

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Avaliação das Concentrações Plasmáticas e Teciduais de Vildagliptina
em Ratos Diabéticos e Sadios através de Microdiálise**

CRISTIANE DE ANDRADE

PORTO ALEGRE, 2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS E TECIDUAIS DE
VILDAGLIPTINA EM RATOS DIABÉTICOS E SADIOS ATRAVÉS DE
MICRODIÁLISE**

Dissertação apresentada por Cristiane de Andrade para
obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Bibiana Verlindo de Araújo

Porto Alegre, 2013

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 22 de março de 2013, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Andréia Diniz, Universidade Estadual de Maringá

Profa. Dr. Cássia Virgínia Garcia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Leandro Tasso, Universidade de Caxias do Sul

de Andrade, Cristiane
AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS E
TECIDUAIS DE VILDAGLIPTINA EM RATOS DIABÉTICOS E
SADIOS ATRAVÉS DE MICRODIÁLISE / Cristiane de
Andrade. -- 2013.
119 f.

Orientador: Bibiana Verlindo de Araujo.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto
Alegre, BR-RS, 2013.

1. Farmacocinética. 2. Microdiálise. 3. Diabetes.
4. Fármacos inibidores da DPP-4. I. Verlindo de
Araujo, Bibiana, orient. II. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Centro Bioanalítico de Medicamentos e no Laboratório 405 da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com financiamento do CNPq. O autor recebeu bolsa de estudos da CAPES.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Bibiana Verlindo de Araújo pela orientação nessa dissertação, pela paciência, confiança e incentivo do meu trabalho.

À Profa. Dra Teresa Dalla Costa pela oportunidade e confiança concedidos a partir do terceiro semestre e durante toda a graduação para participar em seus projetos de pesquisa como aluna de iniciação científica.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas e da Faculdade de Farmácia pelas contribuições na minha formação profissional.

As queridas Clarissa Bettoni e Sandra Hass pelo crescimento profissional e pessoal proporcionados, pela amizade, companheirismo e apoio em todos os momentos.

Aos colegas e amigos do laboratório 405 pela amizade, colaboração e momentos de descontração.

Aos colegas e amigos farmacocinéticos: Bruna Torres, Estevan Zimmermann, Felipe Hurtado, Fernanda Galves, Francine Johansson, Graziela Lock, Jaqueline Izolan, João Victor Laureano, Karina Paese, Maiara Pigatto e Sandra Hass meu muito obrigada pelos momentos de descontração, de amizade, de incentivo, de companheirismo, de discussões científicas e pela ajuda em experimentos.

À querida companheira de experimentos Graziela de Araújo Lock pela dedicação, responsabilidade e incentivo nos momentos difíceis.

Aos meu pais Margarete e Cleber, pela formação pessoal e profissional que me proporcionaram, pelo carinho, amor, paciência, pelo constante e incansável incentivo nos estudos, pelo apoio em minhas decisões e por acreditarem em mim.

Aos meus tios, primos e avós pelo carinho, momentos de descontração e pela torcida pelo meu sucesso.

Ao meu namorado Marcel Dornelles pelo companheirismo, amor, amizade, paciência e pelo apoio incansável em todos os momentos.

À família Almeida Dornelles pelo acolhimento, momentos de descontração, amizade e carinho.

RESUMO

Objetivo: Avaliar a farmacocinética da vildagliptina em animais sadios e diabéticos, através da análise dos níveis plasmáticos totais e livres teciduais, empregando-se a técnica de microdiálise. **Metodologia:** A doença foi induzida nos animais através da administração de 42mg/kg de aloxano através da via intravenosa (i.v.). A vildagliptina foi administrada nas doses de 50 mg/kg (n = 6) e 75 mg/kg (n = 6) via i.v. nos animais diabéticos e na dose de 50 mg/kg (n = 6) nos animais sadios. As concentrações plasmáticas foram quantificadas por CLAE-EM-EM em método desenvolvido e validado. A ligação às proteínas plasmáticas foi determinada por microdiálise, assim como a avaliação tecidual. As sondas de microdiálise foram calibradas *in vitro* através de diálise e retrodiálise e *in vivo* utilizando retrodiálise. Para determinação das concentrações teciduais, uma segunda metodologia foi desenvolvida e validada em CLAE-EM-EM. Avaliações compartimentais (software Scientist ®) e não compartimentais (software Excel ®) foram realizadas. **Resultados e Discussão:** A ligação as proteínas plasmáticas apresentou um valor médio de 9,44 % \pm 3,23, condizente com valores encontrados na literatura. Os valores de K_e , *clearance*, tempo de meia vida, MRT e VD_{ss} não apresentaram diferença estatística significativa entre as diferentes doses administradas nos animais diabéticos e entre os animais sadios. As calibrações *in vitro* por diálise e retrodiálise apresentaram uma recuperação média de 30%, sem diferença estatística entre as duas metodologias empregadas ($\alpha = 0,05$). A recuperação *in vivo* também apresentou o mesmo valor médio de recuperação. A penetração tecidual do fármaco em animais diabéticos para as diferentes doses estudadas apresentou mesmo valor nos tecidos estudados, uma média de 0,20. A penetração tecidual semelhante no animal diabético pode ser devido ao dano similar entre os órgãos sofrido durante a indução da doença. Já os animais sadios apresentaram penetração tecidual similar no músculo sem diferença estatística significativa em relação aos diabéticos, entretanto no fígado foi observada uma penetração quarenta e quatro vezes inferior a observada no músculo. Essa disparidade pode ser atribuída a diferença de expressão de proteínas transportadoras no fígado do animal diabético quando comparado ao sadio. O perfil farmacocinético plasmático foi semelhante entre os dois grupos avaliados, sendo que os parâmetros não diferiram estatisticamente ($\alpha = 0,05$). Foi empregado o modelo de dois compartimentos para prever as concentrações teciduais. A previsão supõe concentrações superiores as encontradas experimentalmente, contradizendo dados de literatura. Esses dados são inéditos na literatura e demonstram a importância da determinação do fármaco em tecidos alvo, uma vez que nem sempre modelos matemáticos conseguem prever a realidade fisiológica. **Conclusões:** As metodologias analíticas para quantificação da vildagliptina em microdialisado e plasma foram desenvolvidas e validadas, seguindo os requisitos do FDA. O perfil farmacocinético plasmático foi adequadamente descrito pelo modelo de 2 compartimentos. Os perfis teciduais obtidos nesse trabalho podem contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos farmacológicos envolvidos e contribuir para futura otimização de terapias.

Palavras-chave: Vildagliptina, CLAE-EM-EM, farmacocinética, microdiálise.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the pharmacokinetics of vildagliptin in healthy and diabetic animals using a microdialysis technique. **Methodology:** Diabetes was induced in animals by administration of 42 mg/kg of alloxan intravenously (iv). Vildagliptin was administered intravenously as 50 mg/kg (n = 6) and 75 mg/kg doses (n = 6) in the diabetic animals and as a 50 mg/kg dose (n = 6) in healthy animals. Plasma concentrations were quantified by a HPLC-MS-MS method developed and validated. The plasma protein binding was determined by microdialysis and tissue evaluation. Microdialysis probes were calibrated *in vitro* using dialysis and retrodialysis and *in vivo* using retrodialysis. A second method was developed and validated using HPLC-MS-MS to determine tissue concentrations. **Results and Discussion:** Mean plasma protein was $9.44\% \pm 3.23$, consistent with values reported in the literature. The values of K_e , clearance, half-life, MRT and V_{dss} showed no statistical difference between the evaluated doses in diabetic animals and between healthy animals ($\alpha = 0.05$). Calibrations *in vitro* by dialysis and retrodialysis showed mean recovery of 30%, with no statistical difference between the two methodologies. Mean recovery *in vivo* also showed the same value. The tissue penetration of the drug in diabetic animals for the different doses studied showed the same value in both tissues studied, an mean of 0.20. The tissue penetration similar in diabetic animals could be due to the similar damage suffered between organs during induction of the disease. The healthy animals showed similar muscle penetration, compared with diabetics animals, although the liver showed a penetration forty four times lower than muscle. This discrepancy can be attributed to differential expression of transporter proteins in the liver of diabetic animals, when compared to the healthy group. The plasma pharmacokinetic profile was similar between the investigated groups, and the parameters did not differ. The two-compartment model was employed to describe the data and used to predict the concentration in the tissues. This is the first study to present these tissue profiles, which presented concentrations below the estimated by the model. These data demonstrate the importance of determining the drug inside the target tissue, as the mathematical models sometimes cannot predict physiology. **Conclusions:** The analytical methods for the quantification of vildagliptin in microdialysate and plasma were developed and validated by following the requirements of the FDA. The plasma pharmacokinetic profile was correctly described by the model of two compartmental models. The novel tissue profiles obtained in this study may contribute to a better understanding of the pharmacological mechanisms involved and contribute to optimization of future therapies.

Keywords: Vildagliptin, HPLC-MS-MS, pharmacokinetics, microdialysis.

