade *in vivo* do CYP3A pode ser avaliada empregando o midazolam como fármaco marcador. O metabolismo hepático é o predominante com formação principalmente do metabólito 1-hidroximidazolam. Considerando que uma quantidade significativa do CYP3A é encontrada nos enterócitos do intestino delgado e nos hepatócitos, na administração por via oral, o midazolam é hidroxilado pelo CYP3A hepático e intestinal. O *clearance* total do midazolam administrado por via oral reflete a atividade do CYP3A4/5 hepático e intestinal (STREETMAN; BERTINO; NAFZIGER, 2000; LAMBA et al., 2002). O *clearance* do midazolam oral foi investigado em 148 voluntários, sendo que 84% deles apresentaram valores compreendidos entre 10 e 40 mL/min/kg. A razão de concentrações plasmáticas 1-hidroximidazolam/midazolam, determinada 30 min após a administração IV de midazolam apresenta boa correlação (r=0,87, p<0,001) com o conteúdo do CYP3A hepático (LIN et al., 2001; LAMBA et al., 2002).

Tendo em vista que o metabolismo oxidativo do tramadol é a sua principal via de eliminação, o presente estudo tem por objetivo avaliar a correlação entre biomarcadores da atividade enzimática *in vivo* do CYP2D6, e CYP3A4, bem como do genótipo do CYP2B6, com a farmacocinética enantiosseletiva do tramadol em pacientes portadores de dor neuropática. Os fenótipos do CYP2D6 e do CYP3A4 foram avaliados empregando o metoprolol e o midazolam como fármacos marcadores, respectivamente.
# 2. **OBJETIVO**

- Fenotipar o CYP2D6 em pacientes portadores de dor neuropática empregando o metoprolol como fármaco marcador.
- Fenotipar o CYP3A em pacientes portadores de dor neuropática empregando o midazolam administrado por via oral como fármaco marcador.
- Genotipar o CYP2B6 em pacientes portadores de dor neuropática.
- Descrever a influência da farmacogenética na disposição cinética e metabolismo dos enantiômeros do tramadol em pacientes portadores de dor neuropática.

# 3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

#### 3.1 Casuística e protocolo clínico

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Processo n° 1775/2008 – ANEXO A) e pela Direção Acadêmica de Ensino e Pesquisa do Centro de Saúde Escola - Sumarezinho da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Protocolo N°.35/2009 – ANEXO B). Foram investigados 30 pacientes portadores de dor neuropática auto-reportada acima de 4 na Escala de Estimativa Numérica de Dor (0-10) (WILLIAMSON; HOGGART, 2005; TREEDE et al., 2008; GEBER et al., 2009), sendo 12 pacientes do Grupo Controle, 9 portadores de DM tipo 1 (Grupo DM tipo 1) e 9 portadores de DM tipo 2 (Grupo DM tipo 2), adultos (31-59 anos), de ambos os sexos, com IMC variando de 17,16 a 38,90 kg/m<sup>2</sup>. Os pacientes receberam explicação detalhada dos procedimentos e foram incluídos no estudo após a obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO C).

No primeiro dia da investigação propriamente dita, os pacientes foram tratados após jejum de 10 horas com dose única de 100 mg de tramadol racêmico, conforme o protocolo clínico descrito no **Capítulo 1**.

No segundo dia da investigação, logo após a última amostra de sangue para análise do tramadol, os pacientes receberam uma dose única oral de 15 mg de midazolam (Dormonid<sup>®</sup>, Roche, Rio de Janeiro, Brasil) e dose única oral de 100 mg de metoprolol (Lopressor<sup>®</sup>, Novartis, Brasil) acompanhados de 200 mL de água. O café da manhã foi servido 2 h após a administração dos medicamentos. Amostras de sangue seriadas (6 mL) foram colhidas nos tempos 0,25; 0,5; 1; 2; 3; 4; 5 e 6 horas após a administração, com seringas heparinizadas (Liquemine<sup>®</sup> 5000 UI, Roche, Brasil). As amostras de plasma foram obtidas através de centrifugação do sangue (1800 *g* x 10 min) e armazenadas a -70° C até o momento da análise. Para investigação do fenótipo oxidativo do CYP2D6, a urina dos pacientes foi coletada durante 8 horas após a administração do fármaco. O volume total de urina foi medido e uma alíquota de 10 mL armazenada a -70° C até a análise. Para a investigação do genótipo do CYP2B6 foram coletados 10 mL de sangue, em tubos contendo EDTA como anticoagulante.

#### 3.2 Análise do metoprolol e α-hidroximetoprolol em urina e plasma

A análise em plasma do metoprolol e α-hidroximetoprolol foi realizada com base em um estudo anterior do grupo de pesquisa (SILVA, 2008). A análise em urina foi desenvolvida com pequenas modificações em relação a análise em plasma.

#### 3.2.1 Soluções padrão e reagentes

Para análise em urina, as soluções estoque de metoprolol (tartarato de metoprolol 97%, Sigma, St.Louis, MO, EUA) e  $\alpha$ -hidroximetoprolol (Toronto Research Chemicals, Inc, Toronto, Canadá) foram preparadas em metanol nas concentrações de 1,0 mg/mL e 0,4 mg/mL, respectivamente. As soluções de uso foram preparadas nas concentrações 0,4, 1, 2, 10, 16, 20 e 40 µg de metoprolol/mL de metanol e 0,2, 0,4, 1, 2, 10, 16 e 20 µg de  $\alpha$ -hidroximetoprolol/mL de metanol. Para a análise em plasma, as soluções estoque de metoprolol e  $\alpha$ -hidroximetoprolol foram preparadas na concentração de 100 µg/mL. As soluções de uso foram preparadas a partir da solução estoque nas concentrações de 0,4, 0,8, 1, 2, 4 e 10 µg/mL tanto para o metoprolol como para o  $\alpha$ -hidroximetoprolol. Todas as soluções foram armazenadas a -20° C.

O cloreto de sódio (Merck, Darmstad, Alemanha) e a solução de hidróxido de sódio 1M foram lavados duas vezes com éter diisopropílico:diclorometano 1:1 (v/v). Os solventes empregados nos procedimentos de extração e como fase móvel foram grau HPLC. O metanol foi obtido da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). A acetonitrila, o diclorometano e o éter diisopropílico foram obtidos da Tedia (Fairfield, OH, EUA).

O tampão fosfato 0,05 M pH 3,5 foi preparado a partir de soluções 0,05 M de ácido ortofosfórico (grau P.A.; Merck, Darmstad, Alemanha) e fosfato de potássio monobásico (grau P.A.; F.Maia, Cotia, Brasil).

#### 3.2.2 Análise cromatográfica

As análises do metoprolol e α-hidroximetoprolol em urina e plasma foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência empregando o cromatógrafo Shimadzu (Kyoto, Japão) constituído por bomba LC-10 AD, auto-injetor SIL-10ADVP

Shimadzu e detector de fluorescência RF-10AXL Shimadzu, operando nos comprimentos de onda de 229 nm (excitação) e 298 nm (emissão).

O metoprolol e  $\alpha$ -hidroximetoprolol foram separados em coluna de fase reversa LiChrospher<sup>®</sup> 60 RP-select B (5 µm, 125 mm x 4 mm; Merck, Darmstad, Alemanha) protegida por pré-coluna LiChrospher<sup>®</sup> 100 RP-18 (Merck, Darmstad, Alemanha) e fase móvel constituída por mistura de tampão fosfato 0,05 M pH 3,5:acetonitrila (1:1, v/v) em fluxo de 1 mL/min.

#### 3.2.3 Preparo das amostras

Alíquotas de 100  $\mu$ L de urina foram alcalinizadas com 25  $\mu$ L de solução aquosa de hidróxido de sódio 1 M, adicionadas de 10 mg de cloreto de sódio, e extraídas com 2 mL da solução diclorometano:éter diisopropílico (1:1, v/v) durante 30 min em agitador horizontal (220 ± 10 ciclos/min). As amostras foram centrifugadas a 1800 *g* durante 10 min e as fases orgânicas (1,5 mL) concentradas em evaporador rotacional a vácuo (Christ, Osterode am Harz, Alemanha). Os resíduos foram retomados em 200  $\mu$ L de fase móvel e 20  $\mu$ L foram submetidos à análise cromatográfica (Figura 17).

Amostras de plasma (1000  $\mu$ L) foram adicionadas de 250  $\mu$ L solução de hidróxido de sódio 1 M, 100 mg de cloreto de sódio e extraídas com 4 mL de solução de diclorometano:éter diisopropílico (1:1, v/v) durante 30 min. Após centrifugação a 1800 *g* durante 10 min, as fases orgânicas (3,5 mL) foram concentradas em evaporador rotacional à vacuo. Os resíduos foram retomados em 150  $\mu$ L de fase móvel e 100  $\mu$ L foram submetidos à análise cromatográfica (Figura 17).





#### 3.2.4 Validação do método analítico

O método de análise do metoprolol e α-hidroximetoprolol em urina foi desenvolvido e validado conforme as recomendações da ANVISA (Resolução n° 899, 2003; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003).

#### 3.2.4.1 Curva de calibração/linearidade

As curvas de calibração foram construídas com alíquotas de 100  $\mu$ L de amostras de urina branco (obtidas de voluntários sadios que não faziam uso de medicamentos) enriquecidas de 50  $\mu$ L de solução padrão. Foram construídas curvas de calibração nos intervalos de 0,2-20,0  $\mu$ g de metoprolol/mL e 0,1 – 10  $\mu$ g de  $\alpha$ -hidroximetoprolol/mL, respectivamente.

Os coeficientes de correlação linear foram obtidos a partir da altura dos picos plotados contra as respectivas concentrações plasmáticas.

#### 3.2.4.2 Limite inferior de quantificação

O limite inferior de quantificação foi definido como a menor concentração do metoprolol e α-hidroximetoprolol analisada com coeficiente de variação e porcentagem de inexatidão iguais ou inferiores a 20%. Foram analisadas alíquotas de urina branco enriquecidas com metoprolol e α-hidroximetoprolol em concentrações decrescentes àquelas empregadas na construção das curvas de calibração, em quintuplicatas.

#### 3.2.4.3 Recuperação

A eficiência do procedimento de extração foi avaliada através da razão de áreas das amostras extraídas conforme o procedimento descrito no item 3.3.3 e as áreas obtidas de soluções padrão não submetidas ao processo de extração. Amostras de urina branco foram enriquecidas nas concentrações de 0,6, 8 e 16  $\mu$ g de metoprolol/mL de urina e 0,2, 4 e 8  $\mu$ g de  $\alpha$ -hidroximetoprolol/mL de urina e analisadas em quintuplicatas.

#### 3.2.4.4 Precisão e exatidão

A precisão e a exatidão do método foram estudadas através de avaliações intra e inter-ensaios. Amostras de urina branco foram enriquecidas com metoprolol e  $\alpha$ -hidroximetoprolol nas concentrações 0,6, 8 e 16 µg de metoprolol/mL de urina e 0,2, 4 e 8 µg de  $\alpha$ -hidroximetoprolol/mL de urina. As soluções foram aliquotadas e armazenadas a -20°C.

Para a avaliação da precisão e exatidão intra-ensaio foram analisadas 5 alíquotas de cada amostra através de uma única corrida analítica, ou seja, através de uma única curva de calibração. A precisão e a exatidão inter-ensaios foram avaliadas através da análise em quintuplicata em 5 ensaios consecutivos.

Os ensaios de precisão intra e inter-ensaios foram avaliados através do cálculo do coeficiente de variação dos resultados obtidos. Um método é referido preciso quando o coeficiente de variação é igual ou inferior a 15%. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente. A exatidão intra e inter-ensaios pode ser expressa como porcentagem de inexatidão, conforme a equação:

# Inexatidão (%) = concentração experimental – concentração teórica x 100 concentração teórica

#### 3.2.4.5 Estabilidade

A estabilidade das amostras foi verificada nas modalidades: curta duração, após 3 ciclos de congelamento e descongelamento e longa duração. Amostras de urina foram enriquecidas com soluções padrão nas concentrações de 0,6 e 16  $\mu$ g de metoprolol/mL urina e 0,2 e 8  $\mu$ g de  $\alpha$ -hidroximetoprolol/mL de urina e foram avaliadas em quintuplicatas. Para verificar a estabilidade após ciclo de congelamento e descongelamento as amostras foram congeladas a -20° C e após 24 horas foram descongeladas e congeladas novamente. Este ciclo foi repetido por mais 2 vezes e as amostras foram analisadas após o terceiro ciclo.

Para verificar a estabilidade de curta duração, as amostras foram mantidas durante 12 h à temperatura ambiente (23° C) e foram posteriormente analisadas. A

avaliação da estabilidade de longa duração foi realizada após armazenamento das amostras durante 100 dias a – 20°C.

Os resultados dos testes de estabilidade foram comparados com os resultados de amostras recém-preparadas e analisados pelo teste t de Student (p<0,05).

#### 3.3 Análise do midazolam em plasma

A análise do midazolam em plasma humano foi realizada por LC-MS/MS, de acordo com o método descrito por Jabor et al., 2005. Alíquotas de 1000  $\mu$ L de plasma foram adicionadas de 25  $\mu$ L da solução de padrão interno (clobazam 0,1  $\mu$ g/mL, em metanol) e alcalinizadas com 100  $\mu$ L de hidróxido de sódio 0,1 M. A extração foi realizada com 4 mL da mistura de tolueno-álcool isoamílico (100:1, v/v) em agitador mecânico horizontal durante 30 min. Após centrifugação a 2000 x *g*, por 5 min, as fases orgânicas foram separadas e evaporadas até a secura. Os resíduos foram dissolvidos em 50  $\mu$ L de uma solução de acetonitrila-acetato de amônio 10 mmol/L (50:50, v/v).

A separação do midazolam e do padrão interno foi realizada em coluna de fase reversa Purospher<sup>®</sup> RP 18 (150 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula 5 µm), précoluna LiChrospher<sup>®</sup> 100 RP 18-e (4 mm x 4 mm) e fase móvel constituída por uma mistura de acetonitrila:acetato de amônio 10 mmol/L (50:50 v/v) num fluxo de 0,7 mL/min. A detecção foi realizada no espectrômetro de massas Quattro Micro LC tripo quadrupolo (Micromass, Manchester, UK), utilizando interface de eletronebulização, modo de ionização positivo. O fluxo proveniente do cromatógrafo líquido foi dividido, de forma que aproximadamente 200 µL/min foram direcionados ao espectrômetro de massas. A temperatura da fonte foi mantida em 120° C e a de dessolvatação em 275° C e a voltagem do capilar foi de 3 kV. O nitrogênio foi empregado como gás nebulizador num fluxo de 415 L/h. O argônio foi utilizado como gás de colisão em uma pressão de 2,7 x 10<sup>-3</sup> mbar.

Foram monitoradas as transições 301>259 para o midazolam e 326>291 para o padrão interno. A aquisição de dados e quantificação das amostras foram realizadas utilizando o programa MassLynx, versão 4.1 (Micromass, Manchester, Reino Unido). O método foi linear no intervalo de 0,1 a 100 ng/mL de plasma. Os coeficientes de variação obtidos no estudo da precisão e a porcentagem de inexatidão foram inferiores a 15%.

#### 3.4 Análise das variantes alélicas do CYP2B6

O genótipo do CYP2B6 foi realizado no Laboratório de Nefrologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. O DNA foi extraído da camada leucocitária do sangue através da técnica de *salting out* (MILLER; DYKES, POLESKY, 1988).

O polimorfismo de base única 516G>T presente no exon 4 do gene CYP2B6 (cromossomo 19) foi avaliado nos pacientes portadores de dor neuropática (n=30). Os genótipos foram determinados através da técnica RFLP-PCR [*Restriction Fragment Lenght Polymorphism – Polimerase Chain Reaction* (Reação da Cadeia pela Polimerase – PCR)] seguida de digestão por enzimas de restrição. Foram utilizados os primers R 5'-AAC TGT ACT CAC TCC CAG AGT-3' e F 3'-CGC AGA CAT GTG AAG AAT CAG-5', conforme descrito por Jacob et al. (2004). A reação de PCR foi desenvolvida em um volume final de 25 µL contendo 2 ng de DNA genômico, 0,4 µM de cada primer, 2 mM de deoxinucleotídeos trifosfato, 0,1 U de Taq polimerase (LGC Biotecnologia, Cotia, Brasil). A termociclagem consistiu de 35 ciclos de 30 segundos a 94° C, 30 segundos a 52,3° C e 60 segundos a 72° C, seguidos de uma extensão final de 3 minutos a 72° C.

Os produtos amplificados foram digeridos com a enzima de restrição Bsrl (Fermentas, Vilnius, Lituânia), durante 16 h a 65° C, produzindo fragmentos de 267 bp, 236 bp e 176 bp no caso da presença da variante polimórfica (alelo T) ou 503 bp e 176 bp no caso do alelo selvagem (alelo G). Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 3 % e visualizados após a adição de brometo de etídio, sob luz UV. O alelo selvagem G e a variante alélica T foram identificados a partir do perfil das bandas reveladas, conforme demonstrado na Figura 18.



Figura 18 - Perfil das bandas na análise das variantes alélicas do CYP2B6

#### 3.5 Análise farmacocinética

# 3.5.1 Avaliação da atividade *in vivo* do CYP2D6 empregando metoprolol como marcador

A quantidade excretada (Ae) de metoprolol inalterado e de  $\alpha$ -hidroximetoprolol no intervalo de coleta de urina (0-8 h) foi obtida multiplicando-se a concentração urinária (C<sub>u</sub>) pelo volume de urina no intervalo de coleta (V<sub>u</sub>). A razão metabólica urinária (MR<sub>urina</sub>) foi calculada dividindo-se a Ae de metoprolol inalterado pela Ae de  $\alpha$ -hidroximetoprolol no intervalo de tempo de 0-8 h (MR<sub>urina</sub> = Ae metoprolol/Ae  $\alpha$ hidroximetoprolol). Quando a MR<sub>urina</sub> metoprolol/ $\alpha$ -hidroximetoprolol na urina de 0-8h é menor ou igual a 12,6 consideramos o paciente como fenótipo de metabolizador extensivo (EM) do metoprolol. E quando a MR<sub>urina</sub> é maior que 12,6 o paciente é considerado portador de fenótipo de metabolizador lento (PM) do metoprolol (MCGOURTY et al., 1985; HORAI et al., 1989, SOHN et al., 1991).

A avaliação de fenótipo oxidativo tipo metoprolol foi também investigada utilizando uma amostra de plasma coletada 3 horas após a administração de 100 mg de metoprolol por via oral. Foi definida a razão metabólica no plasma (MR<sub>plasma</sub>) como o log<sub>10</sub> da razão de concentrações plasmáticas metoprolol/α-hidroximetoprolol.

A MR<sub>plasma</sub> maior que 1,5 designa o fenótipo de PM enquanto a MR<sub>plasma</sub> menor que 1,5 designa o fenótipo de EM do CYP2D6 (SOHN et al., 1992).

# 3.5.2 Avaliação da atividade *in vivo* do CYP3A empregando midazolam como marcador

A área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo do midazolam  $(AUC^{0-\infty})$  foi determinada pelo método linear trapezoidal do tempo zero até a última amostra coletada (360 min) e extrapolada até o infinito dividindo-se a última concentração quantificada (360 min) pela constante da velocidade de eliminação (k<sub>el</sub>), através do software WinNonlin, versão 4.1 (Pharsight Corp. Mountain View, Calif, EUA). O *clearance* total aparente (Cl<sub>T</sub>/F) foi calculado com base na equação: Cl<sub>T</sub>/F=Dose/AUC<sup>0-∞</sup> (STREETMAN et al., 2000; LAMBA et al., 2002).

#### 3.6 Análise estatística

A análise estatística foi realizada empregando o software GraphPad Instat<sup>®</sup> (GraphPad Software, CA, EUA) e o software Origin versão 8.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, EUA). Os dados foram apresentados através das medianas (percentis 25 e 75) e médias. O teste de regressão ortogonal foi empregado para avaliar a relação entre o Cl<sub>T</sub>/F de cada enantiômero do tramadol e os fármacos marcadores, com significância fixada em p<0,05, de acordo com as equações descritas no estudo de Schellens et al., (1988). O teste de regressão ortogonal foi realizado com auxílio do programa Grafit versão 6.0 (Erithacus Software, London, UK). O teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn foi empregado para avaliar a diferença entre genótipos.

## 4. RESULTADOS

#### 4.1 Análise do metoprolol e α-hidroximetoprolol em urina

A Tabela 19 apresenta os limites de confiança e a Figura 19 mostra os cromatogramas da análise do metoprolol e α-hidroximetoprolol em urina, empregrando cromatografia líquida de alta eficiência e detecção por fluorescência.

**Tabela 19 -** Limites de confiança do método de análise do metoprolol e  $\alpha$ -hidroximetoprolol em urina

	Metoprolol		α-hidroximetoprolol	
Recuperação (%)	0,6 µg/mL	79,09	0,2 µg/mL	99,61
	8 µg/mL	74,96	4 µg/mL	97,09
	16 µg/mL	76,13	8 µg/mL	97,33
Linearidade (µg/mL)	0,2 -	- 20	0,1 –	10
R	0,9944 0,9988		88	
Limite de quantificação (µg/mL)	0,2		0,1	
Precisão (n = 5, CV%)	19,40		3,14	
Exatidão (% inexatidão)	14,95		-10.18	
Precisão Interensaios	0,6 µg/mL	14,61	0,2 µg/mL	13,03
(n=15, CV%)	8 µg/mL	13,13	4 µg/mL	12,88
	16 µg/mL	14,51	8 µg/mL	13,14
Exatidão Interensaios	0,6 µg/mL	-12,52	0,2 µg/mL	-12,53
(n=15, % Inexatidão)	8 µg/mL	-12,48	4 µg/mL	4,84
	16 µg/mL	-9,89	8 µg/mL	8,58
Precisão Intransaios	0,6 µg/mL	8,03	0,2 µg/mL	3,78
(n=5, CV%)	8 µg/mL	12,33	4 µg/mL	9,53
	16 µg/mL	13,06	8 µg/mL	8,59
Exatidão Intraensaios	0,6 µg/mL	-5,48	0,2 µg/mL	-3,09
(% Inexatidão)	8 µg/mL	-9,29	4 µg/mL	6,73
	16 µg/mL	-4,29	8 µg/mL	12,75
Estabilidade				
Curta Duração	0,6 µg/mL	2,96	0,2 µg/mL	0,35
(n=5, % Inexatidão)	16 µg/mL	-7,68	8 µg/mL	-13,46
Ciclos de congelamento	0, <mark>6 µg/mL</mark>	7,62	0,2 µg/mL	8,78
(n=5, % Inexatidão)	16 µg/mL	13,19	8 µg/mL	2,56
Longa duração	0, <mark>6 µg/mL</mark>	-14,89	0,2 µg/mL	-2,86
(n=5, % Inexatidão)	16 µg/mL	-13,78	8 µg/mL	-13,54

r = coeficiente de correlação linear; CV = coeficiente de variação [(desvio padrão/média)x100]; % Inexatidão = [(concentração obtida – concentração real)/concentração real] x 100



Figura 19 - Cromatogramas referentes a análise do metoprolol e  $\alpha$ -hidroximetoprolol em urina. A) urina branco; B) urina enriquecida com metoprolol e  $\alpha$ -hidroximetoprolol C) urina colhida de 0-8h de um paciente tratado com metoprolol 100 mg por via oral. 1 –  $\alpha$ -hidroximetoprolol, 2 – metoprolol

## 4.2 Fenótipo tipo metoprolol

O fenótipo oxidativo do metoprolol dos pacientes portadores de dor neuropática do Grupo Controle (n=12), DM tipo 1 (n=9) e DM tipo 2 (n=9) avaliado através da  $MR_{urina}$  metoprolol/ $\alpha$ -hidroximetoprolol está apresentado na Tabela 20. As razões metabólicas urinárias metoprolol/ $\alpha$ -hidroximetoprolol ( $MR_{urina}$ ) inferiores ou iguais a 12,6 designam o fenótipo de metabolizador extensivo (EM) (MCGOURTY et al. 1985; HORAI et al. 1989; SOHN et al., 1991).

**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)

Controle	metoprolol	α-hidroximetoprolol	MR <sub>urina</sub>	Fenótipo
(n=12)	<u>(µg/mL)</u>	<u>(µg/mL)</u>	0.00	
1	3,07	9,34	0,33	EM
2	14,67	27,84	0,53	EM
3	0,75	10,20	0,07	EM
4	3,59	5,96	0,60	EM
5	4,56	16,85	0,27	EM
6	11,74	5,63	2,08	EM
7	2,73	7,09	0,38	EM
8	2,26	9,52	0,24	EM
9	1,67	4,61	0,36	EM
10	1,65	7,61	0,22	EM
11	4,28	5,97	0,72	EM
12	4,59	2,53	1,82	EM
DM tipo 1				
(n=9)				
13	2,98	1,44	2,07	EM
14	4,92	0,56	8,78	EM
15	2,73	1,91	1,43	EM
16	1,36	1,87	0,73	EM
17	0,92	3,36	0,27	EM
18	2,28	3,39	0,67	EM
19	0,68	2,39	0,28	EM
20	1,86	2,07	0,89	EM
21	0,98	1,57	0,62	EM
DM tipo 2 (n=9)				
22	2,87	3,75	0,77	EM
23	7,95	3,06	2,59	EM
24	1,07	2,59	0,41	EM
25	0.51	3.14	0.16	EM
26	1.41	0.80	1.76	EM
27	9,26	6,17	1,50	EM
28	1.12	2.67	0.42	EM
29	0.60	1.63	0.37	EM
30	2,43	0,72	3,39	EM

EM = metabolizador extensivo

O fenótipo oxidativo do metoprolol dos pacientes portadores de dor neuropática do Grupo Controle (n=12), DM tipo 1 (n=9) e DM tipo 2 (n=9) avaliado através da MR<sub>plasma</sub> metoprolol/ $\alpha$ -hidroximetoprolol está apresentado na Tabela 21. As razões de concentrações plasmáticas log<sub>10</sub> metoprolol/ $\alpha$ -hidroximetoprolol (MR<sub>plasma</sub>) inferiores a 1,5 designam o fenótipo de metabolizador extensivo (EM) (SOHN et al., 1992).

**Tabela 21** – Investigação do fenótipo oxidativo tipo metoprolol através da razão metabólica de concentrações plasmáticas  $log_{10}$  metoprolol/ $\alpha$ -hidroximetoprolol (MR<sub>plasma</sub>) nos pacientes portadores de dor neuropática (n=30)

Controle (n=12)	metoprolol (ng/mL)	α-hidroximetoprolol (ng/mL)	<b>MR</b> <sub>plasma</sub>	Fenótipo
1	37.20	41.59	-0.05	EM
2	88,60	50,77	0,24	EM
3	33,87	38,20	-0,05	EM
4	95,03	43,41	0,34	EM
5	32,89	46,20	-0,15	EM
6	158,07	31,85	0,70	EM
7	57,15	35,47	0,21	EM
8	42,42	39,61	0,03	EM
9	37,95	26,89	0,15	EM
10	49,29	48,97	0,00	EM
11	138,33	57,17	0,38	EM
12	103,78	17,18	0,78	EM
DM tipo 1				
(n=9)				
13	67,42	20,13	0,52	EM
14	227,55	13,45	1,23	EM
15	103,19	29,31	0,55	EM
16	87,71	60,65	0,16	EM
17	30,73	27,18	0,05	EM
18	21,29	23,30	-0,04	EM
19	14,41	21,46	0,67	EM
20	71,44	29,85	0,38	EM
21	100,09	48,70	0,31	EM
DM tipo 2 (n=9)				
22	265,08	10,68	1,39	EM
23	77,09	22,20	0,54	EM
24	33,52	38,55	-0,06	EM
25	82,29	49,08	0,22	EM
26	84,27	26,13	0,51	EM
27	152,54	30,77	0,70	EM
28	37,10	30,72	0,09	EM
29	10,07	13,98	-0,14	EM
30	116,84	19,69	0,77	EM

EM = metabolizador extensivo

A Figura 20 mostra a comparação das  $MR_{urina}$  metoprolol/ $\alpha$ -hidroximetoprolol entre os Grupos Controle (n=12), DM tipo 1 (n=9) e DM tipo 2 (n=9).



**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)

A Figura 21 mostra a correlação direta significativa entre as variáveis MR<sub>urina</sub> e MR<sub>plasma</sub> nos pacientes portadores de dor neuropática fenotipados como metabolizadores extensivos do CYP2D6 (n=30)



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<sub>urina</sub>) e a razão metabólica de concentrações plasmáticas log<sub>10</sub> metoprolol/α-hidroximetoprolol (MR<sub>plasma</sub>)

y = a+bx, sendo  $a = y_m-bx_m$ 

$$b = \sum (y - y_m)^2 \sum (x - x_m)^2 + [(\sum (y - y_m)^2 - \sum (x - x_m)^2)^2 + 4\sum ((x - x_m) \cdot (y - y_m)^2]^{\frac{1}{2}}$$

 $2 \Sigma(x-x_m).(y-y_m)$ 

#### 4.3 Atividade in vivo do CYP3A

A Tabela 22 e a Figura 22 apresentam os resultados da avaliação da atividade *in vivo* do CYP3A4/5 para os pacientes dos Grupos Controle (n=12), DM tipo 1 (n=9) e DM tipo 2 (n=9), empregando o midazolam como fármaco marcador. O *clearance* total aparente do midazolam administrado por via oral foi calculado e normalizado pelo peso.