LISTA DE FIGURAS
REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1. Estrutura da Metformina.....	29
Figura 2. Estrutura das sulfoniluréias, glimepirida, glibenclamida, glicazida e glipizida	31
Figura 3. Estruturas da nateglinida e repaglinida.....	32
Figura 4. Estrutura da acarbose.....	32
Figura 5. Estruturas da rosiglitazona (A) e pioglitazona.....	34
Figura 6. Estrutura dos inibidores da enzima DPP-4.....	36
Figura 7. Sonda de microdiálise de formato concêntrico.....	39

CAPITULO 2

Figure 1. Molecular structure of vildagliptin.....	50
Figure 2. Parent and son structures and blank chromatograms of vildagliptin and cimetidine	54
Figure 3. Mean plasma concentration of vildagliptin after intravenous administration of 50 mg/kg in male diabetic <i>Wistar</i> rats.....	57

CAPITULO 3

Figure 1. Representative HPLC chromatograms. Blank chromatogram, point of the analytical curve and the structure of the parent and son ion are shown.....	73
Figure 2. Mean liver and muscle concentration of vildagliptin after intravenous administration of 50 mg/kg of vildagliptin.....	73

CAPÍTULO 4

Figure 1. Plasma and tissues experimental data and the prediction by the mathematical model employed after the administration of vildagliptin at the doses of 50 mg/kg, 75 mg/kg in the diabetic group and 50 mg/kg in the healthy animals89

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	5
RESUMO	7
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	11
INTRODUÇÃO	15
OBJETIVOS	21
CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA	25
1. Diabetes tipo 2	27
2. Tratamentos orais existentes para o controle da doença	29
2.1 Biguanidas	29
2.2 Sulfoniluréias	29
2.3 Glinidas ou meglitinidas	31
2.4 Inibidores da alfa-glicosidase	32
2.5 Tiazolidinedionas	33
2.6 Terapia com incretinas	34
2.7 Inibidores da DPP-4	35
3. Microdiálise	38
4. Modelagem farmacocinética-farmacodinâmica (PK-PD)	41
CAPÍTULO 2: Determination of vildagliptin in diabetic rat plasma by liquid chromatography – mass spectrometry: application to pharmacokinetic study	47
CAPÍTULO 3: A novel liquid chromatography method coupled with mass detector for the quantification of vildagliptin in liver and muscle	59
CAPÍTULO 4: Free tissue concentrations of vildagliptin in muscle and liver of healthy and diabetics rats: a first investigation on the influence of the disease in tissue distribution of antidiabetics	75
DISCUSSÃO GERAL	95
CONCLUSÕES.	101
REFERÊNCIAS	105
ANEXOS	115

INTRODUÇÃO

O diabetes é uma doença crônica caracterizada por um quadro de hiperglicemia, acompanhado de distúrbios no metabolismo de carboidratos, proteínas e gorduras. Os efeitos crônicos da doença incluem dano, disfunção ou falência de órgãos, principalmente rins, sistema nervoso central, coração e vasos sanguíneos (Schmidt, 2006). O tipo II da doença (DM2) é caracterizado por secreção de insulina inferior as necessárias para manutenção das concentrações de glicose plasmáticas, ou secreção normal de insulina, com a presença de células resistentes ao hormônio (Inzucchi *et al.*, 2008).

No Brasil, estimativas apontam para um universo de 6,5 milhões de pacientes com mais de 30 anos portadores da doença, o que trás como consequência um alto custo em saúde para o governo.

Os tratamentos utilizados na clínica da diabetes tipo 2 são associados com efeitos colaterais significativos e problemas de resistência, o que leva a associação de fármacos, aumentando efeitos adversos. O desenvolvimento de novas terapias e otimização de tratamentos já existentes que promovam o controle glicêmico com perfis plasmáticos mais constantes e menores efeitos adversos têm sido de grande interesse dos pesquisadores.

Nesse contexto as incretinas, descobertas em 1930 (Baggio & Drucker, 2007), contribuíram para o surgimento de uma nova abordagem terapêutica. Por serem peptídeos intestinais que aumentam a concentração de insulina pós prandial, contribuindo com 50 a 70% dessa resposta (Taharani *et al.*, 2010), diversas abordagens na tentativa de melhorar a compreensão dos mecanismos bioquímicos envolvidos nesse controle insulínico.

O principal peptídeo é a incretina glucagon-símile 1- GLP-1-(*glucagon like* -1), secretada a partir das células L no íleo distal e no cólon. A GLP-1 potencializa a secreção de insulina e suprime a secreção de glucagon de forma glicose-dependente, também atuando na diminuição do esvaziamento gástrico, reduzindo a ingestão de alimento e aumentando a sensibilidade à insulina (Baggio & Drucker, 2007).

Embora os níveis de GLP-1 estejam reduzidos em pacientes com diabetes mellitus tipo 2, sua resposta a GLP-1 exógena permanece intacta. Entretanto, essa incretina é rapidamente degradada pela dipeptidil peptidase-4 (DPP-4) (Baggio & Drucker, 2007). Essa enzima é amplamente expressa

em fígado, rins, pulmões, pâncreas, intestino e linfócitos (Phillips et al., 2012). Essa ampla distribuição sugere que a maior parte da GLP-1 secretada é rapidamente clivada após sua secreção, justificando seu tempo de meia-vida de 1-2 minutos, o que é limitante para a terapia com incretinas (Gautier et al., 2008).

Dois estratégias farmacológicas foram desenvolvidas para aumentar a concentração de GLP-1: 1) a utilização de agonistas dos receptores de GLP-1, representados pelo Exenatide e 2) os inibidores da dipeptidil-peptidase-4 (DPP-4), enzima responsável pela rápida degradação do GLP-1.

Os inibidores da DPP-4 podem ser divididos em compostos que mimetizam a estrutura da enzima, representados pela Sitagliptina, Saxagliptina e Vildagliptina. Outra divisão da classe, de compostos que não apresentam semelhança estrutural com a DPP-4, são representados pela alogliptina e pela linagliptina (Deacon, 2011).

Devido as diferenças estruturais, os fármacos sitagliptina, alogliptina e linagliptina formam interações não-covalentes com o sítio ativo da DPP-4. Por outro lado, a vildagliptina e saxagliptina ligam-se na enzima através de duas etapas, o que leva a formação de um complexo covalente enzima-inibidor reversível que é gerado e dissociado de forma lenta. Com isso, a atividade catalítica continuará inibida mesmo após o fármaco livre ser eliminado da circulação, explicando as atividades inibidoras da enzima DPP-4 pela vildagliptina e saxagliptina por tempos superiores aos sugeridos pelo tempo de meia-vida dos fármacos. Devido a isso, a duração da ação e a frequência de doses requerem maiores ajustes com esses fármacos (Deacon, 2011).

O estudo conduzido por Landersdorfer et al., 2011 mostrou alta afinidade de ligação entre a vildagliptina e a DPP-4, assim como dissociação paralela do fármaco com a enzima por um processo lento de primeira ordem. Os resultados desse trabalho, provenientes de modelagens a partir de dados plasmáticos, também indicaram que a capacidade inibitória da DPP-4 pela vildagliptina nos tecidos deve ser maior que a inibição observada no plasma, devido a maior expressão tecidual da enzima nos tecidos.

Apesar do ganho considerável na descoberta e disponibilidade clínica desses novos fármacos, muito ainda tem que ser pesquisado no sentido de otimizar as terapias com esses agentes, uma vez que o tratamento com

fármacos antidiabéticos requer uso continuado dos pacientes, e dessa forma, está sujeito as falhas de efetividade relacionadas a não adesão. Nesse contexto, não existem relatos na literatura sobre a distribuição tecidual do fármaco, fundamentais para uma compreensão completa da farmacocinética nos órgãos alvo da vildagliptina. Como o fármaco não possui um órgão alvo, e sim uma enzima alvo, a DPP-4, a avaliação tecidual pode ser realizada em qualquer órgão que expressa essa enzima. Essa determinação torna-se particularmente importante quando se considera que a DPP-4 é muito mais expressa em tecidos comparando-se com o plasma (Landersdorfer et al., 2011).

Considerando que a maioria dos eventos bioquímicos e farmacológicos ocorrem nos receptores presentes nos tecidos, a investigação dessas respostas em órgãos expressantes da DPP-4 também pode auxiliar na melhor compreensão dos mecanismos existentes, podendo contribuir na futura otimização de terapias (Chaurasia et al., 2007).

Outra questão importante no sentido de futura otimização de terapias, é a avaliação da influência da diabetes na farmacocinética de antidiabéticos, que poderia elucidar possíveis mecanismos enzimáticos ou de permeabilidade tecidual associados à doença, os quais poderiam influenciar os desfechos dos tratamentos com esses fármacos.

Considerando o exposto, a presente dissertação foi dividida em capítulos. No primeiro capítulo é exposta a revisão de literatura. Nos dois capítulos seguintes estão descritos artigos mostrando os métodos analíticos utilizados para o tratamento do fármaco em plasma e nos tecidos analisados, músculo e fígado em animais diabéticos. No quarto capítulo é mostrado um artigo com a comparação dos níveis teciduais alcançados nos tecidos em animais sadios e diabéticos, assim como a avaliação farmacocinética. No último capítulo dessa dissertação a discussão geral será abordada.

A idéia geral do trabalho é avaliar o nível de exposição tecidual alcançado pela vildagliptina em animais sadios e diabéticos, aplicando uma abordagem inovadora através de microdiálise nos tecidos muscular e hepático que ainda não dispõe de dados presentes na literatura. De posse desses dados, os níveis de efeito esperado nos tecidos pode ser modelado

com base nos modelos de inibição máxima descritos na literatura para a vildagliptina.

OBJETIVOS

O objetivo geral do presente trabalho foi avaliar a farmacocinética da vildagliptina em animais sadios e diabéticos, através da análise dos níveis plasmáticos totais e livres teciduais, empregando-se a técnica de microdiálise.

Objetivos específicos

- ✓ Desenvolver metodologias analíticas para quantificação do fármaco nos tecidos e em plasma através de espectrometria massa-massa;
- ✓ Avaliar a farmacocinética plasmática e tecidual hepática e muscular da vildagliptina em ratos diabéticos induzidos por aloxano, para determinação dos parâmetros farmacocinéticos nesses animais, após administração das doses de 50 e 75 mg/kg pela via intravenosa;
- ✓ Avaliar a farmacocinética plasmática e tecidual hepática e muscular da vildagliptina em ratos sadios, para determinação dos parâmetros farmacocinéticos nesses animais, após administração da dose de 50 mg/kg via intravenosa;
- ✓ Analisar a influência da condição diabética induzida quimicamente nos animais sobre a penetração do fármaco nos tecidos investigados e estabelecer a relação entre as concentrações plasmáticas e as teciduais alcançadas em tecidos de animais sadios e diabéticos.

Capítulo 1

REVISÃO DE LITERATURA

1. Diabetes tipo 2

A Diabetes tipo 2 é uma doença crônica caracterizada pela insuficiência em produzir insulina associada a diminuição da resposta insulínica em órgãos alvo, principalmente músculos, gordura e fígado. A doença é caracterizada por resistência insulínica, hiperglicemia e alto índice de lipídeos circulantes. Em estágios avançados da doença, também pode ocorrer perda de células β pancreáticas (Copparl e Bjorbaek, 2012). O tipo 2 da doença corresponde a uma prevalência maior do que 90% entre as diabetes (Cornelis e Hu, 2012).

Pessoas com diabetes possuem maior risco de desenvolver doenças micro e macrovasculares, doenças cardíacas como hipertensão e hiperlipidemia. Esses fatores contribuem para aumentar as chances de desenvolver outras doenças e aumentam o risco de morte, o que é oneroso para o sistema de saúde. Dados do sistema de saúde dos Estados Unidos apontam para um gasto com diabéticos superior em 1,5 a 2,0 vezes comparado a pacientes sem a doença (Simpson et al., 2003). A incidência de doença arterial coronariana em pacientes diabéticos é 90% maior após os 55 anos de idade do que pacientes sem a doença. Nos Estados Unidos, 40% dos pacientes diagnosticados com diabetes não conseguem manter níveis glicêmicos dentro dos limites fisiológicos e 80% dos diabéticos não conseguem manter a pressão arterial e o colesterol dentro dos limites preconizados pela American Diabetes Association (Coppari e Bjorbaek, 2012).

O mecanismo pelo qual a doença se desenvolve ainda não é consenso, mas diversos fatores ambientais e genéticos podem aumentar o risco de desenvolver o tipo 2 da doença. Estudos epidemiológicos demonstram que o estilo de vida do paciente tem grande contribuição no desenvolvimento da doença. Pode-se observar na população que o crescimento epidemiológico da diabetes é acompanhado pelo crescimento da população obesa. O sedentarismo também está associado à doença, assim como alimentação com pobre qualidade nutricional. Alta ingestão de gorduras trans e saturadas, assim como consumo excessivo de açúcar podem

aumentar o risco. O tabagismo também é considerado um grande fator de risco para a doença (Cornelis e Hu, 2012).

A genética também é considerada um fator determinante para o desenvolvimento da doença. Considera-se que 30 a 70% do risco em desenvolver diabetes do tipo 2 está associada a herança genética. Nossos genes contém informações que consideram que nossa alimentação é a mesma que nossos ancestrais, sem *fast foods*, embutidos, ingesta acentuada de etanol, excesso de gordura e açúcares, também considera que atividade física faz parte da rotina de sobrevivência. A associação de fatores de risco alimentares e genéticos, muito comuns atualmente, pode aumentar consideravelmente as chances de desenvolver a doença (Cornelis e Hu, 2012).

O crescente número de obesos é preocupante, uma vez que o tecido adiposo é a maior fonte de estoque de triglicerídeos no organismo, o que contribui significativamente para o metabolismo de nutrientes em vários tecidos e influencia a concentração de ácidos graxos livres e de glicose. A clonagem da leptina e adiponectina ocorridas nos anos 90 forneceu a ideia do tecido adiposo como um órgão secretor que modula sua função e de outros tecidos periféricos, principalmente os hormonais. A interrelação entre os sistemas imunes e metabólicos podem ter um papel crítico na patogênese da diabetes e da diabetes tipo 2 (Sun, 2012).

Quando ocorre aumento exagerado do volume de gordura corporal, começa o desenvolvimento de hiperlipidemia e hiperinsulinemia. Nesse estágio ocorre intolerância à glicose e resistência insulínica no fígado, músculo e tecido adiposo (Sun, 2012).

Apesar do progresso em entender os fatores de risco associados ao diabetes, ela continua sendo uma das causas de morbidade e mortalidade em países desenvolvidos. Custos públicos com a doença vão continuar crescendo, uma vez que é projetado mundialmente um universo de 366 milhões de pessoas com a doença em 2030 (Cornelis e Hu, 2012).

Além das dificuldades relacionadas ao número crescente de pacientes diabéticos, os tratamentos clássicos para controle glicêmico geralmente envolvem ganho de peso, desconfortos gastrintestinais e hipoglicemia, o que dificulta, muitas vezes, a adesão dos pacientes e um controle glicêmico

adequado, o que pode intensificar as co-morbidades associadas com a doença.

2. Tratamentos orais existentes para o controle da doença

2.1 Biguanidas

A metformina é o fármaco da classe mais empregado em pacientes com sobrepeso e está presente na RENAME 2012. O mecanismo de ação consiste em suprimir a produção de glicose hepática, aumentar a sensibilidade insulínica, aumentar a internalização de glicose e a oxidação de ácidos graxos, diminuir a absorção de glicose do trato gastrointestinal e aumentar o *clearance* da glicose em tecidos periféricos (Collier et al., 2006; Olokoba, 2012). Os principais efeitos adversos são desconfortos gastrointestinais, como enjôos e cólicas intestinais (Taharani et al., 2010).

O fármaco possui em média uma meia vida plasmática de 5,5 horas e picos plasmáticos em torno de 2 horas ($t_{máx}$) após a administração oral (TUCKER et al., 1981).

A estrutura da metformina pode ser visualizada na figura 1.

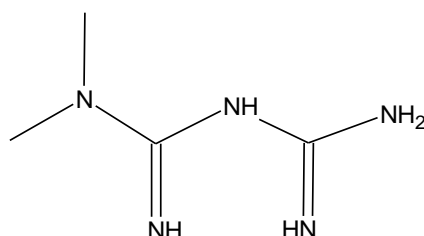


Figura 1. Estrutura da metformina

2.2 Sulfoniluréias

Os principais representantes da classe são a glibenclamida e gliclazida, presentes na RENAME 2012, glimepirida e glipizida. A classe também possui elevado emprego, assim como a metformina. O principal mecanismo de ação consiste na secreção de insulina através da ligação nos receptores de

sulfoniluréia (SUR-1), presentes nas células pancreáticas (Taharani et al., 2010).

Esses receptores possuem canais ligantes de ATP sensíveis a potássio. Quando a atividade do canal é diminuída, há liberação de insulina na corrente sanguínea. Dessa forma, as sulfoniluréias ligam-se ao SUR-1, resultando em fechamento dos canais e liberação de insulina de forma glicose-dependente (Kang et al., 2011). O maior efeito colateral é o ganho de peso e hipoglicemia, por esse motivo, sua utilização requer maior monitoramento principalmente em pacientes com risco de hipoglicemia, incluindo pacientes com dano renal e idosos (Taharani et al., 2010). Há relatos de perda de massa das células β pancreáticas, com conseqüente perda de resposta ao fármaco, com o uso dessa classe, sendo que o efeito foi mais pronunciado com a glimepirida (Del Prato et al., 2007).

Quanto a farmacocinética, a glibenclamida apresenta um $t_{m\acute{a}x}$ médio de 3,5 horas e um tempo de meia vida médio de 3 horas (Coppack et al., 1990). A gliclazida possui um $t_{m\acute{a}x}$ e tempo de meia vida médios de 3 horas e 12,5 horas, respectivamente (Davies et al., 2000).

A glimepirida possui um $t_{m\acute{a}x}$ é de 1 hora e tempo de meia vida de 5 horas (Massi-Benedetti, 2003). Já a glipizida apresenta um $t_{m\acute{a}x}$ de aproximadamente 2 horas e um tempo de meia vida médio de 5 horas (Groop et al., 1985).

Como é possível observar, as sulfoniluréias mostradas possuem tempos para atingir a concentração máxima e tempos de meia vida semelhantes, sendo exceção a gliclazida que apresenta um tempo de meia vida significativamente superior aos outros compostos. Esse fato se deve principalmente a diferença de afinidade aos diferentes sítios do receptor SUR-1 (A e B) no qual os fármacos se ligam. Essa diferença de afinidade pode ser explicada pela diferente estrutura desses compostos, como pode ser observado na figura 2.