Grupos	Controle (n=12)	<i>DM tipo 1</i> (n=9)	<i>DM tipo 2</i> (n=9)
	17,72	98,39	20,63
	25,60	69,55	19,65
	15,22	45,07	29,88
	14,32	66,99	34,15
Cl <sub>T</sub> /F MDZ (mL/min/kg)	28,90	173,01	42,03
(	77,07	60,07	62,98
	88,28	53,39	85,98
	16,27	13,49	14,91
	15,17	38,00	46,66
	27,32	-	-
	31,30	-	-
	42,30	-	-
Mediana	26,46	60,70	34,15
Média	33,29	68,66	39,35
Percentil 25-75	15,75-36,90	45,07-69,55	20,63-46,66

**Tabela 22** - Investigação da atividade *in vivo* do CYP3A avaliado através do Cl<sub>T</sub>/F MDZ (mL/min/kg) nos pacientes dos Grupos Controle (n=12), DM tipo 1 (n=9) e DM tipo 2 (n=9)

Cl<sub>T</sub>/F MDZ: *Clearance* total aparente do midazolam administrado por via oral normalizado pelo peso. \* Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn (p<0,05)



Figura 22 - *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)

# 4.4 Genótipo do CYP2B6

A Tabela 23 mostra a frequência dos polimorfismos do gene do CYP2B6 nos pacientes portadores de dor neuropática dos Grupos Controle (n=10), DM tipo 1 (n=9) e DM tipo 2 (n=9).

Pacientes	Genótipo	
Grupo Controle	CYP2B6	
(n=12)		
1	T/T	
2	-	
3	G/G	
4	-	
5	G/G	
6	G/T	
7	G/T	
8	1/1	
9	G/G	
10	G/G	
11	G/G	
12	G/T	
Grupo DM tipo 1		
<u>(n=9)</u>	~ =	
13	G/T	
14	G/G	
15	G/T	
16	T/T	
17	G/T	
18	G/T	
19	T/T	
20	G/G	
21	T/T	
Grupo DM tipo 2		
<u>(n=9)</u>	~ =	
22	G/T	
23	1/1	
24	G/T	
25	G/G	
26	G/G	
27	G/T	
28	G/T	
29	G/T	
30	G/G	
	G/G: 10 (35,7 %)	
n=28	G/T: 12 (42,9 %)	
	T/T: 6 (21,4 %)	

**Tabela 23 -** Frequência do polimorfismo do gene CYP2B6 nos pacientes portadores de dor neuropática (n=30)

Alelo selvagem (G); alelo mutante (T)

4.5 Correlação entre a atividade *in vivo* do CYP2D6, atividade *in vivo* do CYP3A4 e o genótipo do CYP2B6 e a farmacocinética dos enantiômeros do tramadol.

As Figuras 23 e 24 mostram a ausência de correlação (p>0,05) entre as razões metabólicas urinárias (MR<sub>urina</sub>) ou plasmáticas (MR<sub>plasma</sub>) metoprolol/ $\alpha$ -hidroximetoprolol e o *clearance* total aparente (Cl<sub>T</sub>/F) dos enantiômeros do tramadol, nos pacientes portadores de dor neuropática (n=30).



 $b = \sum (y-y_m)^2 \sum (x-x_m)^2 + [(\sum (y-y_m)^2 - \sum (x-x_m)^2)^2 + 4\sum ((x-x_m).(y-y_m)^2]^{\frac{1}{2}}}{2\sum (x-x_m).(y-y_m)}$ 



Figura 24 - Gráficos e equações de regressão ortogonal e seus respectivos coeficientes de correlação r entre a razão metabólica plasmática (MR<sub>plasma</sub>) log<sub>10</sub> metoprolol/αhidroximetoprolol e o *clearance* total aparente dos enantiômeros do tramadol

> $y = a+bx, \text{ sendo } a = y_m - bx_m$ b=\Sigma(y-y\_m)^2 \Sigma(x-x\_m)^2 + [(\Sigma(y-y\_m)^2 - \Sigma(x-x\_m)^2)^2 + 4\Sigma((x-x\_m).(y-y\_m)^2)^{1/2} - 2(x-x\_m).(y-y\_m)^2 - 2(x-x\_m)^2 - 2(x-x\_m)^2

As Figuras 25 e 26 mostram a correlação direta significativa entre a  $MR_{urina}$  (p<0,01) ou  $MR_{plasma}$  (p<0,05) metoprolol/ $\alpha$ -hidroximetoprolol e a razão de AUC (+)-tramadol/(+)-M1 ou (-)-tramadol/(-)-M1, nos pacientes portadores de dor neuropática (n=30).



Figura 25 - Gráficos e equações de regressão ortogonal e seus respectivos coeficientes de correlação r entre a razão metabólica urinária 0-8h metoprolol/αhidroximetoprolol (MR<sub>urina</sub>) e a razão metabólica (+)-tramadol/(+)-M1 ou (-)tramadol/(-)-M1

y = a+bx, sendo  $a = y_m-bx_m$ 

$$\frac{\sum (y-y_m)^2 \sum (x-x_m)^2 + [(\sum (y-y_m)^2 - \sum (x-x_m)^2)^2 + 4\sum ((x-x_m).(y-y_m)^2]^{\frac{1}{2}}}{2 \sum (x-x_m).(y-y_m)}$$



Figura 26 - Gráficos e equações de regressão ortogonal e seus respectivos coeficientes de correlação r entre a razão metabólica plasmática (MR<sub>plasma</sub>) log<sub>10</sub> metoprolol/αhidroximetoprolol e a razão metabólica (+)-tramadol/(+)-M1 ou (-)-tramadol/(-)-M1

> y = a+bx, sendo a =y<sub>m</sub>-bx<sub>m</sub> b= $\Sigma(y-y_m)^2 \Sigma(x-x_m)^2 + [(\Sigma(y-y_m)^2 - \Sigma(x-x_m)^2)^2 + 4\Sigma((x-x_m).(y-y_m)^2]^{\frac{1}{2}}$  $-\frac{2 \Sigma(x-x_m).(y-y_m)}{2 \Sigma(x-x_m).(y-y_m)}$

A Figura 27 apresenta a ausência de correlação (p>0,05) entre o *clearance* total aparente do midazolam e o *clearance* total aparente ( $CI_T/F$ ) do tramadol como enantiômeros individuais, nos pacientes portadores de dor neuropática (n=30).



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<sub>T</sub>/F) do (+)-tramadol ou do (-)-tramadol

> $y = a+bx, \text{ sendo } a = y_m - bx_m$ b= $\Sigma(y-y_m)^2 \Sigma(x-x_m)^2 + [(\Sigma(y-y_m)^2 - \Sigma(x-x_m)^2)^2 + 4\Sigma((x-x_m).(y-y_m)^2]^{\frac{1}{2}}$  $2 \Sigma(x-x_m).(y-y_m)$

A Figura 28 apresenta a ausência de correlação (p>0,05) entre o *clearance* total aparente do midazolam e a razão de AUC (+)-tramadol/(+)-M2 ou (-)-tramadol/ (-)-M2, nos pacientes portadores de dor neuropática (n=30).



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

 $y = a+bx, \text{ sendo } a = y_m - bx_m$ b= $\Sigma(y-y_m)^2 \Sigma(x-x_m)^2 + [(\Sigma(y-y_m)^2 - \Sigma(x-x_m)^2)^2 + 4\Sigma((x-x_m).(y-y_m)^2]^{\frac{1}{2}}$  $-\frac{2 \Sigma(x-x_m).(y-y_m)}{2 \Sigma(x-x_m).(y-y_m)}$ 

A Tabela 24 apresenta o clearance total aparente dos enantiômeros (+)tramadol e (-)-tramadol dos pacientes genotipados como G/G, G/T ou T/T.

Polimorfismos	CI (L/h)		
CYP2B6	(+)-tramadol	(-)-tramadol	
G/G (n=10)	44,38	44,12	
	(35,13-54,81)	(35,71-54,59)	
	43,67	47,56	
G/T (n=12)	46,13	56,83	
	(22,84-55,48)	(22,76-71,41)	
	46,29	53,05	
T/T (n=6)	60,03	57,35	
	(43,38-61,11)	(55,79-82,35)	
	56,64	64,09	

Tabela 24 - Clearances dos enantiômeros do tramadol nos pacientes genotipados como G/G, G/T ou T/T para o CYP2B6. Dados expressos como mediana (percentil 25-75), média

\*p<0,05 teste de Wilcoxon ((+)-tramadol vs (-)-tramadol) \*\*p<0,05 teste de Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn (G/G vs G/T vs T/T)

#### 5. DISCUSSÃO

O estudo da farmacogenética em pacientes tratados com tramadol justifica-se em função do fármaco ser eliminado por metabolismo dependente dos polimórficos CYP2D6, CYP2B6 e CYP3A. A atividade *in vivo* do CYP2D6 e a do CYP3A foram avaliadas empregando, respectivamente, o metoprolol e o midazolam como fármacos marcadores, enquanto que para o CYP2B6 os pacientes foram avaliados com base no genótipo do polimorfismo 516G>T do gene CYP2B6.

O estudo exigiu o desenvolvimento e validação de um método de análise do metoprolol e α-hidroximetoprolol em urina para avaliar o fenótipo oxidativo do CYP2D6. O método de análise do metoprolol e α-hidróximetoprolol em plasma humano foi validado em um estudo anterior do grupo de pesquisa (SILVA, 2008). As análises em plasma e urina foram realizadas por HPLC em coluna de fase reversa e detecção por fluorescência. Os métodos cromatográficos com detecção por fluorescência têm sido amplamente empregados na análise do metoprolol e seus metabólitos em diferentes amostras biológicas (GENGO et al., 1984; LENNARD, 1985; MONCRIEFF; SIMPSON, 1989; CHIU et al., 1997; LI; WANG, 2006, BARANOWSKA; WILCZEK, 2009).

O metoprolol e  $\alpha$ -hidroximetoprolol foram extraídos da urina através de uma partição líquido-líquido em meio alcalino. A recuperação do metoprolol foi de 75-80%, enquanto que para o  $\alpha$ -hidroximetoprolol foi de aproximadamente 100%. Outros estudos reportam recuperações de aproximadamente 80% utilizando acetato de etila (LI; WANG, 2006) e diclorometano (GENGO et al., 1984) como solventes extratores. A extração em fase sólida com recuperação de aproximadamente 85% (CHIU et al., 1997) e o uso de injeção direta (BARANOWSKA; WILCZEK, 2009; MONCRIEFF; SIMPSON, 1989; GODBILLON; DUVAL, 1984) também são empregados na análise de metoprolol e  $\alpha$ -hidroximetoprolol em urina. A utilização de alíquotas de 100 µL de urina permitiu a obtenção de limites de quantificação de 0,2 µg/mL para o metoprolol e 0,1 a 10 µg/mL para o  $\alpha$ -hidroximetoprolol. O método desenvolvido apresenta limites de confiança compatíveis com as concentrações urinárias do fármaco inalterado e seu metabólito  $\alpha$ -hidroximetoprolol observadas após a administração de dose única oral de 100 mg de metoprolol (Tabela 19).

Todos os pacientes portadores de dor neuropática apresentaram razões metabólicas urinárias metoprolol/α-hidroximetoprolol inferiores a 12,6, sendo portanto fenotipados como metabolizadores extensivos do metoprolol (MCGOURTY et al., 1985; HORAI et al., 1989; SOHN et al., 1991) (Tabela 20). O fenótipo oxidativo tipo metoprolol também foi avaliado através da MR<sub>plasma</sub>, obtida a partir do log<sub>10</sub> da razão das concentrações de metoprolol/α-hidroximetoprolol em amostra de plasma colhida 3 horas após a administração de 100 mg metoprolol por via oral (SOHN et al., 1992). Outros autores relatam o uso da MR<sub>plasma</sub> em amostra de plasma colhida no estado de equilíbrio 4 horas após a administração de doses múltiplas de metoprolol (ISMAIL; TEH, 2006). Da mesma forma que na avaliação do fenótipo através da urina, todos os pacientes foram fenotipados como metabolizadores extensivos do CYP2D6 (Tabela 21), pois as MR<sub>plasma</sub> de todos os pacientes foram inferiores a 1,5 (SOHN et al., 1992).

O fenótipo oxidativo tipo debrisoquina em pacientes portadores de DM tipo 1 é similar ao de voluntários sadios, sugerindo que a atividade do CYP2D6 não é alterada pelo DM (BECHTEL et al., 1988). De forma similar, a atividade do CYP2D6 avaliada pelo fenótipo tipo metoprolol no presente estudo não foi diferente entre os grupos estudados (Tabelas 20 e 21, Figura 20). Portanto, o CYP2D6 parece não estar envolvido na redução das concentrações plasmáticas dos enantiômeros do M1 pelo DM tipo 1 e DM tipo 2 (dados apresentados no **Capítulo 2**).

Através da regressão ortogonal, foi demonstrada correlação direta estatisticamente significante (p < 0,0001) entre a  $MR_{plasma}$  e  $MR_{urina}$  na população avaliada (Figura 21). Esses resultados sugerem que a  $MR_{plasma}$  é também uma ferramenta útil na avaliação do fenótipo oxidativo tipo metoprolol. De forma semelhante, Sohn et al. (1992) demonstraram correlações significativas (p<0,001) entre as razões plasmática e urinária metoprolol/ $\alpha$ -hidroximetoprolol em populações de koreanos e japoneses (rs=0,68 e 0,810, respectivamente).

Os dados apresentados nas Figuras 11 e 12 demonstram ausência de correlação entre o *clearance* dos enantiômeros do tramadol com a atividade *in vivo* do CYP2D6 (demonstrada pela MR<sub>urina</sub> ou a MR<sub>plasma</sub>). Vale ressaltar que a população investigada no presente estudo é constituída apenas de EMs do CYP2D6. Considerando que o tramadol é um fármaco de alta razão de extração hepática (PARASRAMPURIA et al., 2007), pequenas variações no *clearance* intrínseco do CYP2D6 (avaliados através da razão metabólica metoprolol/ $\alpha$ -

hidroximetoprolol em urina ou plasma) em uma população consituída apenas de EM, apresentam um pequeno efeito no *clearance* do tramadol. Para fármacos de alta razão de extração hepática o *clearance* hepático é limitado pelo fluxo sanguíneo hepático. Assim, a ausência de correlação pode estar ainda relacionada ao *clearance* intrínseco dependente de transportadores que podem limitar a entrada do tramadol do sangue para o hepatócito (BENET et al., 2010). Entretanto, até a presente data não há dados da literatura relacionados a permeabilidade do tramadol no hepatócito limitada por transportadores.