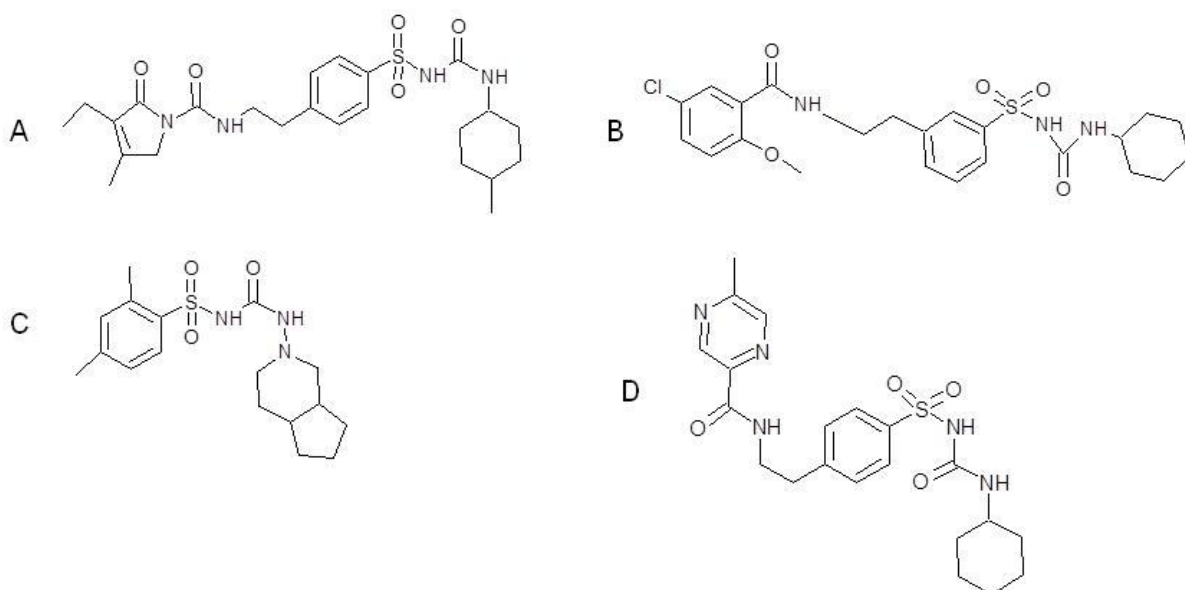


Figura 2. Estrutura das sulfoniluréias, glimepirida (A), glibenclamida (B), glicazida (C) e glipizida (D).

A glicazida, por possuir uma conformação diferenciada em relação aos outros fármacos da classe, liga-se apenas ao sítio A, enquanto que a glibenclamida, glipizida e glimepirida ligam-se em ambos os sítios, justificando as diferenças comentadas anteriormente (Seino et al., 2012).

2.3 Glinidas ou meglitinidas

O principal mecanismo de ação da nateglinida e repaglinida, principais representantes da classe, é o estímulo para secreção de insulina pelas células beta pancreáticas, de forma similar as sulfoniluréias (Luna et al., 2001). A diferença entre as classes é o local de ligação ao receptor, já que a nateglinida liga-se ao sítio A e a repaglinida liga-se ao sítio B do receptor SUR-1. Essa diferença no sítio de ligação também é associada a estrutura das moléculas, como pode-se observar na figura 3 (Seino et al., 2012).

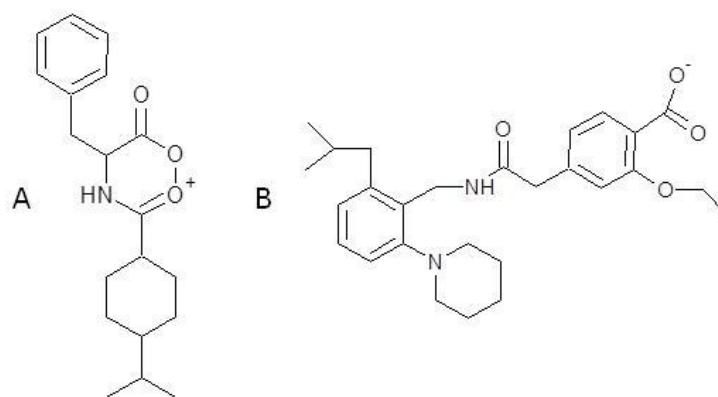


Figura 3. Estruturas da nateglinida (A) e repaglinida (B).

Apesar das diferenças estruturais presentes entre os compostos, a farmacocinética é similar. O $t_{\text{máx}}$ dos fármacos é, em média, de 1 hora e o tempo de meia vida médio de 2 horas (Scott et al., 2012, Zhu et al., 2012).

Esses fármacos possuem como vantagens o baixo risco de hipoglicemia e reduzido tempo de ação. A principal desvantagem da classe é o alto custo do mesmo associado assim como o cuidado que o paciente deve ter na administração. Como a ação ocorre de 15 a 30 minutos, a dose é administrada antes da refeição. Se uma refeição não é realizada ou o paciente ingerir uma refeição extra, deve excluir uma dose e adicionar uma a mais, respectivamente (Luna et al., 2001). Não há representantes da classe na RENAME 2012.

2.4 Inibidores da alfa-glicosidase

O principal representante da classe é a acarbose, um oligossacarídeo complexo. A estrutura desse fármaco pode ser visualizada na figura 4.

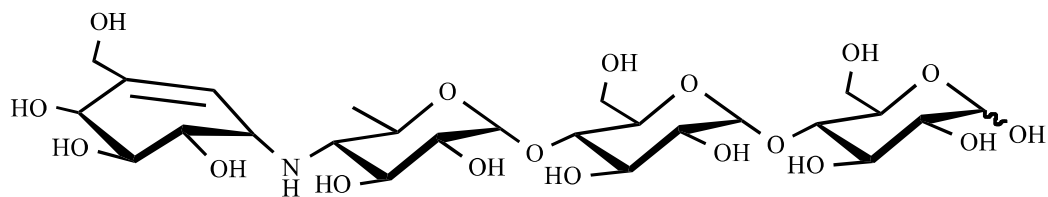


Figura 4. Estrutura da acarbose

A molécula é uma inibidora competitiva das alfa-glicosidases intestinais, o que reduz a absorção de carboidratos, retardando sua digestão, diminuindo os picos de glicose sanguínea no período pós-prandial. Os maiores problemas com a utilização desse medicamento são desconfortos gastrointestinais, como náuseas e cólicas intestinais em grande parte dos usuários (Taharani et al., 2010). Não há representantes da classe na RENAME 2012.

2.5 Tiazolidinedionas

Os principais representantes da classe são a rosiglitazona e a pioglitazona. Esses fármacos são agonistas potentes e altamente seletivos dos receptores gama ativados pelo proliferador de peroxissomo (PPAR γ). Esses receptores são encontrados no tecido adiposo, musculatura esquelética e fígado. O estímulo desses receptores aumenta a captação de glicose através do transportador GLUT-4 (Guo et al., 2006).

A rosiglitazona em geral é bem tolerada pelos pacientes, a única precaução é quanto ao controle da retenção hídrica que pode causar problemas em pacientes com danos cardiovasculares (Wagstaff et al., 2002). Apresenta como características farmacocinéticas um tempo de meia vida que varia de 3 a 4 horas e um $t_{m\acute{a}x}$ médio após administração de 1 hora (Kim et al., 2004, Wagstaff et al., 2002).

A pioglitazona também é bem tolerada pelos pacientes, sendo que ganho de peso e acúmulo de líquido são os efeitos adversos mais comuns (Waugh et al., 2006). Quanto a sua farmacocinética, o tempo necessário para atingir a concentração plasmática máxima após administração oral ($t_{m\acute{a}x}$) é, em média, de 1,5 horas e sua meia vida em torno de 5 horas (Sripalakit et al., 2006).

As estruturas das tiazolidinedionas podem ser observadas na figura 5.

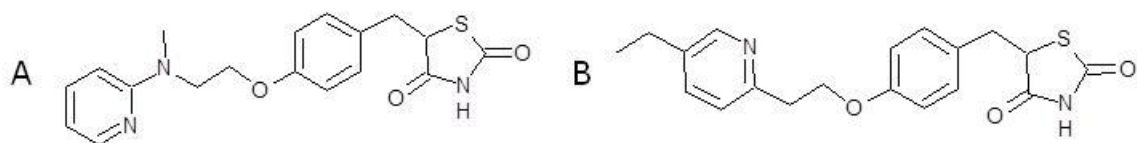


Figura 5. Estruturas da rosiglitazona (A) e pioglitazona (B).

Como é possível observar, além das semelhanças estruturais entre esses compostos, suas características farmacológicas e farmacocinéticas também são muito parecidas (Wagstaff et al., 2002).

2.6 Terapia com incretinas

A descoberta de quais fatores intestinais podem ser secretados em resposta a nutrientes e capazes de diminuir a concentração de glicose sanguínea foi descrita no início de 1900. Esses fatores foram denominados incretinas em 1930 (Baggio & Drucker, 2007). O efeito das incretinas em indivíduos saudáveis é responsável por 50–70% da resposta insulínica pós alimentação (Taharani et al., 2010).

Um desses fatores é o peptídeo-1-glucagon-símile GLP-1-(*glucagon like -1*), uma incretina secretada a partir das células L no íleo distal e cólon. O GLP-1 potencializa a secreção de insulina e suprime a secreção de glucagon de forma glicose-dependente, atuando na diminuição do esvaziamento gástrico, o que reduz a ingestão de alimento e aumenta a sensibilidade à insulina (Baggio & Drucker, 2007).

Embora os níveis de GLP-1 estejam reduzidos em pacientes com diabetes mellitus tipo 2, sua resposta a incretina exógena permanece a mesma. A utilização de agonistas dos receptores de GLP-1, representados pelo exenatide liraglutida é empregada em alguns casos. Entretanto, essa incretina é rapidamente degradada pela enzima dipeptidil peptidase-4 (DPP-4) (Baggio & Drucker, 2007). Essa enzima é amplamente expressa em tecidos como o cérebro, pulmões, rins, pâncreas, intestino, linfócitos e fígado, o que poderia explicar a rápida clivagem do GLP-1 observada nesses

diversos tecidos, e seu tempo de meia-vida de 1-2 minutos, o que representa um limitante para a terapia com incretinas (Gautier et al., 2008).

Diversas pesquisas foram desenvolvidas com o intuito de promover um aumento dos níveis endógenos do GLP-1, o que foi alcançado através de duas estratégias farmacológicas distintas: 1) utilização de análogos do peptídeo e 2) inibidores da dipeptidil-peptidase-4 (DPP-4), enzima responsável pela rápida degradação do GLP-1 (Gautier et al., 2008).