Os dados obtidos no presente estudo mostram correlação direta (p<0,01) entre as variáveis razão metabólica de AUC (+)-tramadol/(+)-M1 ou (-)-tramadol/(-)-M1 com a atividade in vivo do CYP2D6 avaliada através da MR<sub>urina</sub> metoprolol/αhidroximetoprolol. Correlação direta estatisticamente siginificante (p<0,05) também foi obtida da relação entre AUC (+)-tramadol/(+)-M1 ou (-)-tramadol/(-)-M1 e a  $MR_{plasma}$  metoprolol/ $\alpha$ -hidroximetoprolol (Figuras 25 e 26). Ressalta-se no entanto, que o metabolismo do tramadol a M1 em microssomos de fígado humano depende principalmente do CYP2D6, e em menor extensão do CYP2C19 e do CYP2B6 (SUBRAHMANYAN et al., 2001). Levo et al. (2003) demonstraram a existência de correlação significativa entre a razão metabólica tramadol/M1 como mistura enantiomérica no sangue e o número de alelos funcionais no gene do CYP2D6. A razão enantiomérica (-)-M1/(+)-M1 na urina coletada até 8 horas após a administração oral de 50 mg do tramadol também tem sido sugerida para fenotipar o CYP2D6 (FRANK et al., 2007; PEDERSEN et al., 2005). No entanto, um estudo realizado em crianças de 7 a 16 anos demonstrou apenas pouca correlação (r=0,43-0,56) entre a razão metabólica de AUC<sub>0-24h</sub> tramadol/M1 no plasma e a razão metabólica dextrometorfano/dextrorfano na urina do intervalo de 12 a 24 horas (ABDEL-RAHMAN et al., 2002).

Em microssomos de fígado humano, Subrahmanyan et al. (2001) demonstraram que a N-desmetilação do tramadol é catalizada pelo CYP2B6 e CYP3A4. Os autores mostram ainda que o inibidor de CYP3A4 troleandromicina inibe o metabolismo do tramadol a M2 em microssomas hepáticos humanos. A atividade *in vivo* do CYP3A4/5 hepático e intestinal foi avaliada nos pacientes incluídos na investigação através do uso do midazolam administrado por via oral como fármaco marcador. Aproximadamente 83% dos pacientes incluídos no Grupo Controle apresentaram *clearance* total do midazolam compreendidos entre 10 e 40

mL/min/kg. Resultados bastante similares foram encontrados por Lin et al. (2001) no qual 84% dos voluntários sadios apresentaram *clearance* entre 10 e 40 mL/min/kg. Os Grupos DM tipo 1 e DM tipo 2 apresentaram apenas 22% e 55% dos pacientes com *clearance* compreendido na faixa supracitada, respectivamente. Entretanto, embora a frequência de pacientes com *clearance* oral na faixa de 10 a 40 mL/min/kg tenha sido menor nos grupos DM tipo 1 e 2, não foram observadas diferenças significativas no *clearance* total do midazolam oral quando comparamos os Grupos Controle, DM tipo 1 e DM tipo 2 (Tabela 22, Figura 22). Paralelamente não foram observadas diferenças significativas nas concentrações plasmáticas do metabólito M2 entre os Grupos Controle, DM tipo 1 e DM tipo 1 e DM tipo 2 cuja formação é mediada pelo CYP3A4 e CYP2B6 (dados apresentados no **Capítulo 2**).

Os dados obtidos a partir de regressão ortogonal (Figura 27) indicam ausência de correlação (p>0,05) entre o *clearance* total aparente do (+)-tramadol ou (-)-tramadol e o *clearance* total aparente do midazolam. A razão metabólica (+)-tramadol/(+)-M2 ou (-)-tramadol/(-)-M2 também não demonstrou estar correlacionada (p<0,05) com o *clearance* total aparente do midazolam (Figura 28).

O genótipo do CYP2B6 foi avaliado em 28 dos 30 pacientes portadores de dor neuropática investigados. Foram encontrados 10 pacientes homozigotos para o alelo selvagem (G/G), 12 pacientes heterozigotos (G/T) e 6 pacientes homozigotos para o alelo mutante (T/T) (Tabela 23), correspondendo a frequências de 57,1% para o alelo selvagem e 42,9% para o alelo mutante. O polimorfismo 516G>T encontra-se presente nos alelos CYP2B6\*6, CYP2B6\*7 e CYP2B6\*9. A frequência do SNP mutante (T) em causasianos é de 28,2% (JACOB et al., 2004) e a frequência do alelo CYP2B6\*6 é de 15,9% em coreanos (KLEIN et al., 2005), 17,6% em japoneses (GATANAGA et al., 2007), 21% na população da Mongólia (DAVAALKHAM et al., 2009), 32,8% em afro-americanos e de 46,9% na população de Gana (KLEIN et al., 2005).

Não foram encontradas diferenças significativas entre o *clearance* dos enantiômeros do tramadol em termos do genótipo do CYP2B6. Entretanto, observase que há uma tendência de aumento do *clearance* do (+)-tramadol e do (-)-tramadol em virtude da presença do alelo mutante. Os pacientes homozigotos para o alelo mutante (T/T) apresentam *clearances* 1,65 e 1,39 vezes maiores para o (+)-tramadol e para o (-)-tramadol, respectivamente, em relação aos pacientes homozigotos para o alelo selvagem (GG) (Tabela 24). Os dados da literatura relativos a atividade enzimática do CYP2B6 em função da presença do polimorfismo de base única G516T (Gln172Hys) são contraditórios. Indivíduos homozigotos para o alelo mutante apresentam elevadas concentrações plasmáticas de efavirenz quando comparadas a individuos homozigotos para o alelo selvagem, sugerindo que a presença do SNP é relacionada a uma redução na atividade do CYP2B6 (TSUCHIYA et al., 2004). Hofmann et al. (2008) demonstraram que os níveis hepáticos do RNAm do CYP2B6 encontram-se reduzidos em portadores do alelo mutante. Por outro lado, Ariyoshi et al. (2001) relatam que a presença do SNP em questão está relacionada a um aumento da atividade catalítica do CYP2B6 avaliada através da desalquilação da 7-etoxicumarina pelo CYP2B6 expresso em *Escherichia coli*. Jinno et al. (2003) avaliaram a desalquilação da 7 etoxi-4-trifluorometilcumarina em microssomas de células COS-1 e verificaram o aumento da atividade enzimática na presença do alelo mutante.

Em resumo, os dados do presente estudo não mostram 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. Foram observadas correlações significativas apenas 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. 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.

# Capítulo 4

Capítulo 4

Farmacocinética-farmacodinâmica do (+)-Odesmetiltramadol em pacientes com dor neuropática portadores ou não de diabetes

#### 1. INTRODUÇÃO

O tramadol é um analgésico de ação central clinicamente efetivo contra diversas condições dolorosas, entre elas a dor neuropática diabética. Ambos enantiômeros do tramadol, bem como o seu principal metabólito M1 contribuem para a atividade analgésica através de diferentes mecanismos. O metabólito (+)-M1 é o principal agonista µ-opióide (Ki: 0,0034 µM) e apresenta afinidade pelo receptor aproximadamente 300 vezes maior que os enantiômeros do fármaco inalterado (Ki(+)tramadol: 1,33 e Ki<sub>(-)-tramadol</sub>: 24,8 µM). O (-)-tramadol apresenta atividade como inibidor da recaptação de noradrenalina, sendo as constantes de afinidade de 6,9, 0,59, 42 e 1,8 µM para o (+)-tramadol, (-)-tramadol, (+)-M1 e (-)-M1 respectivamente. Por outro lado, o (+)-tramadol atua como inibidor da recaptação de serotonina, com constantes de afinidade de 0,87, 4,8, 7,5 e 43 µM, respectivamente para o (+)-tramadol, (-)tramadol, (+)-M1 e (-)-M1 (RAFFA et al., 1993; FRINK et al., 1996; GILLEN et al., 2000). Antagonistas  $\alpha_2$ -adrenérgicos, como a ioimbina inibem parcialmente o efeito analgésico do tramadol (RAFFA et al., 1992); o antagonista opióide naloxona também inibe apenas parcialmente a analgesia produzida pelo tramadol (RAFFA et al., 1992). Logo, diversos autores afirmam que a analgesia induzida pelo tramadol é mediada pelas atividades opióide e monoaminérgica, as quais atuam de forma sinérgica e complementar.

O SNC é o sítio de ação para o tramadol e seu metabólito ativo M1. Portanto, a passagem para o SNC através da barreira hematoencefálica (BHE) por transporte passivo, ativo ou facilitado é limitante para a ação analgésica do fármaco. Estudos experimentais em ratos demonstram que o tramadol é preferencialmente distribuido do plasma para o cérebro quando comparado ao M1 (TAO et al., 2002) e que o transporte através da BHE é enantiosseletivo com maiores concentrações do (+)-tramadol e do (-)-M1 em relação ao seus respectivos enantiômeros (LIU et al., 2001b; LIU et al., 2001c). Até a presente data, não são conhecidos transportadores responsáveis pelo *uptake* do tramadol e M1 através da BHE. Sabe-se apenas que não são substratos da glicoproteína P (P-gp) e que o inibidor de P-gp, ciclosporina A, não altera a permeabilidade do tramadol e do M1 (KANAAN, et al., 2009).

O uso crônico do tramadol no tratamento da dor (200 mg/dia) e o consequente acúmulo de (+)-M1 gera dependência física opióide dose-dependente que é decorrente de neuroadaptações no SNC típicas dos agonistas µ-opióides. Por

outro lado, o tramadol apresenta efeitos opióides subjetivos considerados fracos em doses terapêuticas, e portanto é considerado um fármaco de baixo potencial de abuso (LANIER et al., 2010; DUKE et al., 2011).

Estudos PK-PD para o tramadol são considerados desafiadores, tendo em vista: a interação farmacodinâmica entre ambos enantiômeros do tramadol e seu metabólito (+)-M1 e a coexistência de mecanismos opióides e não opióides; o desequilíbrio enantiosseletivo entre o compartimento central (plasma) e o compartimento de efeito (SNC); e a neuroadaptação no SNC decorrente do uso crônico do tramadol. Assim, estudos experimentais envolvendo a administração dos enantiômeros individuais do tramadol e do metabólito ativo M1 tem colaborado na elucidação dos mecanismos envolvidos na atividade antinociceptiva e na busca de novos modelos para os estudos clínicos (VALLE et al., 2000; GARRIDO et al., 2003; BEIER et al., 2008).

Os estudos clínicos de PK-PD até então disponíveis do tramadol limitam-se apenas a um estudo populacional em crianças tratadas com tramadol ao final de cirurgias. O estudo avaliou as concentrações do tramadol e do metabólito M1 como misturas enantioméricas, e, como parâmetros de efeito, o movimento e o choro das crianças. Os autores concluíram que não somente o efeito opióide, mas também o efeito não-opióide são de relevância nos estudos clínicos que relacionam concentrações plasmáticas com resposta do tramadol (GARRIDO et al., 2006).

O presente estudo visa estabelecer o modelo PK-PD que relaciona o efeito opióide do tramadol, avaliado como atenuação da dor neuropática empregando a escala analógica visual de dor, e não opióide, avaliado através da noradrenalina plasmática, com as concentrações plasmáticas do enantiômero ativo (+)-M1, em pacientes com dor neuropática portadores ou não de diabetes tipo 1 ou tipo 2.
## 2. OBJETIVO

- Avaliar as concentrações plasmáticas de noradrenalina em pacientes portadores de dor neuropática tratados com dose única de tramadol.
- Estabelecer o modelo PK-PD relacionando as concentrações plasmáticas do tramadol como enantiômeros individuais ou como mistura enantiomérica com a atenuação da intensidade da dor (escala analógica visual de dor) em pacientes com dor neuropática.
- Estabelecer o modelo PK-PD relacionando a concentração plasmática total ou livre do metabólito ativo (+)-M1 com a atenuação da intensidade da dor (Escala Analógica Numérica de Dor) em pacientes com dor neuropática.
- Avaliar a influência do DM tipo 1 e do DM tipo 2 no PK-PD do tramadol envolvendo como parâmetro farmacodinâmico a atenuação da dor neuropática.

### 3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

### 3.1 Casuística e protocolo clinico

Foram incluídos os pacientes dos Grupos Controle (n=12), DM tipo 1 (n=9) e DM tipo 2 (n=9) selecionados nos Ambulatórios de Dor e Endocrinologia do HCFMRP-USP e no Ambulatório de Diabetes do Centro de Saúde Escola – Sumarezinho da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP e investigados nos **Capítulos 1, 2 e 3**.

Durante a investigação, os pacientes permaneceram na Enfermaria da Unidade de Pesquisa Clínica do HCFMRP-USP. Após serem informados do estudo, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO C).

Conforme descrito nos **Capítulos 1, 2 e 3,** os pacientes foram investigados quanto a disposição cinética do tramadol após a administração de dose única oral de 100 mg de tramadol racêmico (Tramal<sup>®</sup>, Pfizer, Brasil). Os pacientes foram avaliados quanto a intensidade de dor nos mesmo tempos de colheita de sangue realizados para a investigação da disposição cinética do tramadol (0; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 2; 3; 4; 6; 8; 10; 12; 16 e 24 horas após a administração do medicamento). A dor foi avaliada através da escala visual analógica de dor de 10 cm, sendo o extremo "zero cm" correspondente a "ausência de dor" e o extremo "dez cm", correspondente a "pior dor imaginável". Os efeitos adversos decorrentes da administração do tramadol foram observados até 24 horas após a administração do fármaco.

Foram colhidas amostras de sangue seriadas para a análise de noradrenalina em plasma. As colheitas foram realizadas com o pacientes na posição deitada, em estado de relaxamento, 30 minutos após a inserção de catéter heparinizado e nos mesmos tempos de colheita de sangue realizados para a investigação da disposição cinética do tramadol (0 a 24 horas). As amostras de sangue (volumes aproximados de 5 mL de sangue em seringas heparinizadas com Liquemine<sup>®</sup> 5000 UI, Roche, Brasil) foram transferidas para tubos mantidos em ambiente refrigerado contendo 50 µL de uma solução de EGTA [(ácido N,N,N',N'-tetraacético etileno glicol-bis (b-éter amino etílico)] (Sigma<sup>®</sup>, St. Louis, MO, EUA) e glutationa (Sigma<sup>®</sup>, St. Louis, MO, EUA) sendo 4,75 g de EGTA e 3 g de glutationa dissolvidos em 50 mL de água com o pH ajustado para 6-7). As amostras de sangue foram centrifugadas a 1800 x g em temperatuda de 4° C durante 10 minutos e as alíquotas de plasma foram armazenadas a -70° C até a análise.