2.7 Inibidores da DPP-4

A DPP-4 é uma protease amplamente expressa principalmente em fígado, rins, pulmão, intestino, sistema nervoso central, dentre outros órgãos. Existe a possibilidade da enzima possuir outros substratos além das incretinas, mas esses ainda não estão claros e não há efeitos adversos significativos indicando interações com outros sistemas biológicos (Phillips et al., 2012). A característica em comum entre esses fármacos consiste na frequência de dose de uma a duas vezes ao dia, independente do estado alimentar e da manutenção do peso corporal. Essa classe possui como vantagem o fato de ser administrada por via oral, em contraste com os agonistas da GLP-1 (Gibss et al., 2012; Phillips, 2012).

O uso de inibidores da DPP-4 resulta na inibição da enzima em aproximadamente 24 horas, o que torna as concentrações plasmáticas de GLP-1 duas a três vezes maiores que as fisiológicas durante esse período (Phillips, 2012).

Os inibidores da DPP-4 podem ser divididos em compostos que mimetizam os substratos da enzima, cujos representantes são a Sitagliptina, Vildagliptina e Saxagliptina, introduzidos no mercado europeu em 2006, 2007 e 2009, respectivamente, e os compostos que não apresentam semelhança estrutural com a GLP-1, que são representados pela alogliptina e pela linagliptina, recentemente aprovadas pelo FDA (Deacon, 2011; Phillips et al., 2012). Na RENAME 2012 não há representantes da classe. A estrutura desses inibidores pode ser visualizada na Figura 6.

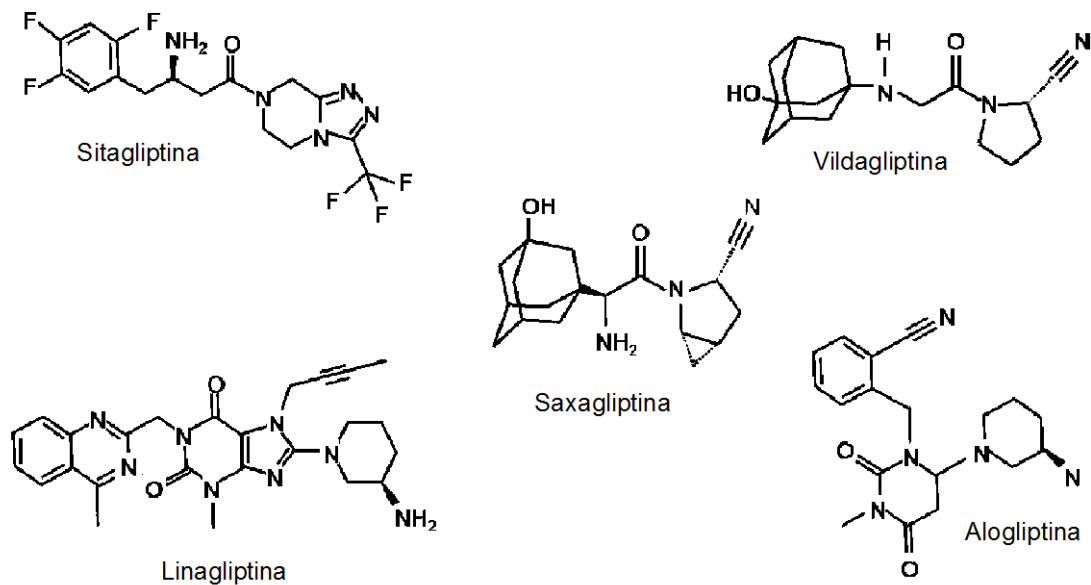


Figura 6. Estrutura dos inibidores da enzima DPP-4. Adaptado de DEACON et al., 2011.

Devido as semelhanças estruturais entre os fármacos sitagliptina, alogliptina e linagliptina, estes formam interações não-covalentes com o sítio ativo da DPP-4. Por outro lado, a vildagliptina e saxagliptina ligam-se na enzima através de duas etapas, o que leva a formação de um complexo covalente enzima-inibidor reversível gerado e dissociado lentamente. Com isso, a atividade catalítica permanece inibida, mesmo após o fármaco ser eliminado do organismo, o que explica a observação da manutenção das atividades inibidoras da enzima DPP-4 pela vildagliptina e saxagliptina por tempos superiores aos sugeridos pelo tempo de meia-vida dos fármacos. Assim, a frequência de doses requer maiores ajustes com esses fármacos (Deacon, 2011).

A sitagliptina é bem tolerada com poucos efeitos adversos. Náuseas e dores de cabeça foram os efeitos mais relatados e hipoglicemia quando associada com metformina. A maior precaução quanto ao uso desse fármaco refere-se a pacientes com insuficiência renal, onde a dose geralmente necessita de ajustes nessas situações (Chan et al., 2008).

As características farmacocinéticas da sitagliptina são baixa ligação às proteínas (aproximadamente 38%) e volume de distribuição de 198 L. Seu

tempo de meia vida ($t_{1/2}$) varia entre 11 e 13 horas. Sua biodisponibilidade é de 87% (Taharani et al., 2010).

A inibição da atividade da DPP-4 plasmática, gerada pela administração de sitagliptina, mostrou inibição de 80% quando comparada ao placebo, em estudo realizado durante 10 dias com doses de 50 mg, enquanto que doses diárias de 100 mg inibiu mais de 80% da atividade da enzima, mostrando dose-dependência na inibição enzimática. Uma inibição da enzima DPP-4 dose-dependente é necessária em pacientes com diabetes tipo 2, já que indica não ocorrer picos de hipoglicemia induzidos pela administração do fármaco (Taharani et al., 2010).

A saxagliptina, o mais potente inibidor da DPP-4 do grupo de inibidores da enzima (constante de inibição de 1.3 ± 0.3 nM), 3 vezes superior a vildagliptina (4.5 nM) e 20 vezes superior a sitagliptina (26 ± 2 nM) possui o menor número de estudos (He et al., 2007; Taharani et al., 2010). Estudos pré-clínicos indicam como características farmacocinéticas $t_{1/2}$ entre 2,1 e 4,4 h em ratos, cães e macacos respectivamente. O volume de distribuição previsto para humanos é de 202 L e ligação a proteínas inferior a 30% em humanos (Fura et al., 2009).

Os dados farmacocinéticos da vildagliptina são bastante escassos na literatura, tendo relatos de avaliação em animais (ratos, cães e macacos) (He et al., 2009; Villhauer et al., 2003), voluntários saudáveis (He et al., 2009), pacientes diabéticos tipo-2 (He et al., 2005), estudo de farmacocinética populacional e avaliação da atividade da DPP-4 em pacientes diabéticos tipo 2 (Landersdorfer et al., 2012 a e b). Nos ensaios pré-clínicos conduzidos em ratos por He et al. (2009), após administração de dose oral de 100 mg/kg, o fármaco apresentou rápida absorção, com um $t_{m\acute{a}x}$ de 0,5 h e um $C_{m\acute{a}x}$ de 3680 ng.mL⁻¹. A biodisponibilidade absoluta foi moderada (45%) e a meia-vida de eliminação de 5,5 h.

Em estudo com pacientes idosos com insuficiência renal não houve a presença de efeitos adversos ao uso do fármaco nem necessitaram de ajuste de dose. Observou-se hipoglicemia em apenas 0,8% dessa população estudada e, nesses casos, a hipoglicemia não foi severa (Taharani et al., 2010).

O estudo conduzido por Landersdorfer et al., 2012b mostrou capacidade limitada de ligação da vildagliptina com a DPP-4 devido a alta afinidade de ligação existente entre as duas moléculas, assim como dissociação paralela do fármaco com a enzima por um processo lento de primeira ordem e hidrólise do fármaco pela DPP-4 em um metabólito inativo. Esses resultados confirmam que a DPP-4 é a principal responsável pela eliminação da vildagliptina. Os resultados desse trabalho também indicaram que a capacidade inibitória da DPP-4 pela vildagliptina nos tecidos deve ser maior que a inibição observada no plasma. Esses resultados foram provenientes de modelagens matemáticas a partir de dados plasmáticos e não de medidas obtidas diretamente nos tecidos.

A vildagliptina possui características farmacocinéticas e farmacodinâmicas promissoras, entretanto há ausência de dados farmacocinéticos teciduais, onde a interação com a DPP-4 e todas as respostas bioquímicas estão ocorrendo. Essa determinação torna-se particularmente importante quando se considera que o conteúdo de DPP-4, alvo do fármaco é muito mais expresso em tecidos comparado ao plasma (Landersdorfer et al., 2012 b) e a penetração tecidual pode ser determinante nesse caso.

Considerando que a maioria dos eventos farmacológicos ocorre a nível de receptores presentes nos tecidos, a investigação do comportamento farmacocinético e até mesmo do monitoramento das respostas farmacológicas é fundamental para confirmação de doses em etapas pré-clínicas e ajuste de doses em etapas clínicas (Chaurasia et al., 2007).

Para determinação dessas variações farmacológicas e farmacocinéticas teciduais, o método mais empregado em etapas pré-clínicas e clínicas é a microdiálise.

3. Microdiálise

A microdiálise consiste na inserção de uma sonda contendo uma membrana semi-permeável na sua extremidade, a qual é inserida em um órgão ou no interior de vasos sanguíneos com o intuito de medir a

concentração de substâncias exógenas (fármacos) ou substâncias endógenas de interesse. A principal vantagem da técnica é a obtenção de amostras que geralmente não necessitam de tratamento prévio para que sejam quantificadas, já que o tamanho de poro das membranas não permite a passagem de proteínas (Chaurasia et al., 2007).

O formato das sondas é diverso, podendo variar de concêntricas a lineares. O fluido que é perfundido pela membrana deve ser um fluido fisiológico compatível com o tecido estudado e com as características físico-químicas do analito investigado. O fluxo empregado também deve ser compatível com o fisiológico, variando de 0,1 a 5,0 $\mu\text{L}/\text{min}$ (Chaurasia et al., 2007).

Na figura 7 uma sonda de microdiálise está ilustrada.

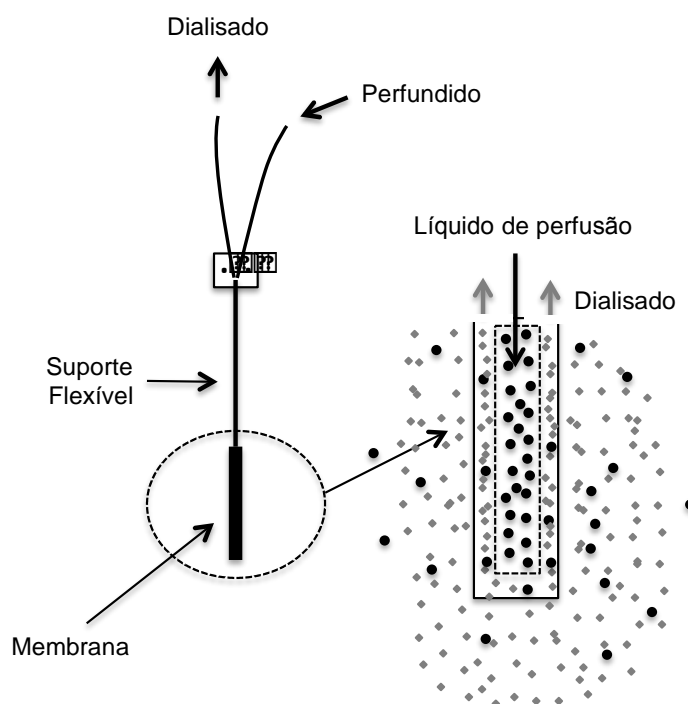


Figura 7. Sonda de microdiálise de formato concêntrico. O detalhe da membrana mostra a difusão do líquido de perfusão (círculos) e do analito (losangos) entre o meio extracelular e a sonda. Adaptado de Chaurasia et al., 2007.

A membrana sempre deve estar dentro do tecido estudado e a extremidade da sonda referente ao perfundido está conectada ao líquido de perfusão que é bombeado através da membrana. Através do outro capilar o

dialisado que passou pela membrana e realizou trocas com o meio é coletado e analisado. Como resultado da perfusão contínua da sonda de microdiálise, a transferência de fármaco pela membrana e conseqüentemente, o equilíbrio entre o tecido e o dialisado são incompletos, de forma que as concentrações no tecido são sempre maiores que as concentrações correspondentes no dialisado (Chaurasia et al., 2007).

O dialisado que é coletado não representa o valor absoluto de analito no meio. Ele é apenas uma fração do que está presente no tecido de interesse. Perdas da substância podem ocorrer devido a características físico-químicas da molécula, ao material que constitui a sonda, ao líquido que constitui o fluido de perfusão ou ao fluxo empregado. O conhecimento da recuperação do composto de interesse nas condições experimentais empregadas é fundamental quando a técnica é empregada (Chaurasia et al., 2007).

Considerando que a difusão do analito de interesse é a mesma nos dois sentidos da sonda, ou seja, quando ele é perfundido pela membrana e percorre toda a extensão da sonda (retrodiálise) e quando ele está em contato com a membrana e entra em contato apenas com a parte final da sonda (diálise), diferentes técnicas podem ser utilizadas para que esses valores sejam obtidos. Experimentos pré-clínicos geralmente utilizam a técnica do fluxo líquido zero ou método da diálise/retrodiálise (Groth et al., 1997).

No fluxo líquido zero, diversas concentrações de analito são perfundidas no tecido até que a concentração constante da substância seja atingida (Chaurasia et al., 2007).

O método da taxa de perfusão *in vitro* para cálculo da recuperação através da diálise consiste na inserção da sonda em uma solução contendo a substância de interesse enquanto o fluido de perfusão é bombeado através da membrana. A equação utilizada nesse caso pode ser observada a seguir (Groth et al., 1997).

$$RD (\%) = \frac{C_{saída}}{C_{memb}} \times 100 \quad (\text{Eq.}$$

1)

Onde RD (%) é a recuperação da diálise, $C_{saída}$ é a concentração nominal do analito no perfusato e C_{memb} é a concentração nominal do analito em contato com a membrana.

Para o cálculo da retrodiálise, uma solução contendo o analito é perfundida através da membrana enquanto essa se encontra em contato com o fluido de perfusão. Nessa situação, a seguinte equação é utilizada (Groth et al., 1997):

$$RR(\%) = \frac{C_{entrada} - C_{saída}}{C_{entrada}} \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde RR (%) representa a recuperação da retrodiálise, $C_{entrada}$ é a concentração do analito quando foi perfundida e $C_{saída}$ é a concentração nominal após passar pela membrana.

Após a realização dos experimentos *in vitro*, a recuperação *in vivo* é investigada, já que a recuperação nas duas situações dificilmente será a mesma, já que na primeira situação o analito está disponível em solução e na segunda existem as tortuosidades do tecido que podem alterar a recuperação. *In vivo* apenas a retrodiálise é realizada, considerando que diálise e retrodiálise são iguais (Sjöberg et al., 1992).

A microdiálise frequentemente é empregada em estudos que relacionam farmacocinética e farmacodinâmica (PK-PD), já que é possível medir os eventos farmacológicos assim como a variação da concentração do fármaco de interesse. Através dessa abordagem, é possível caracterizar essas relações e contribuir para a otimização de posologias já que as complexas relações envolvidas entre dose e resposta podem ser bem caracterizadas com o monitoramento desses eventos na biofase (Chaurasia et al., 2007).

4. Modelagem farmacocinética-farmacodinâmica (PK-PD)

A modelagem PK-PD visa relacionar as concentrações de fármaco atingidas no sangue ou em órgãos-alvo com os efeitos farmacológicos correspondentes. É uma ferramenta promissora muito utilizada atualmente

para a previsão e a simulação de perfis de efeito em função do tempo, aplicáveis na otimização de terapias farmacológicas. A obtenção dos parâmetros utilizados para a geração desses perfis se dá a partir da integração dos dados gerados em estudos independentes de farmacocinética e farmacodinâmica, que permitem caracterizar, respectivamente, a variação das concentrações plasmáticas em função do tempo e a variação do efeito obtido em função da concentração (Csajka, 2006).

Através da integração da farmacodinâmica e farmacocinética é possível prever a extensão e o curso do tempo de efeitos desejáveis e indesejáveis e construir um regime posológico de forma a maximizar a eficácia e minimizar efeitos adversos (Church et al., 2009).

Os modelos farmacodinâmicos mais utilizados para descrever a relação concentração *versus* efeito do fármaco são os modelos E_{max} e E_{max} -Sigmoidal. Estes modelos possuem duas propriedades importantes: determinar o efeito nulo na ausência do fármaco e prever o efeito máximo que um fármaco pode produzir (Derendorf e Meibohm, 1999).

O modelo E_{max} descreve o efeito do fármaco em relação à variação da dose através de uma relação hiperbólica. O modelo de E_{max} - Sigmoidal, que é uma variação do primeiro, é utilizado quando a curva dose-efeito não pode ser descrita de forma hiperbólica simples. O modelo E_{max} - Sigmoidal é descrito pela seguinte equação (Derendorf e Meibohm, 1999):

$$E = \frac{E_{max} \cdot D^n}{DE_{50}^n + D^n} \quad (\text{Eq.}$$

3)

onde E é o efeito do fármaco; E_{max} é o efeito máximo obtido pelo fármaco; D é a dose do fármaco; DE_{50} é a dose do fármaco que produz 50 % do efeito máximo; n é o fator de Hill, que influencia a curvatura da curva efeito-concentração.

Na modelagem PK-PD o termo relacionado a dose (D) pode ser substituído pelas equações que descrevem os modelos farmacocinéticos compartimentais, possibilitando assim, uma verdadeira integração entre a farmacodinâmica (descrição da relação entre dose/concentração e efeito) e a

farmacocinética (descrição do curso das concentrações plasmáticas *versus* tempo) (Derendorf e Meibohm, 1999).

O modelo farmacodinâmico inibitório também pode ser empregado para descrever o efeito inibitório de um fármaco. No caso do estudo de um fármaco inibidor enzimático, esse modelo que está mostrado na Eq. 4, pode ser utilizado para descrever a inibição da DPP-4 pelo fármaco (Kwon, 2001).

$$E = E_0 - \frac{I_{max} \cdot C^n}{IC_{50}^n + C^n} \quad (\text{Eq.4})$$

Onde E_0 é o efeito observado quando não há fármaco presente no sistema, I_{max} é o efeito máximo inibitório atingido pelo fármaco, IC_{50} é a concentração plasmática na qual 50% do efeito inibitório máximo é atingido, n é o fator de Hill e C são as concentrações atingidas pelo fármaco na biofase estudada (Kwon, 2001).

A modelagem PK-PD de antidiabéticos torna-se particularmente importante por ser uma abordagem promissora para a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no sistema glicose-insulina, para estudar e prever efeitos farmacológicos desejados e indesejados atingidos pelas concentrações plasmáticas do fármaco em estudo e também é uma ferramenta útil para o entendimento da progressão da doença (Landersdorfer et al., 2008).