### 3.2. Análise de noradrenalina em plasma

O método de análise da noradrenalina em plasma foi desenvolvido com base no método publicado por Forster et al. (1999) e validado em estudo anterior do grupo (MARQUES et al., 2002).

### 3.2.1. Soluções padrão e reagentes

A solução estoque de hidrogenotartarato de noradrenalina (Sigma, St Louis, MO, EUA) foi preparada na concentração de 1 mM em ácido acético 400 mM e diluída para a obtenção de soluções de uso nas concentrações de 40, 100, 200, 400, 500 e 1000 nM. As soluções são estáveis durante duas semanas quando armazenadas em temperaturas inferiores a 5° C.

Os reagentes glutationa reduzida, EGTA [(ácido N,N,N',N'-tetra acético etileno glicol – bis (b-éter aminoetílico)], complexo ácido difenilbórico-etanolamina (DPBEA) e brometo de tetraoctilamônio (ToABR) foram obtidos da Sigma (St Louis, MO, EUA). Os reagentes EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) e SDS (dodecil sulfato de sódio) e o solvente 1-octanol foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). O n-heptano grau HPLC foi obtido da J.T.Baker (Phillipsburg, NJ, EUA).

O tampão amônio foi preparado com solução de cloreto de amônio (grau P.A., Merck, Darmstadt, Alemanha) 2,0 M ajustada a pH 8,8 com hidróxido de amônio (grau P.A., 28-30%, Mallinckrodt Chemicals, Xalostoc, México) 2,0 M. O tampão foi armazenado a 4° C e o pH verificado no momento do uso.

### 3.2.2 Análise cromatográfica

Foi empregada uma coluna de fase reversa LiChrospher<sup>®</sup> RP Select B (Merck, Darmstadt, Alemanha), partículas de 5 µm (125 x 4,0 mm) protegida por précoluna RP-18 (Lichrospher<sup>®</sup> 100, Merck, Darmstadt, Alemanha), mantidas a 23° C. A fase móvel foi constituída de 4,51 g de acetato de sódio, 0,186 g de EDTA, 50 mg de SDS e 150 mL de metanol por litro de água. O pH foi ajustado com ácido acético glacial para 5,10. O sistema HPLC Shimadzu<sup>®</sup> foi constituído por bomba modelo LC- 20 AD, auto-amostrador SIL-20AC HT, forno CTO-10A e detector eletroquímico com eletrodo Ag/AgCl modelo L-ECD-6A operando com potencial de +0,60 V.

### 3.2.3 Preparo de amostra

Alíquotas de 2000  $\mu$ L de plasma foram adicionadas de 500  $\mu$ L de tampão amônio 2,0 M pH 8,8 contendo 2 g/L de DPBEA e de 4 mL de heptano contendo 3,5 g/L de ToABR e 10 mL/L de octanol. Os tubos foram agitados em *mixer* durante 90 segundos de forma pulsátil e centrifugados a 1200 g durante 10 minutos a 4° C. As fases orgânicas (3,5 mL) foram transferidas para tubos cônicos e adicionadas de 800  $\mu$ L de octanol e 150  $\mu$ L de ácido acético 400 mM. Os tubos foram agitados novamente durante 30 segundos e centrifugados a 1200 g durante 5 minutos. As fases aquosas inferiores (100  $\mu$ L) foram injetadas em sistema HPLC. Durante o procedimento de extração até a análise, as amostras foram mantidas resfriadas em gelo e protegidas da luz.

### 3.2.4 Curvas de calibração

As curvas de calibração foram obtidas através da análise de alíquotas de 2000 µL de água Milli Q, adicionadas de 500 µL de tampão amônio 2,0 M pH 8,8 enriquecidas com 25 µL de cada uma das soluções padrão de noradrenalina, correspondendo a 0,5, 1,25, 2,5, 5, 6,25 e 12,5 pmol/mL de plasma. As equações de regressão linear e coeficientes de correlação foram obtidos através das razões de altura dos picos obtidos em função das concentrações plasmáticas.

### 3.3 . Análise farmacocinética-farmacodinâmica (PK-PD)

# 3.3.1 Análise PK-PD relacionando as concentrações plasmáticas do tramadol com a atenuação da dor neuropática

A relação PK-PD relacionando as concentrações plasmáticas do (-)-tramadol, (+)-tramadol e/ou da mistura enantiomérica do tramadol com o efeito na atenuação da dor neuropática foi realizada utilizando a regressão não linear pelo software WinNonlin versão 4.0 (Pharsight Corp. Moutain View, Calif, EUA). Foram testados

diversos modelos de relação PK-PD, sendo que a relação entre o modelo bicompartimental de primeira ordem, com microconstantes e inclusão de *lag time* e modelo sigmóide de efeito máximo ( $E_{max}$ ) (Figura 29) foram utilizados por apresentarem o melhor ajuste, baseado no critério de informação de Akaike (GABRIELSSON; WEINER, 1999, 2000). O modelo sigmóide de efeito máximo é definido pela equação:

$$E = \frac{E_{max} \cdot C_{e}^{\gamma}}{C_{e}^{\gamma} + E C_{e50}^{\gamma}}$$

onde,  $E_{max}$  é o efeito máximo,  $C_e$  é a concentração no sítio de efeito,  $EC_{e50}$  é a concentração do fármaco no compartimento de efeito requerida para produzir 50% do efeito máximo e  $\gamma$  representa a inclinação da curva (coeficiente de Hill). No modelo sigmóide de efeito máximo, o efeito é zero na concentração igual a zero, e o efeito máximo foi fixado em até 1 quando a concentração tende ao infinito (GABRIELSSON; WEINER, 1999, 2000). O modelo foi empregado para descrever a relação entre as concentrações plasmáticas dos enantiômeros do tramadol e o efeito fracional analgésico avaliado através da atenuação da intensidade de dor.

Os parâmetros estimados pela equação acima descrita são calculados com base nas microconstantes obtidas a partir da modelagem farmacocinética bicompartimental de cada enantiômero do tramadol: V<sub>1</sub>/F: volume de distribuição aparente do compartimento 1;  $k_{01}$ : 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 e LT: *lag time* (GABRIELSSON; WEINER, 1999, 2000).



Figura 29 - Modelo de relação entre o modelo bicompartimental de primeira ordem, com microconstantes e inclusão de *lag time* e modelo sigmóide de efeito máximo (E<sub>max</sub>) (GABRIELSSON; WEINER, 1999, 2000)

# 3.3.2 Análise PK-PD relacionando as concentrações plasmáticas do (+)-M1 total e livre com a atenuação da dor neuropática.

A relação PK-PD relacionando a concentração plasmática total ou livre do (+)-M1 com a atenuação da dor neuropática avaliada apela escala analógica visual de dor foi realizada utilizando a regressão não linear pelo software WinNonlin versão 4.0 (Pharsight Corp, Moutain View, Calif, EUA). Foram testados os diversos modelos de efeito farmacodinâmico sendo que o modelo sigmóide de efeito máximo foi o escolhido com base no Critério de Informação de Akaike (GABRIELSSON; WEINER, 1999, 2000) (Figura 30).



Figura 30 - Modelo sigmóide de efeito máximo (GABRIELSSON; WEINER, 1999, 2000)

No modelo sigmóide de efeito máximo, o  $E_{max}$  foi fixado em até 1, e os parâmetros EC<sub>50</sub> e gama ( $\gamma$ ) foram estimados pela equação:

$$E= \frac{E_{max} \cdot C^{\gamma}}{C^{\gamma} + EC^{\gamma}_{50}}$$

onde,  $E_{max}$  corresponde ao efeito máximo, C corresponde à concentração plasmática do fármaco, EC<sub>50</sub> refere-se a concentração plasmática do fármaco que produz 50% do efeito máximo e  $\gamma$  é a inclinação da curva (coeficiente de Hill).

As análises farmacodinâmicas foram feitas através de metodologia denominada *Naive Pooled Analysis* (NPA), onde todos os dados da população em estudo são modelados em conjunto, simulando assim o comportamento populacional. Adicionalmente, os resultados de coeficiente de variação desse tipo de análise fornecem uma estimativa da variabilidade populacional do parâmetro em estudo.

### 3.4. Análise estatística

Os testes estatísticos foram realizados com auxílio do *software* GraphPad Instat<sup>®</sup> (GraphPad Software, CA, USA) e do Origin (versão 8.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, EUA).

A seleção dos modelos para as análises PK-PD foi feita com base no Critério de Informação de Akaike (AIC), uma medida do ajuste baseado na máxima verossimilhança, descrito pela equação:

onde, N é o número de observações com peso positivo, SPRQ é a soma ponderada dos resíduos quadrados e P é o número de parâmetros. O modelo escolhido foi aquele que apresentou menor valor de AIC e corresponde àquele que apresentou melhor ajuste estatístico (GABRIELSSON; WEINER, 1999, 2000).

### 4. RESULTADOS

### 4.1. Reações adversas

As reações adversas decorrentes da administração de dose única oral de 100 mg de tramadol em pacientes com dor neuropática, portadores ou não de DM foram observadas em 7 dos 30 pacientes incluídos na investigação, de acordo com os dados da Tabela 25. Foram excluídos do estudo 8 pacientes que apresentaram emese após a administração do tramadol com prejuízo na avaliação da farmacocinética.

Paciente	Efeito adverso	Tempo após a administração	
Controle			
1	sonolência	3 – 4 h	
2	náusea	0,5 h	
7	náusea; cefaléia;	0,5 h; 0,75h – 1,5 h; 1,5-3h	
	sonolência		
DM tipo 1			
13	náusea	1,5 h	
15	náusea	1,5 h e 6 h	
19	náusea, secura da	0,25h e 4h; 1,5 h;	
	boca		
DM tipo 2			
24	taquicardia	3 h	

 Tabela 25 - Reações adversas após administração de dose única oral de 100 mg de tramadol em pacientes com dor neuropática, portadores ou não de diabetes

### 4.2 Avaliação das concentrações plasmáticas de noradrenalina

As Figuras 31 e 32 mostram as concentrações plasmáticas de noradrenalina após a administração de 100 mg de tramadol racêmico. Os dados estão apresentados como valores individuais e mediana (n=25) dos pacientes diabéticos e não diabéticos portadores de dor neuropática na Figura 31 e como mediana dos Grupos Controle (n=10), DM tipo 1 (n=7) e DM tipo 2 (n=8) na Figura 32.



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). Dados apresentados como valores individuais e mediana. Teste de Mann-Whitney para comparação com os valores basais (p<0,05)</p>



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). Dados apresentados como mediana. \* Teste de Mann-Whitney para comparação com os valores basais dentro de cada grupo (p<0,05)</p>

# 4.3 Análise PK-PD relacionando as concentrações plasmáticas do tramadol como enantiômeros individuais com a atenuação da dor neuropática.

A Tabela 26 apresenta os parâmetros de PK-PD obtidos da relação entre as concentrações plasmáticas totais do tramadol como enantiômeros individuais com a atenuação da dor neuropática para os pacientes dos Grupos Controle (n=10), DM tipo 1 (n=9) e DM tipo 2 (n=9). Os pacientes que não apresentaram atenuação da dor neuropática ou que no dia da investigação apresentavam intensidade de dor menor que 25 mm foram excluídos da análise PK-PD.

**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)

	Grupo Controle	Grupo DM tipo 1	Grupo DM tipo 2
	(n=7)	(n=5)	(n=6)
(+)-tramadol			
ECe <sub>50</sub> (ng/mL)	25,5 (7,4-97)	27,3 (7,4 - 28,2)	13,8 (5,3 – 62,6)
γ	1,9 (0,9-8,8)	0,4 (0,003 - 1,6)	1,3 (0,4 – 7,9)
Ke0 (1/h)	0,4 (0,01-1,8)	1,3 (0,2 - 2,3)	0,9 (0,1 – 1,9)
AIC	-10,1 (-16,25,9)	-10,0 (-42,9 - 23,7)	-6,9 (-15,0 – 3,9)
(-)-tramadol			
ECe <sub>50</sub> (ng/mL)	25,5 (10,0-70,9)	12,3 (3,7 – 20,9)	9,9 (5,3-52,7)
γ	1,4 (0,9-2,9)	3,3 (0,8-5,8)	1,3 (0,4-6,3)
Ke0 (1/h)	0,4(0,04-1,8)	6,7 (0,2-13,2)	1,0(0,2-1,9)
AIC	-11,2 (-18,32,9)	-25,4 (-45,15,7)	-6,6 (-15,4 – 4,1)

 $E_{max}$ : efeito máximo, fixado em 1; ECe<sub>50</sub>: concentração do fármaco no compartimento de efeito que produz 50% do efeito máximo;  $\gamma$ : coeficiente de Hill; Ke0: constante da velocidade de transferência do compartimento central para o compartimento de efeito; AIC: critério de informação de Akaike. Dados apresentados como mediana (percentil 25-75)

4.4 Análise PK-PD relacionando as concentrações plasmáticas do (+)-M1 total ou livre com a atenuação da dor neuropática.



Figura 33 - Análise PK-PD relacionando a concentração plasmática total 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). Os círculos vazios representam os dados observados enquando a linha contínua representa os dados estimados

A Tabela 27 apresenta os parâmetros de PK-PD obtidos da relação entre a concentração plasmática livre ou total do (+)-M1 com a atenuação da dor neuropática para os pacientes dos Grupos Controle (n=9), DM tipo 1 (n=7) e DM tipo 2 (n=8) (Figura 33).

	(+)-M1 total		
	Controle	DM tipo 1	DM tipo 2
	(n=9)	(n=7)	(n=8)
E <sub>max</sub>	1,0	1,0	1,0
EC₅₀ (ng/mL)	68,2 ± 131,5	18,9 ± 65,9	37,17 ± 120,1
γ	$1,0 \pm 0,7$	1,0 ± 1,2	1,0 ± 1,1
		(+)-M1 livre	
	Controle	DM tipo 1	DM tipo 2
	(n=9)	(n=7)	(n=8)
E <sub>max</sub>	1,0	1,0	1,0
EC₅₀ (ng/mL)	14,7 ± 30,8	12,8 ± 49,7	9,06 ± 29,3
γ	1,0 ± 0,7	1,0 ± 1,3	1,0 ± 1,1

**Tabela 27** - Estudo PK-PD relacionando as concentrações plasmáticas do (+)-M1 total e livre com a atenuação da dor neuropatica em pacientes dos Grupos Controle (n=9), DM tipo 1 (n=7) e DM tipo 2 (n=8)

Método *naive pooled analysis* (parâmetros estimados  $\pm$  erro padrão). Modelo  $E_{max}$  sigmoide, sendo efeito fixado em 0 na concentração C=0; concentração tendendo ao infinito no  $E_{max}$ ; e  $E_{max}$  fixo em 1.