Esse tipo de abordagem já foi realizado para distintas classes terapêuticas, destacando-se a modelagem PK-PD de antibióticos (Bergen et al., 2012) e analgésicos (Lorenzini et al., 2012). Para os antidiabéticos orais, essa abordagem foi pouco explorada, no entanto, o modelo de E_{max} foi igualmente aplicado para candidatos a fármaco do grupo das sulfoniluréias (Byron et al. 1994) e fármacos usados na clínica como a metformina (Lee & Kwon, 2004, Hong et al., 2008, Chae et al., 2012) e glimepirida (Yun et al.; 2006).

Na literatura pode-se observar que ainda existem poucos estudos explorando a modelagem PK-PD como ferramenta para melhor compreensão da relação entre concentração-efeito de fármacos antidiabéticos orais. Além disso, esses trabalhos empregaram modelos de alta complexidade ou tiveram

insucesso no estabelecimento de relações PK-PD adequadas, como foi o caso do estudo de Byrom (1994). Essa reduzida disponibilidade de dados a respeito dessas relações justifica a necessidade de aplicação de abordagens nesse sentido, incluindo-se nesse grupo, os novos agentes antidiabéticos do grupo dos inibidores da DPP-4, que são os mais novos fármacos existentes no mercado para a terapia oral contra a diabetes e que ainda possuem poucos estudos nesse contexto.

Os reduzidos modelos relacionando PK e PD relatados na literatura para fármacos antidiabéticos possuem medidas apenas no sangue de animais ou humanos. A medida na biofase torna-se particularmente importante por apresentar um atraso no efeito comparado com as concentrações plasmáticas. Os modelos existentes não conseguem relacionar os dados plasmáticos com precisão farmacocinética e farmacodinâmica, já que alguns modelos utilizam previsão de valores possivelmente encontrados nos tecidos mas não possuem dados reais para serem comparados (Landersdorfer et al., 2008; Landersdorfer et al., 2012b).

Para a vildagliptina há um estudo de PK-PD que avaliou durante 28 dias a farmacocinética plasmática em 13 pacientes diabéticos, assim como a atividade da DPP-4. Os pacientes receberam o fármaco via oral nas doses de 10, 25, 100 mg ou placebo duas vezes ao dia. Os autores utilizaram um modelo alvo-mediado pela disposição do fármaco no qual a capacidade limitante de ligação da vildagliptina na enzima no plasma sugeriu que o fármaco sofre dissociação da enzima através de um processo de primeira ordem com eliminação paralela gerando um metabólito inativo. De acordo com a farmacocinética, com as medidas da atividade da DPP-4 observadas e com a simulação matemática utilizada, a quantidade de DPP-4 no compartimento tecidual foi estimada como sendo 2000 maior que a existente no compartimento central. Esse dado sugere que a capacidade inibitória do fármaco nos tecidos seria muito maior que a observada no plasma e explicaria a não linearidade plasmática encontrada pelos autores. O modelo utilizado não considera, por exemplo, se há outro ligante endógeno da DPP-4 que impossibilitaria a ligação do fármaco nos tecidos e a disponibilidade enzimática seria a mesma que a plasmática já que essa estimativa tecidual foi simulada e não medida nos tecidos (Landersdorfer, 2012b).

Nesse contexto, considerando a necessidade de respostas para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na farmacocinética da vildagliptina, se insere a proposta de avaliação das relações farmacocinéticas e farmacológicas teciduais que serão exploradas nesse trabalho.

Capítulo 2

**DETERMINATION OF VILDAGLIPTIN IN DIABETIC RAT PLASMA BY
LIQUID CHROMATOGRAPHY – MASS SPECTROMETRY: APPLICATION
TO PHARMACOKINETIC STUDY**

Artigo a ser submetido ao International Journal of
Chromatography B

Determination of Vildagliptin in Diabetic Rat Plasma by Liquid Chromatography- Mass Spectrometry: Application to Pharmacokinetic Study

Cristiane de Andrade ¹, Graziela de Araújo Lock ², Maiara Cássia Pigatto ¹, Sandra Elisa Haas ¹, Teresa Cristina Tavares Dalla Costa ^{1,2}, Bibiana Verlindo de Araújo ^{1,2}

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, Porto Alegre 90610-000, RS, Brazil

² Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, Porto Alegre 90610-000, RS, Brazil

Keywords: Vildagliptin, Pharmacokinetics, HPLC-MS-MS.

Esse capítulo aborda o desenvolvimento de metodologia analítica em cromatógrafo líquido acoplado a detector massa-massa para quantificação de vildagliptina em amostras de plasma de ratos *Wistar* diabéticos.

A metodologia foi validada segundo o guia do *Food and Drug Administration* (FDA, 2001), Utilizou-se cimetidina como padrão interno, coluna e pré-coluna de fase reversa C18 e iluição isocrática acetonitrila:acetato de amônio 5mM (75:25). O fluxo utilizado foi de 0,4 mL/min e o volume de injeção de 15 µL. Foram monitoradas as transições dos íons pai e filho de vildagliptina e cimetidina, essas foram: m/z 304,19 – 153,90 e m/z 253,1 – 159,0, respectivamente. O processamento das amostras ocorreu por precipitação protéica com solvente orgânico (acetonitrila basificada 2:1) e apresentou uma recuperação de 65%. As curvas padrão foram lineares ($r > 0,99$) na faixa de concentração de 50 a 10000 ng/mL. Os demais parâmetros como especificidade, exatidão e especificidade também foram avaliados. O estudo de estabilidade da vildagliptina em plasma foi conduzido em diferentes condições experimentais nas quais as amostras foram expostas.

O método foi empregado para a quantificação do fármaco em plasma após administração intravenosa de 50 mg/kg a ratos machos *Wistar* diabéticos (n = 6). O diabetes foi induzido nos animais de acordo com o protocolo descrito por Lerco e colaboradores, 2003. A metodologia mostrou-se adequada e

sensível para a caracterização do perfil farmacocinético, já que foi possível quantificar a vildagliptina por tempo superior a 3 tempos de meia vida, indicando estar de acordo com o objetivo proposto.

Capítulo 3

**A NOVEL LIQUID CHROMATOGRAPHY METHOD COUPLED WITH MASS
DETECTOR FOR THE QUANTIFICATION OF VILDAGLIPTIN IN LIVER
AND MUSCLE**

Artigo a ser submetido ao Journal of Biomedical Chromatography

A Novel Liquid Chromatography Method Coupled with Mass Detector for the Quantification of Vildagliptin in Liver and Muscle

Cristiane de Andrade¹, Graziela de Araújo Lock², Maiara Cássia Pigatto¹, Sandra Elisa Haas¹, Teresa Dalla Costa^{1,2}, Bibiana Verlindo de Araújo^{1,2}

¹ *Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, Porto Alegre CEP 90610-000, RS, Brazil*

² *Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, Porto Alegre CEP 90610-000, RS, Brazil*

Esse capítulo aborda o desenvolvimento de metodologia analítica em cromatógrafo líquido acoplado a detector massa-massa para quantificação de vildagliptina em amostras de microdialisado dos tecidos hepático e muscular em ratos *Wistar* diabéticos.

A metodologia foi validada segundo o guia do *Food and Drug Administration* (FDA, 2001), Utilizou-se coluna e pré-coluna de fase reversa C18 e iluição isocrática acetonitrila:acetato de amônio 5mM (95:5). O fluxo utilizado foi de 0,4 mL/min e o volume de injeção de 10 µL. Foram monitoradas as transições dos íons pai e filho de vildagliptina m/z 304,19 – 153,90. As curvas padrão foram lineares ($r > 0,99$) na faixa de concentração de 10 a 1875 ng/mL. Os demais parâmetros como especificidade, exatidão e especificidade também foram avaliados. O estudo de estabilidade da vildagliptina em plasma foi conduzido em diferentes condições experimentais nas quais as amostras foram expostas.

Foi realizada calibração das sondas de microdiálise nos dois tecidos investigados, sendo a recuperação de 30%. O método foi empregado para a quantificação do fármaco após administração intravenosa de 50 mg/kg a ratos machos *Wistar* diabéticos ($n = 6$). O diabetes foi induzido nos animais de acordo com o protocolo descrito por Lerco e colaboradores, 2003. A metodologia mostrou-se adequada e sensível para a caracterização do perfil farmacocinético, sendo possível quantificar a vildagliptina por tempo superior a 3 tempos de meia vida. Os perfis dos dois tecidos foi bastante semelhante,

podendo até mesmo serem sobrepostos. Esse foi o primeiro relato sobre a farmacocinética tecidual de um inibidor da DPP-4.

Capítulo 4

**FREE TISSUE CONCENTRATIONS OF VILDAGLIPTIN IN MUSCLE AND
LIVER OF HEALTHY AND DIABETICS RATS: A FIRST INVESTIGATION
ON THE INFLUENCE OF THE DISEASE IN TISSUE DISTRIBUTION OF
ANTIDIABETICS**

Artigo a ser submetido ao International Journal of
Experimental and Clinical Pharmacology

FREE TISSUE CONCENTRATIONS OF VILDAGLIPTIN IN MUSCLE AND LIVER OF HEALTHY AND DIABETICS RATS: A FIRST INVESTIGATION ON THE INFLUENCE OF THE DISEASE IN TISSUE DISTRIBUTION OF ANTIDIABETICS

Cristiane de Andrade¹, Graziela de Araújo Lock², Teresa Cristina

Tavares Dalla Costa^{1,2}, Bibiana Verlindo de Araújo^{1,2}

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, Porto Alegre CEP 90610-000, RS, Brazil

² Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, Porto Alegre CEP 90610-000, RS, Brazil.

Corresponding author: Bibiana Verlindo de Araújo. Phone: +55 (51) 33085418. Email: bibiana.araujo@ufrgs.br

No presente capítulo é mostrado o perfil farmacocinético plasmático e tecidual da vildagliptina em ratos *Wistar* sadios e diabéticos. O grupo diabético recebeu as doses de 50 e 75 mg/kg via intravenosa, enquanto que o grupo sadio recebeu apenas a dose de 50 mg/kg através da mesma via.