### 5. DISCUSSÃO

Estudos clínicos demonstram que o tramadol na forma racemato mostra vantagens em relação ao uso dos enantiômeros individuais se levados em consideração a eficácia e os efeitos adversos (GROND et al., 1995; WIEBALCK et al., 1998). Portanto, é pouco provável que o tramadol venha a ser empregado na clínica médica como enantiômeros individuais.

A náusea e o vômito são os efeitos adversos mais frequentemente reportados no uso do tramadol (GROND et al., 1995; WIEBALCK et al., 1998). No presente estudo foram excluídos um total de 8 pacientes, ou seja, 21% por apresentarem vômito. Estudos anteriores relatam menor frequência de vômito, com valores de aproximadamente 1,7% (COSSMAN et al., 1997). Outros efeitos adversos comuns são secura da boca, tontura e sonolência. Menos frequentemente, são reportados efeitos adversos relacionados à função cardiovascular: palpitação, taquicardia e sensação de colapso cardiovascular. São raras as incidências de cefaléias, constipação, irritação gastrintestinal e reações dermatológicas (COSSMAN et al., 1997).

Vários farmacodinâmicos parâmetros iá foram empregados como biomarcadores de efeito do tramadol, entre eles a pupilometria em infravermelho, através da avaliação do diâmetro da pupila (FLIEGERT et al., 2005; KIRCHHEINER et al., 2008), catecolaminas plasmáticas (MILDH et al., 1999; GARCÍA-QUETGLAS et al., 2007b) e escalas de dor (GARRIDO et al., 2006). No presente estudo, foram avaliados como parâmetros farmacodinâmicos a noradrenalina plasmática e a atenuação da dor avaliada com base na escala analógica visual de dor. Considerando que a atividade em receptores  $\mu$ -opióide é a principal determinante no efeito analgésico do tramadol e considerando a baixa afinidade de ambos os enantiômeros do tramadol pelo receptor µ-opióide, o efeito da atenuação da dor foi avaliado em função das concentrações plasmáticas do metabólito (+)-M1. A avaliação das concentrações plasmáticas de noradrenalina baseia-se no da atividade monoaminérgica do tramadol, sendo que conhecimento os enantiômeros (-)-tramadol e (-)-M1 mostram maior contribuição na inibição da recaptação de noradrenalina quando comparados aos enantiômeros (+)-tramadol e (+)-M1 (GARRIDO et al., 2003).

O método de análise da noradrenalina plasmática foi desenvolvido com base no método descrito por Forster; Macdonald (1999). Os autores reportam que as concentrações plasmáticas basais de noradrenalina em voluntários sadios variam de 0,5 a 3,5 pmol/mL. Outros autores reportam concentrações de 2,11 pmol/mL no plasma de voluntários sadios (HOLLENBACH et al., 1998). A curva de calibração da noradrenalina plasmática foi construída no intervalo 0,5 a 12,5 pmol/mL de plasma. No presente estudo as concentrações plasmáticas basais, apresentadas como mediana (percentil 25-75) foram de 4,1 pmol/mL (2,6-6,1 pmol/mL) em pacientes portadores de dor neuropática não diabética, 2,2 pmol/mL (1,8-3,7 pmol/mL) para os pacientes com dor neuropática portadores de DM tipo 1 e 2,5 pmol/mL (1,6-4,0 pmol/mL) para os pacientes com dor neuropática portadores de DM tipo 2 (Figura 32). As concentrações basais de noradrenalina plasmática não mostram diferenças entre os grupos de pacientes investigados portadores ou não de DM. Os dados de concentrações plasmáticas de noradrenalina observados antes da administração do tramadol aos pacientes investigados portadores de dor neuropática estão de acordo com estudos anteriores que mostram valores de 2,2 pmol/mL para pacientes com dor neuropática diabética e 2,4 pmol/mL para pacientes não diabéticos. De acordo com os autores as concentrações de noradrenalina em pacientes com neuropatia diabética que não apresentam dor estão reduzidas para valores de 1,3 pmol/mL, sugerindo que a presença de dor neuropática está associada ao aumento relativo do número de fibras simpáticas funcionantes que contribuem para a dor (TSIGOS et al., 1993).

As concentrações plasmáticas de noradrenalina também foram avaliadas até 24 horas após a administração de dose única oral de 100 mg de tramadol em pacientes com dor neuropática portadores ou não de diabetes. Os dados apresentados na Figura 32 mostram que as concentraçõs plasmáticas de noradrenalina obtidas até 24 horas após a administração do tramadol não diferem dos valores basais, ou seja, a administração de dose única oral de 100 mg de tramadol não altera as concentrações plasmáticas de noradrenalina para todos os grupos investigados. Resultados similares foram reportados por Mildh et al. (1999) na investigação de voluntários sadios tratados com 150 mg de tramadol i.v. associado com 112,5 ou 250 mg de meperidina iv. James et al. (1996) também não observaram alterações nos níves plasmáticos de noradrenalina ou adrenalina 1 hora

após a administração intravenosa bolus de 150 mg de tramadol em pacientes sob tratamento analgésico pós-toracotomia.

As concentrações plasmáticas de noradrenalina observadas até 24 horas após a administração do tramadol estão apresentadas como dados individuais na Figura 31 para os três grupos investigados. Observa-se que as concentrações plasmáticas de noradrenalina expressas como mediana de todos os pacientes investigados (n=25) encontram-se reduzidas 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. Entretanto, não foram observadas diferenças estatísticas devido a grande variabilidade no parâmetro estudado e ao pequeno número de pacientes investigados. Os dados ainda permitem observar menores valores de noradrenalina plasmática durante o período de sono dos pacientes, ou seja nos tempos entre 12 e 16 horas após a administração do tramadol.

A administração de doses terapêuticas de tramadol em voluntários sadios, ou seja, na ausência de dor, resultam em aumento na concentração de noradrenalina no fluido cerebrospinal lombar resultante da atividade do (-)-tramadol e (-)-M1 como inibidores da recaptação de noradrenalina. A presença da noradrenalina no SNC contribui para o aumento da antinocicepção promovida pelo (+)-M1 através de estimulação indireta de receptores  $\alpha$ -2 adrenérgicos (BOUAZIZ et al., 1996; GARRIDO et al., 2000). Entretanto, a inibição da recaptação de noradrenalina no SNC pelo tramadol e seus metabólitos não é necessariamente refletida nos níves plasmáticos do neurotransmissor (MILDH et al., 1999).

Garrido et al. (2006) reportam que as concentrações de tramadol e M1 no sítio de efeito são os parâmetros que melhor refletem a resposta analgésica em crianças que receberam administração intravenosa de tramadol racêmico em tratamento pós-operatório. O estudo reporta que concentrações de 15 ng/mL de M1 e 100 ng/mL de tramadol no sítio de efeito são associadas com o controle adequado da dor. Tais concentrações estão relacionadas a concentrações plasmáticas de 20-30 ng/mL de M1 e 200-300 ng/mL de tramadol. Os autores relatam ainda que os valores de C<sub>max</sub> do tramadol e M1 no sítio de efeito são atingidos em 4-5h após a infusão (GARRIDO et al., 2006).

A relação PK-PD entre as concentrações plasmáticas dos enantiômeros do tramadol e o efeito fracional analgésico mostram alta variabilidade nos parâmetros

estimados (Tabela 26) provavelmente porque o metabólito (+)-M1, e, não o fármaco inalterado, é o responsável pelo efeito analgésico do tramadol (GILLEN et al., 2000). No presente estudo, a concentração do tramadol no compartimento de efeito que produz 50% do efeito máximo (ECe<sub>50</sub>) apresentada como mediana (percentil 25-75) para o (+)-tramadol foi de 25,5 ng/mL (7,4-97) no Grupo Controle, 27,3 ng/mL (7,4 - 28,2) no Grupo DM tipo 1 e de 13,8 ng/mL (5,3 – 62,6) no Grupo DM tipo 2. Em relação ao (-)-tramadol, os valores de ECe<sub>50</sub> foram de 25,5 ng/mL (10,0-70,9 ng/mL) no Grupo Controle, 12,3 ng/mL (3,7 – 20,9) no Grupo DM tipo 1 e de 9,9 ng/mL (5,3-52,7) no Grupo DM tipo 2 (Tabela 26). Não há dados da ECe<sub>50</sub> do tramadol como enantiômero individual ou mistura enantiomérica em pacientes adultos. Os dados disponíveis referem-se apenas às concentrações séricas efetivas. Um estudo realizado em pacientes adultos em tratamento pós-operatório ortopédico ou ginecológico com tramadol racêmico empregando infusor controlado pelo paciente reportou que a concentração sérica efetiva mínima foi de 287,7 ng/mL (20,2 – 986,3 ng/mL) de tramadol como mistura enantiomérica (LEHMAN et al., 1990).

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. Tal modelo, diferentemente do modelo PK-PD *link* empregado para os enantiômeros do tramadol, não requer que o paramêtro farmacocinético Vd seja empregado como informação prévia e, portanto, pode ser empregado como modelo PK-PD do metabólito M1. Neste modelo, o efeito máximo de atenuação fracional da dor neuropática foi fixado em 1,0. As concentrações plasmáticas totais do (+)-M1 necessárias para alcançar 50% do efeito máximo foram de 68,19, 18,89 e de 37,17 ng/mL nos pacientes do Grupo Controle, DM tipo 1 e DM tipo 2, respectivamente (Figura 33, Tabela 27). Por outro lado as concentrações plasmáticas livre do (+)-M1 necessárias para alcançar 50% do efeito máximo mostram menor variabilidade entre os grupos (Controle: 14,66 ng/mL; DM tipo 1: 12,78 ng/mL e DM tipo 2: 9,06 ng/mL). Tais resultados demonstram que a concentração plasmática livre é a mais adequada para a aplicação em estudos de PK-PD.

Beier et al. (2008) reportaram o uso do modelo de dor neuropática de Bennett usando alodinia a frio para avaliar a relação PK-PD em ratos tratados com tramadol racêmico ou com seus enantiômeros individuais ou ainda com os enantiômeros individuais do M1. Os autores empregaram o modelo de compartimento de efeito para descrever o efeito µ-opióide do (+)-M1. Os autores reportam que concentrações plasmáticas no estado de equilíbrio de 20,2 ng/mL do (+)-M1 e de 230 ng/mL do (-)-M1 são necessárias para alcançar 50% do efeito máximo.

O único estudo clínico que avalia a relação PK-PD do M1 emprega as concentrações plasmáticas do metabólito como mistura enantiomérica e refere-se a investigação de crianças. Os autores estimam que concentrações de (±)-M1 de 15 ng/mL de plasma estão associadas com probabilidade de 95% de alívio da dor (GARRIDO et al., 2006).

Os estudos PK-PD envolvendo os enantiômeros do tramadol, bem como do metabólito ativo (+)-M1 exigem o desenvolvimento de novos modelos que melhor descrevam o mecanismo de ação opióide e não-opióide do tramadol. O presente estudo mostrou, pela primeira vez, a relação PK-PD do tramadol em pacientes com dor neuropática, relacionando as concentrações plasmáticas do (+)-M1 com o efeito fracional analgésico do tramadol. O presente estudo enfatiza ainda que métodos de análise da concentração livre, bem como métodos enantiosseletivos são os mais adequados para os estudos PK-PD.

# 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<sup>®</sup> 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 0,5 ng/mL para cada enantiômero do tramadol e 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

- ABDEL-RAHMAN, S. M.; LEEDER, J. S.; WILSON, J. T.; GAEDIGK, A.; GOTSCHALL, 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.
- 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. Toxicol.*, Munchen, v. 29, n. 8, p. 310-313, 1991.
- 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 n°899 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 meloxican 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- BELLWARD, G. D.; CHANG, T.; RODRIGUES, B.; MCNEILL, J. H.; MAINES, S.; RYAN, D. E.; LEVIN, W.; THOMAS, P. E. Hepatic cytochrome P-450j 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.
- 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.
- 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.
- 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.

- BRAUN, L.; COFFEY, M.J.; PUSKÁS, F.; KARDON, T.; NAGY, G. CONLEY, A.A.; BURCHELL, B.; MANDL, J. Molecular basis of bilirubin UDPglucuronosyltransferase induction in spontaneously diabetic rats, acetonetreated 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.
- 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.
- 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.
- 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 cytochome P450 regulation in disease states, *Curr. Drug Metab.,* Hilversum, v. 2, n. 2, p. 165-183, 2001.
- CHIU, F. C.; DAMANI, L. A.; LI, R. C.; TOMLINSON, B. Efficient highperformance 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.
- 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.
- 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.

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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. 3<sup>rd</sup> ed. Swedish Pharmaceutical Press: Sweeden, 2000
- 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.
- GARCIA-QUETGLAS, E.; AZANZA, J. R.; SÁDABA, B.; MUNOZ, 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.
- 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.
- GARRIDO, M. J.; SAYAR, O.; SEGURA, C.; RAPADO, J.; DIOS-VIÉITEZ, 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.
- 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, (-)-Odesmethyltramadol, 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 redeuction 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.

- 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.
- GEBER, C.; BAUMGÄRTNER, U.; SCHWAB, R.; MÜLLER, H.; STOEBER, P.; DIETERICH, M.; SOMMER, C.; BIRKLEIN, F.; TREEDE, 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. Highperformance liquid chromatographic determination of metoprolol and alphahydroxymetoprolol 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.
- 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.
- GODOY, A. L.; DE MORAES, N. V.; MARTINEZ, E. Z.; CARVALHO, T. M.; MARQUES, M. P.; LANCHOTE, V. L. Simultaneous analysis of tramadol, Odesmethyltramadol, 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.
- 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.
- 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 streptozotocintreated rats. *Neurosci. Lett.*, Amsterdam, v. 411, n. 1, p. 1-5, 2007.
- 68. HENNIES, H. H.; FRIDERICHS, 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.
- 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.
- HOLLENBACH, E.; SCHULZ, C.; LEHNERT, H. Rapid and sensitive determination of catecholamines and the metabolite 3-methoxy-4-hydroxyphenethyleneglycol using HPLC following novel extraction procedures. *Life Sci.*, Oxford, v. 63, n. 9, p. 737-750, 1998.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.; HORRICHS-HAERMEYER, 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.
- 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.

- 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. 1<sup>st</sup> 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. 2<sup>nd</sup> 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-*Odemethyltramadol, 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.
- MCGOURTY, J. C.; SILAS, J. H.; LENNARD, M. S.; TUCKER, G. T.; WOODS, H. F. Metoprolol metabolism and debrisoquine oxidation polymorphismpopulation and family studies. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, London, v. 20, n. 6, p. 555-566, 1985.
- MEHVAR, R.; ELLIOTT, K.; PARASRAMPURIA, R.; ERADIRI, O. Stereospecific high-performance liquid chromatographic analysis of tramadol and its Odemethylated (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 cathecolamine 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.
- MILLIPORE CORPORATION. Assay of free anticonvulsant drugs, Application note, AN1002EN00. Disponível em: <u>www.millipore.com/publications</u> (Acesso em 15/fev/2011).
- 117. MILLIPORE CORPORATION. Centrifree<sup>®</sup> Ultrafiltration Devices, User guide. Disponível em: <u>www.millipore.com/techlibrary</u> (acesso em 10/dez/2010).
- 118. MONCRIEFF, J.; SIMPSON, D. Determination of metoprolol and its alphahydroxy 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. 114. 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. MUSSHOFF, F.; MADEA, B.; STUBER, F.; STAMER, U.M. Enantiomeric determination of tramadol and O-desmethyltramadol by liquid chromatographymass 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.; DNYANMOTE, 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. Routedependent stereoselective pharmacokinetics of tramadol and its active Odemethylated 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 Odesmethyltramadol 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.
- 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 chromatographytandem 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.; BALTODANO, 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.
- 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.; FRIDERICHS, 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.; FRIDERICHS, 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. SAITOH, 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 antypirine, 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.
- 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 Odesmethyl metabolite levels in brain vs. plasma of mice and rats admistered 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 efavirenzcontaining 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 (-)-Odesmethyltramadol, 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. *Anaesthesist*, 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.; STAHLE, 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.

# Apêndices









APÊNDICE E neuropática	<b>3 –</b> Dado:	s individua	ais de dispo	osição ciné	tica enanti	osseletiva	do tramae	dol, M1 e	M2 em pa	icientes pc	ortadores o	de dor
<b>Tabela 28 –</b> D (Grupo Contro	ados indiv le)	'iduais de d	lisposição ci	nética enan	tiosseletiva	do <i>tramad</i> e	o/ em pacie	ntes não di	iabéticos po	ortadores d	e dor neuro	pática
Parâmetro	۲	2	ę	4	ъ	9	7	ω	6	10	11	12
AUC <sup>0-</sup> (ng.h/mL)	677,56	2546,08	1787,06	1702,37	1126,37	958,09	1216,09	1152,58	792,06	3839,08	1407,51	2664,40
2	872,88	2305,17	1400,19	1514,55	915,83	661,12	830,12	1151,32	800,40	1377,03	1478,33	2330.67
C <sub>max</sub> (ng/mL)	74,45	246,20	260,06	168,69	126,22	202,84	293,17	148,82	90,24	149,54	166,24	301,09
	101,86	241,89	218,82	188,11	109,13	228,33	130,18	148,09	87,30	134,44	170,84	285,71
t <sub>max</sub> (h)	1,80	2,08	1,23	2,50	1,36	0,69	1,00	1,36	1,34	1,70	2,19	1,91
	1,52	2,47	1,20	2,05	1,40	0,65	0,88	1,35	1,20	1,59	2,06	1,88
t <sub>½a</sub> (h)	0,68	0,31	0,05	0,53	0,24	0,07	0,05	0,33	0,47	0,35	0,54	0,46
	0,39	0,71	0,04	0,38	0,34	0,08	0,11	0,42	0,31	0,29	0,46	0,48
t <sub>½</sub> α (h)	0,80	0,29	0,84	1,41	2,23	0,31	0,16	0,69	0,52	2,88	2,70	1,41
	0,44	0,86	0,88	0,88	1,22	0,13	2,62	0,44	0,34	3,05	2,97	1,18
t <sub>1∕2</sub> β (h)	7,70	6,13	7,95	7,48	9,15	5,00	6,50	7,52	6,60	556,89	9,06	12,10
	6,79	5,83	7,37	6,05	8,35	4,03	9,41	6,80	6,44	143,59	7,39	10,53
Cl <sub>T/F</sub> (L/h)	73,79	19,64	27,98	29,37	44,39	52,19	41,11	43,38	63,13	13,02	35,52	18,77
	57,28	21,69	35,71	33,01	54,59	75,63	60,23	43,43	62,47	36,31	33,82	21,45
Vd <sub>/F</sub> (L)	692,67	173,54	290,96	282,39	468,20	352,66	361,85	413,66	550,02	8253,45	297,18	246,33
	517,66	167,54	341,80	261,40	554,11	398,97	494,87	380,39	557,22	356,46	266,74	247,33
AUC <sup>0-∞</sup> (+)/(-)	0,78	1,10	1,28	1,12	1,23	1,45	1,46	1,00	0,99	2,79	0,95	1,14
Linhas sombread máxima; t <sub>max</sub> – tei volume de distribu	as = (+)- <i>tran</i> mpo para alc uição aparen	<i>nadol</i> ; linhas n :ançar C <sub>max</sub> ; t <sub>i</sub> te.	não sombreada ‰a – meia vida	as = (-)- <i>tramac</i> a de absorção;	<i>łol</i> ; AUC <sup>∪.∞</sup> - ár t <sub>i∡</sub> α – meia vi	rea sob a curv da de distribu	/a concentraç ição; t <sub>½</sub> β – m	ião plasmática eia vida de el	a versus temp liminação; CI/	io; C <sub>max</sub> – con F– <i>clearance</i>	centração pla total aparent	lsmática ⊵. Vd/F–

Tabela 29 - Dados individuais de disposição cinética enantiosseletiva do M1 em pacientes não diabéticos portadores de dor neuropática

.....

(Grupo Controle)			9				_		_			
Parâmetro	-	7	r	4	сı	9	7	œ	6	10	1	12
AUC <sup>0-∞</sup> (ng.h/mL)	1547,6 0	2773,4 1	1388,1 1	565,66	1439,8 0	339,36	664,85	1290,12	1376,80	649,58	1203,16	592,77
	1212,6 5	2001,6 5	903,44	1098,4 4	1374,9 7	253,22	806,63	1559,50	1094,38	669,61	709,17	537,95
C <sub>max</sub> (ng/mL)	141,04	133,47	98,37	67,71	111,92	37,65	64,31	101,46	61,10	63,98	109,05	38,69
	97,09	123,62	93,53	77,58	112,06	46,66	107,54	99,82	67,90	71,24	70,24	49,15
t <sub>max</sub> (h)	1,55	2,38	1,52	2,48	1,15	1,25	1,15	1,73	1,30	1,82	1,38	2,29
	1,39	2,42	1,66	5,17	1,31	0,58	0,84	1,68	2,32	1,31	2,01	1,65
$t_{y_2}f(h)$	0,20	0,35	0,14	0,40	0,12	0,21	0,23	0,23	0,11	0,29	0,12	0,33
	0,15	0,40	0,25	2,34	0,19	0,06	0,05	0,20	0,44	0,15	0,37	0,14
t <sub>½</sub> (h)	6,85	13,03	9,16	4,58	8,36	5,47	6,32	7,92	15,06	6,03	7,13	9,41
	8,02	9,80	5,81	5,05	7,73	3,52	4,97	9,99	9,63	5,92	5,78	7,01
AUC <sup>0-∞</sup> (+)/(-)	1,28	1,38	1,54	0,51	1,05	1,34	0,82	0,83	1,26	0,97	1,70	1,10
Linhas sombreadas = (+)- t <sub>max</sub> – tempo para alcançar	M1; linhas ná .C <sub>max</sub> ; t½f– m	ão sombread eia vida de fc	łas = (-)-M1; ɔrmação; t <sub>½</sub> -	AUC <sup>0-∞</sup> - ár∈ - meia vida d	e sob a cur <sup>u</sup> le eliminação	va concentra o.	tção plasmát	ica versus ten	npo; C <sub>max</sub> – co	ncentração p	asmática máx	ima;

Apêndices | 189

<b>Tabela 30 –</b> Dados (Grupo Controle)	individuais	de dispos	sição cinét	ica enanti	osseletiva	do M2 ei	m paciente	es não dia	abéticos p	ortadores	de dor ne	europática
Parâmetro	~	2	ю	4	5	9	7	ω	6	10	11	12
AUC <sup>0</sup> (ng.h/mL)	62,28	217,03	223,56	1145,2 4	545,56	383,05	681,95	180,49	131,96	421,52	774,90	1344,4 1
	16,17	77,36	48,19	99,97	84,47	105,06	103,97	45,98	37,93	74,47	130,67	271,18
C <sub>max</sub> (ng/mL)	5,43	14,55	21,36	51,22	28,98	43,32	57,84	17,69	12,44	47,89	54,42	79,24
	2,28	6,37	5,42	9,98	8,34	15,30	11,59	3,83	3,23	10,53	15,99	28,25
t <sub>max</sub> (h)	1,46	3,01	1,35	8,83	1,56	1,57	3,04	1,93	2,34	1,96	3,71	2,28
	1,57	3,24	1,52	3,93	1,24	1,00	1,26	1,48	1,53	1,14	2,46	1,81
$t_{\gamma_2} f(h)$	0,14	0,56	0,05	5,70	0,18	0,24	1,00	0,31	0,53	0,33	0,94	0,26
	0,21	0,75	0,10	1,27	0,15	0,11	0,28	0,18	0,24	0,07	0,60	0,18
t <sub>½</sub> (h)	7,36	8,55	6,98	5,70	12,23	5,29	5,62	6,01	5,78	5,04	7,28	10,71
	4,20	6,31	5,75	4,11	6,42	4,32	5,26	7,58	7,25	4,58	4,07	5,97
AUC <sup>0-∞</sup> (+)/(-)	3,85	2,80	4,64	11,45	6,46	3,64	6,56	3,92	3,48	5,66	5,93	4,96
Linhas sombreadas = (+)- t <sub>max</sub> – tempo para alcançaı	-M2; linhas nê r C <sub>max</sub> ; t½f – m	ăo sombread ieia vida de f	'as = (-)-M2; ormação; t <sub>½</sub> ·	AUC <sup>0-</sup> " - áre – meia vida	ea sob a cur de eliminaçã	va concentra o.	ação plasmát	ica versus te	empo; C <sub>max</sub> -	- concentraç	tão plasmáti	a máxima;

<b>Tabela 31 –</b> Dados⊣ (Grupo DM tipo 1)	individuais de	disposição cir	nética enantio	sseletiva do	<i>tramadol</i> em p	acientes com	DM tipo 1 port	adores de do	r neuropática
Parâmetro	13	14	15*	16	17	18*	19	20	21
AUC <sup>0-∞</sup> (ng.h/mL)	1234,01	1109,13	2280,62	1204,76	480,21	850,72	818,25	682,79	831,56
	935,79	1056,05	1748,14	896,19	388,45	623,08	607,16	582,42	566,62
C <sub>max</sub> (ng/mL)	125,00	99,01	134,68	145,61	61,46	77,29	88,59	65,92	112,91
	106,15	96,85	107,56	119,28	53,82	64,17	68,10	55,05	81,80
t <sub>max</sub> (h)	1,33	2,35	2,95	2,68	2,70	3,69	1,36	2,23	1,22
	1,43	2,34	1,72	2,62	2,44	3,43	1,38	2,15	1,18
$t_{\lambda_2}a$ (h)	0,18	0,40	0,74	0,85	1,14	1,40	0,28	0,56	0,16
	0,23	0,39	0,27	0,81	0,79	1,13	0,28	0,54	0,18
t <sub>½</sub> α (h)	3,17	0,22	2,33	1,49	1,16		0,39	3,79	1,65
	2,74	4,70		1,56	1,02		0,41	4,22	0,68
$t_{\gamma_2}\beta$ (h)	6,15	6,48	9,46	7,65	5,18	4,51	6,27	10,95	5,75
	5,30	6,30	10,21	7,12	4,71	4,13	5,96	30,22	4,93
Cl <sub>T</sub> (L/h)	40,52	45,08	21,92	41,50	104,12	58,77	61,11	73,23	60,13
	53,43	47,35	28,60	55,79	128,72	80,25	82,35	85,85	88,24
Vd/F (L)	359,35	420,78	299,13	321,44	568,31	388,28	536,27	732,74	454,14
	408,37	429,98	421,15	379,28	713,48	478,93	687,55	1384,47	601,30
AUC <sup>0-∞</sup> (+)/(-)	1,32	1,05	1,30	1,34	1,24	1,37	1,35	1,17	1,47
Linhas sombreadas = (+ máxima; t <sub>max</sub> – tempo pa volume de distribuição ap	<i>)-tramadol</i> ; linhas ra alcançar C <sub>maxi</sub> varente. *Pacient	: não sombreada ; t <sub>½</sub> a – meia vida es 15 e 18 foram	s = (-)- <i>tramadol</i> ; de absorção; $t_{N}$ modelados com	AUC <sup>u-∞</sup> - área s α – meia vida d o monocompart	sob a curva conce le distribuição; t <sub>∕s</sub> [ timental para (-) <i>-t</i> ≀	entração plasmátic 3 – meia vida de e amadol e (+)/(-)-tr	a versus tempo; eliminação; CI/F– amadol, respecti <sup>,</sup>	C <sub>max</sub> – concentr <i>clearance</i> total vamente.	ação plasmática aparente. Vd/F–

Apêndices | 191

<b>Tabela 32 –</b> Dados (Grupo DM tipo 1)	individuais d	e disposição (	cinética enant	iosseletiva d	o M1 em pac	cientes não di	abéticos porta	dores de dor	neuropática
Parâmetro	13	14	15	16	17	18	19	20	21
AUC <sup>0</sup> (ng.h/mL)	313,11	84,58	137,53	465,40	304,76	318,32	556,76	146,38	425,53
	288,81	192,91	1344,78	566,37	467,34	589,86	349,46	118,65	392,42
C <sub>max</sub> (ng/mL)	14,58	9,95	17,25	33,86	27,37	26,42	51,28	8,94	37,79
	28,67	18,54	52,55	61,86	51,14	62,28	39,99	11,05	41,22
t <sub>max</sub> (h)	1,64	2,21	0,42	2,61	2,83	4,72	1,41	2,68	1,69
	1,29	2,28	4,11	2,44	3,42	4,56	1,28	2,58	1,47
t <sub>½</sub> f (h)	0,22	0,40	0,07	0,46	0,59	1,41	0,19	0,57	0,27
	0,19	0,37	0,91	0,39	0,98	2,41	0,16	0,68	0,22
t <sub>½</sub> (h)	13,91	4,69	5,22	8,00	5,99	5,10	6,80	9,47	6,84
	6,27	6,00	14,78	5,13	4,01	2,41	5,44	5,55	5,81
AUC <sup>0-∞</sup> (+)/(-)	1,08	0,44	0,10	0,82	0,65	0,54	1,59	1,23	1,08
Linhas sombreadas = (+) t <sub>max</sub> – tempo para alcança	-M1; linhas não r C <sub>max</sub> ; t <sub>%</sub> f– meia	sombreadas = (-) vida de formação	-M1; AUC <sup>0-∞</sup> - ár o; t <sub>½</sub> – meia vida	ea sob a curva de eliminação.	concentração pl	asmática versus t	empo; C <sub>max</sub> – co	ncentração plasn	nática máxima;

Parâmetro	13	14	15	16	17	18	19	20	21
AUC <sup>0</sup> (ng.h/mL)	593,56	2485,42	543,88	431,67	70,09	114,54	92,73	487,70	336,37
	103,12	391,04	90,27	75,99	15,77	25,35	33,77	83,29	89,85
C <sub>max</sub> (ng/mL)	31,49	67,89	17,25	34,76	8,17	8,73	10,57	25,09	30,15
	9,98	24,22	4,87	12,05	2,33	2,86	4,17	7,78	12,87
t <sub>max</sub> (h)	2,74	5,60	6,28	1,89	3,92	4,89	1,83	3,80	1,57
	1,61	4,38	4,97	1,76	2,91	4,37	1,52	2,23	1,15
$\mathfrak{t}_{\chi}\mathfrak{f}(h)$	0,52	1,08	1,65	0,06	1,90	1,31	0,31	0,86	0,21
	0,26	1,10	1,70	0,04	0,80	2,26	0,22	0,46	0,13
t <sub>½</sub> (h)	11,25	21,70	17,00	8,31	2,49	5,92	5,07	10,82	6,93
	6,24	8,19	8,62	4,17	2,86	2,26	4,85	5,99	4,34
AUC <sup>0-∞</sup> (+)/(-)	5,76	6,36	6,03	5,68	4,44	4,52	2,75	5,86	3,74
Linhas sombreadas = (+)-M t <sub>max</sub> – tempo para alcançar C	2; linhas não sc ' <sub>max</sub> ; t <sub>½</sub> f – meia v	ombreadas = (-)-ľ vida de formação	M2; AUC <sup>0-«</sup> - áre ; t $_{1/2}$ – meia vida (	ta sob a curva co de eliminação.	oncentração pla	smática versus te	mpo; C <sub>max</sub> – col	ncentração plasn	lática máxima;

<b>Tabela 34 –</b> Dados i (Grupo DM tipo 2)	ndividuais de	disposição ci	nética enantio:	sseletiva do <i>t</i>	<i>ramadol</i> em p	acientes com	DM tipo 2 port	adores de do	r neuropática
Parâmetro	22	23	24	25	26	27	28	29	30
AUC <sup>0-</sup> " (ng.h/mL)	977,48	834,43	687,83	912,22	1126,88	2665,37	2105,10	966,32	1432,28
	820,32	870,79	2081,70	952,22	1222,86	3423,14	2325,67	744,25	1914,47
C <sub>max</sub> (ng/mL)	143,83	149,04	71,40	146,56	173,15	272,79	144,76	139,20	122,37
	123,71	148,86	66,48	156,81	233,97	300,20	125,13	112,32	128,68
t <sub>max</sub> (h)	1,29	0,89	1,81	1,14	1,26	1,21	3,28	1,33	3,11
	1,31	0,92	1,96	1,15	1,26	1,12	3,31	1,32	3,36
t <sub>½</sub> a (h)	0,14	0,20	0,44	0,17	0,11	0,24	0,63	0,29	0,65
	0,16	0,21	0,42	0,17	0,03	0,18	0,65	0,29	1,61
t <sub>½</sub> α (h)	1,72	0,23	1,33	0,36	0,25	0,87	3,36	0,94	6,18
	0,90	0,24	3,21	0,37	0,25	1,05	3,37	0,95	1,66
t <sub>½</sub> β (h)	6,39	4,95	10,14	5,15	7,54	11,23	66,44	6,16	12,50
	6,09	5,09	113,52	5,07	7,30	13,76	110,80	6,23	16,58
Cl <sub>T</sub> (L/h)	51,15	59,92	72,69	54,81	44,37	18,76	23,75	51,74	35,13
	60,95	57,42	24,02	52,51	40,89	14,61	21,50	67,18	26,12
Vd/F (L)	382,30	398,16	878,56	384,20	382,28	271,45	1293,20	400,39	313,96
	480,85	392,59	3274,66	361,15	407,81	262,37	2227,94	512,65	446,82
AUC <sup>0-∞</sup> (+)/(-)	1,19	0,96	0,33	0,96	0,92	0,78	0,91	1,30	0,74
Linhas sombreadas = (+)	<i>-tramadol</i> ; linhas	não sombreada	<pre>is = (-)-tramadol;</pre>	AUC <sup>o-°°</sup> - área sc	ob a curva conce	intração plasmátio	ca versus tempo;	C <sub>max</sub> – concentra	ação plasmática

máxima;  $t_{max}$  – tempo para alcançar  $C_{max}$ ;  $t_{2/a}$  – meia vida de absorção;  $t_{2/a}$  – meia vida de distribuição;  $t_{2/a}$  – meia vida de eliminação; C/F – *clearance* total aparente. Vd/F – volume de distribuição aparente.

<b>Tabela 35 –</b> Dados (Grupo DM tipo 2)	individuais d	e disposição (	cinética enant	tiosseletiva do	o M1 em pac	sientes com DI	M tipo 2 porta	adores de dor	neuropática
Parâmetro	22	23	24	25	26	27	28	29	30
AUC <sup>0</sup> (ng.h/mL)	587,69	303,81	475,47	732,65	512,76	1398,33	538,65	583,70	222,44
	599,57	325,97	308,02	459,48	342,68	493,82	482,38	475,96	172,89
C <sub>max</sub> (ng/mL)	48,56	36,39	72,81	62,12	32,84	46,22	57,54	58,50	15,01
	57,95	40,58	46,88	45,74	26,24	23,06	47,60	47,79	14,62
t <sub>max</sub> (h)	2,21	2,91	1,88	1,31	2,73	1,40	4,92	0,99	4,94
	1,99	1,51	1,98	0,96	2,22	0,71	4,05	1,19	3,78
t <sub>½</sub> f (h)	0,35	1,49	0,41	0,15	0,44	0,12	1,53	0,08	1,72
	0,29	0,26	0,46	0,03	0,28	0,02	0,63	0,13	1,14
t <sub>½</sub> (h)	7,20	2,84	3,38	7,56	9,30	20,34	3,36	6,53	6,31
	6,16	4,70	3,31	6,80	8,02	14,69	5,27	6,36	5,40
AUC <sup>0-∞</sup> (+)/(-)	0,98	0,93	1,54	1,59	1,50	2,83	1,12	1,23	1,29
Linhas sombreadas = (+)- t <sub>max</sub> – tempo para alcançaı	·M1; linhas não r C <sub>max</sub> ; t½f– meia	sombreadas = (- i vida de formação	)-M1; AUC <sup>0-∞</sup> - á ɔ; t <sub>½</sub> – meia vida	rea sob a curva de eliminação.	concentração pl	asmática versus t	empo; C <sub>max</sub> – co	ncentração plasr	nática máxima;

l abela 30 - Dados In (Grupo DM tipo 2)	aiviquais de	aisposiçao cir	ielica enantio	osseietiva do	w∠ em pacie	ntes com um	upo z porta	adores de dor	neuropauca
Parâmetro	22	23	24	25	26	27	28	29	30
AUC <sup>0-∞</sup> (ng.h/mL)	263,73	436,15	57,83	529,85	772,39	614,09	162,23	80,12	670,54
	55,95	78,05	13,01	74,34	94,51	96,77	40,80	17,26	147,37
C <sub>max</sub> (ng/mL)	23,71	48,25	5,95	35,54	41,78	34,07	18,94	11,09	43,75
	8,92	12,90	1,84	9,59	9,29	8,57	5,50	3,56	12,61
t <sub>max</sub> (h)	1,56	1,52	1,88	2,11	1,84	2,27	4,79	1,31	5,95
	1,36	0,89	1,83	1,36	1,41	2,07	3,97	0,97	4,27
t <sub>i∕2</sub> f (h)	0,14	0,22	0,26	0,38	0,14	0,35	1,23	0,15	2,47
	0,12	0,02	0,37	0,19	0,07	0,30	0,80	0,09	1,37
t <sub>½</sub> (h)	7,12	5,46	5,83	8,99	12,17	11,16	3,31	4,43	5,55
	3,91	4,07	3,80	4,69	6,74	6,77	3,26	3,02	4,95
AUC <sup>0-∞</sup> (+)/(-)	4,71	5,59	4,45	7,13	8,17	6,35	3,97	4,64	4,55
Linhas sombreadas = (+)-M t <sub>max</sub> – tempo para alcançar C	2; linhas não sc ồ <sub>max</sub> ; t <sub>i₂</sub> f – meia v	ombreadas = (-)- vida de formação	M2; AUC <sup>0-∞</sup> - ár ); t <sub>½</sub> – meia vida	ea sob a curva c de eliminação.	oncentração pla	smática versus te	:mpo; C <sub>max</sub> – co	ncentração plasn	lática máxima;

# Anexos

### ANEXOS

## ANEXO A – Ofício de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP



# ANEXO B – Ofício de aprovação do projeto pela Direção Acadêmica de Ensino e Pesquisa do Centro de Saúde Escola – Sumarezinho da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP



Ribeirão Preto, 15 de outubro de 2009

# DIREÇÃO ACADÊMICA DE ENSINO E PESQUISA LIBERAÇÃO DE PESQUISA REFERENTE AO PROTOCOLO Nº.35/2009

Comunicamos que a pesquisadora, **NATÁLIA VALADARES DE MORAES**, cumpriu as exigências operacionais e legais, podendo dar início à coleta de dados no Ambulatório de Diabetes do Centro de Saúde Escola –Sumarezinho da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para o trabalho **"INFLUÊNCIA DO DIABETES MELITO TIPO 1 NA FARMACOCINÉTICA E METABOLISMO ENANTIOSSELETIVOS DO TRAMADOL. PK-PD EM PACIENTES COM DOR NEUROPÁTICA "**.

Atenciosamente, hend

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Célia Mendes** Diretora Acadêmica de Ensino e Pesquisa do CSE-FMRP-USP

Ilma. Sra. **Prof<sup>a</sup>. Dra. Vera Lucia Lanchote (Orientadora)** Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto- USP.

## ANEXO C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO - UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Campus Universitário Monte Alegre – RIBEIRÃO PRETO – SP

# PESQUISA CIENTÍFICA TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

NOME DA PESQUISA: "INFLUÊNCIA DO DIABETES MELITO TIPO 1 E TIPO 2 NA FARMACOCINÉTICA E METABOLISMO ENANTIOSSELETIVOS DO TRAMADOL. PK-PD EM PACIENTES COM DOR NEUROPÁTICA"

**RESPONSÁVEL CLÍNICO:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gabriela Rocha Lauretti (FMRP-USP).

**OBSERVAÇÕES:** Projeto Integrado entre a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP e a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

# TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O diabetes melito pode ter várias causas, e é caracterizado pelos altos níveis de glicose no sangue, Um dos sintomas que o paciente diabético pode apresentar é chamado de dor neuropática, A dor neuropática é um tipo de dor crônica que ocorre principalmente nas pernas dos pacientes diabéticos, O tratamento da dor neuropática no diabético por ser feito pelo remédio tramadol, O nosso estudo tem como objetivo entender como esse remédio é distribuído e eliminado do seu organismo,

Convidamos o Sr(a) a participar desta pesquisa e garantimos a sua liberdade de retirar seu consentimento em qualquer momento da pesquisa,

Esta pesquisa tem duração total de 1 dia e meio, Para que você possa participar dela nós iremos colher, caso você concorde, 3 tubos de sangue de 5 mL cada um (uma colher de sopa) da veia do seu braço para verificar se as funções do seu fígado e dos seus rins estão normais e se seu organismo é capaz de eliminar o remédio para tratar a dor neuropática, No dia da internação, você deverá comparecer ao Hospital em jejum de 8 horas, Ao ser internado, você irá tomar 100 mg de tramadol por boca, Após isso, nós vamos fazer alguns exames de sangue para dosar o remédio durante a sua internação, Nós iremos coletar amostras de 5 ml de sangue várias vezes (cerca de 15 vezes) com seringa da veia do seu braço, Um tubinho de plástico será colocado dentro da sua veia, assim nós iremos picar você uma única vez, A picada causa leve dor, de curta duração, e o local da picada pode ficar com a cor arroxeada, Pode acontecer de aparecerem efeitos não desejados como náuseas, tontura, cansaço, fadiga, vômito e boca seca, Se isso ocorrer, nós iremos tratá-lo aqui mesmo no hospital e iremos interromper a pesquisa,

Depois de 24 horas, o senhor(a) irá tomar os remédios midazolam e metoprolol por boca, Esses dois remédios serão utilizados para entender melhor como o senhor(a) elimina o tramadol, Necessitaremos de obter mais amostras de sangue (cerda de 8 vezes) para dosar os remédios, Nessa fase também necessitaremos da coleta da urina até 8 horas depois de tomar os remédios,

A sua colaboração vai aumentar o nosso conhecimento de como os remédios para tratar a dor neuropática são eliminados pelo corpo, Isto poderá ajudar no melhor tipo de tratamento para os pacientes diabéticos,

1. A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa e o tratamento a que serei submetido (a);

2. A liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar no estudo sem que isso traga prejuízo à continuação do meu cuidado e tratamento;

3. O compromisso de me proporcionar informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar minha vontade de continuar participando;

4. Os pesquisadores se comprometem a manter sigilo da sua participação e de publicar os resultados da pesquisa para a comunidade médica e científica pertinente;

5. A disponibilidade de tratamento médico e a indenização que legalmente teria direito, por parte da Instituição à saúde, em caso de danos que a justifiquem, diretamente causados pela pesquisa,

Tenho ciência do exposto acima e desejo o produto como método terapêutico recomendado pelo médico que subscreve este documento,

Ribeirão Preto,..... de.....de 20....

Assinatura do voluntário ou de seu responsável

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gabriela Rocha Lauretti Pesquisador Responsável CRM 74.245

Telefones para contato: Natália Valadares de Moraes (16) 3602 4195 e (16) 8149 3600

Dra. Gabriela R Lauretti (16) 9176 6266

TESTEMUNHAS NÃO LIGADAS À PESQUISA:

1-\_\_\_\_\_

assinatura

identificação

2-\_\_\_\_\_

assinatura

identificação