Foi realizada análise não-compartimental (software Excel ®) e compartimental (software Scientist ®). dos dados plasmáticos dos dois grupos. Na análise compartimental, o perfil foi corretamente descrito pelo modelo de 2 compartimentos, sendo esse modelo utilizado para prever as concentrações teciduais. A penetração tecidual do fármaco no fígado dos animais diabéticos após a administração das doses de 50 mg/kg e 75 mg/kg

foi de $0,22 \pm 0,13$ e $0,23 \pm 0,17$, respectivamente. No músculo de animais diabéticos a penetração tecidual após a administração das doses de 50 mg/kg e 75 mg/kg foi de $0,17 \pm 0,06$ e $0,23 \pm 0,17$, respectivamente. Os animais sadios apresentaram uma penetração tecidual no fígado de $0,02 \pm 0,01$ e no músculo de $0,18 \pm 0,03$. Embora na literatura alguns autores tenham previsto através de modelos matemáticos que a concentração tecidual de vildagliptina é superior as plasmáticas, os resultados mostrados nesse estudo apresentam concentrações teciduais inferiores as previstas na literatura.

DISCUSSÃO GERAL

As terapias clássicas existentes para o controle glicêmico geralmente requerem associações por não ter uma resposta adequada ou possuir efeitos adversos muito significativos. A classe dos inibidores da DPP-4 mostra-se como uma classe promissora para o controle da doença por não causar tantos efeitos colaterais quanto os tratamentos usuais. A investigação dos perfis teciduais, inéditos na literatura, apresentam-se como uma ferramenta que possibilita o maior entendimento dos mecanismos envolvidos na doença, principalmente quando é considerado que a maior expressão da enzima DPP-4 ocorre nos tecidos e não no sangue, onde foram conduzidas as avaliações dessa ordem presentes na literatura.

Visando atingir o objetivo geral do trabalho, primeiramente foram desenvolvidas metodologias analíticas para quantificação do fármaco nos tecidos e no plasma através de metodologia analítica que empregou cromatógrafo líquido acoplado a detector de massas.

Na metodologia utilizada para quantificar a vildagliptina no sangue, o método foi linear em uma ampla faixa de concentração, a qual variou entre 50 e 10.000 ng/mL. O método de extração protéica empregado foi precipitação com acetonitrila basificada, o que levou a recuperações constantes em toda a faixa analítica avaliada de aproximadamente 65%. O tempo de retenção do fármaco foi de 1,7 minutos e do padrão interno (cimetidina) de 1,50 minutos, sendo o tempo total de corrida analítica de apenas 3 minutos. Não foram observados metabólitos nas amostras avaliadas e a estabilidade do fármaco em plasma foi monitorada para evitar possíveis situações nas quais o fármaco sofreria algum tipo de degradação. O método foi validado segundo a guia de validação de metodologia bioanalítica do FDA, apresentando sensibilidade e seletividade suficientes para caracterizar o perfil farmacocinético estudado.

O método desenvolvido para quantificação do fármaco no microdialisado apresentou uma ampla faixa de quantificação, que variou de 10 a 1875 ng/mL. Essa é a maior faixa de concentração descrita na literatura para quantificação de vildagliptina em matriz aquosa. Após a validação desse método, segundo as exigências do FDA, calibrações das sondas *in vitro* e *in vivo* foram realizadas a fim de conhecê-las previamente ao experimento farmacocinético tecidual.

Na calibração *in vitro* realizou-se diálise e retrodiálise que apresentaram a mesma recuperação, de aproximadamente 30%. Nas calibrações *in vivo* apenas a técnica de retrodiálise foi empregada, gerando uma recuperação média de 30% tanto no fígado como no músculo.

A fim de avaliar a aplicabilidade do método analítico, foi realizada avaliação farmacocinética nos tecidos estudados. O método foi capaz de caracterizar os perfis teciduais e não foi detectada a presença de metabólitos ou outros componentes endógenos que pudessem prejudicar a leitura das amostras. Da mesma forma que foi avaliada a estabilidade da vildagliptina em plasma, na matriz aquosa, também foi realizado esse estudo, garantindo a integridade do fármaco nas condições experimentais empregadas.

Após as validações de metodologias analíticas e comprovada suas aplicabilidades na caracterização de perfis farmacocinéticos plasmáticos e teciduais e avaliadas as calibrações das sondas de microdiálise, avaliações farmacocinéticas com diferentes doses foram realizadas. Foi avaliado o perfil farmacocinético após as doses de 50 e 75 mg/kg em animais diabéticos e a dose de 50 mg/kg nos animais saudáveis. A via de administração foi sempre intravenosa.

A ligação às proteínas plasmáticas apresentou um valor médio de 9,5%, estando esse valor de acordo com descrições na literatura (He et al., 2007). O perfil farmacocinético plasmático foi avaliado através das abordagens compartimental e não compartimental. Na avaliação compartimental o modelo escolhido foi o modelo de dois compartimentos. Os parâmetros farmacocinéticos não apresentaram diferença estatística significativa entre os diferentes grupos estudados, indicando linearidade farmacocinética nas doses e espécie avaliados.

A partir da seleção do modelo de dois compartimentos e com posse dos valores das constantes híbridas A, B, α e β , realizou-se a previsão das concentrações teciduais no software Scientist® e comparou-se essa previsão com os dados teciduais experimentais obtidos por microdiálise. Observou-se que a previsão do modelo gerou um perfil tecidual com concentrações maiores que as encontradas na medida direta do tecido. Esse dado contraria dados de literatura que, a partir de concentrações plasmáticas, previram

níveis de vildagliptina teciduais superiores aos plasmáticos (Landersdorfer et al., 2012).

Esses resultados são pioneiros na literatura, sendo o primeiro registro de microdiálise tecidual de um inibidor da DPP-4, e demonstra a importância de medidas teciduais experimentais.

Outro ponto que deve ser observado é que, apesar da reduzida concentração encontrada na prática experimental comparada com previsões matemáticas, esses níveis reais de exposição ainda conseguem atingir o efeito farmacológico, uma vez que o valor de concentração necessária para inibir 50 % da enzima (IC_{50}) é de 4,5 nM, sendo esse valor inferior as concentrações presentes nos tecidos.

CONCLUSÕES

- As metodologias analíticas para quantificação da vildagliptina em microdialisado e plasma foram desenvolvidas e validadas. Ambos métodos apresentaram linearidade, exatidão, precisão, especificidade e sensibilidade, sendo adequadas para determinação dos perfis teciduais e plasmáticos investigados;
- As calibrações *in vitro* e as calibrações *in vivo* avaliadas em fígado e músculo apresentaram valor médio de recuperação de 30%;
- A fração plasmática livre do fármaco determinada *in vitro* por microdiálise foi de $90,5 \pm 3,23$ %;
- O perfil farmacocinético plasmático foi corretamente descrito pelo modelo de 2 compartimentos;
- A previsão matemática realizada com o emprego do modelo de dois compartimentos gerou perfis teciduais superiores aos observados experimentalmente;
- O perfil tecidual nos tecidos investigados, fígado e músculo, foi semelhante nos animais diabéticos.
- Nos animais sadios o músculo apresentou perfil semelhante aos perfis dos animais diabéticos, entretanto no fígado o fármaco apresentou concentrações quarenta vezes menores que as observadas nos animais diabéticos.

REFERÊNCIAS

American Diabetes Association. Disponível em <http://www.diabetes.org>. Acessado em 28.02.13.

BAGGIO LL, & DRUCKER DJ. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology*. 132: 2131–2157, 2007.

BERGEN P, LANDERSDORFER CB, ZHANG J, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of 'old' polymyxins: what is new? *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 74: 213-223, 2012.

BYROM WD, ROTHERHAM NE & BRATTY JR. Relationship between hypoglycaemic response and plasma concentrations of BTS 67 582 in healthy volunteers, *British Journal of Clinical Pharmacology*. 38: 433-439, 1994.

CHAE JW, BAEK I, LEE B, et al. Population PK/PD analysis of metformin using the signal transduction model. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 74 (5): 815-823, 2012.

CHAN, JC, SCOTT R, FERREIRA JC. et al. Safety and efficacy of sitagliptin in patients with type 2 diabetes and chronic renal insufficiency. *Diabetes, Obesity & Metabolism*. 10: 545–555, 2008.

CHAURASIA CS, MÜLLER M, BASHAW ED, BENFELDT E, BOLINDER J et al. AAPS-FDA Workshop White Paper: Microdialysis Principles, Application and Regulatory Perspectives. *Pharmaceutical Research*. 24 (5): 1014-1025, 2007

COLLIER CA, BRUCE CR, SMITH AC, et al. Metformin counters the insulin-induced suppression of fatty acid oxidation and stimulation of triacylglycerol storage in rodent skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 291: E182–E189, 2006.

COPPACK SW, LANT AF, MCINTOSH CS, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of glibenclamide in non-insulin dependent diabetes

mellitus. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 29: 673-684, 1990.

COPPARI R, BJORBAEK C. Leptin revisited: Its Mechanism of Action and Potential for Treating Diabetes. *Nature Reviews*. 11: 692-708, 2012

CORNELIS MC, HU FB. Gene-Environment Interactions in the Development of Type 2 Diabetes: Recent Progress and Continuing Challenges. *The Annual Review of Nutrition*. 32: 245–259, 2012.

CHURCH MK, GILLARD M, SARGENTINI-MAIER ML, et al. From pharmacokinetics to therapeutics. *Drug metabolism reviews*. 41 (3):455-474, 2009.

CSAJKA C, VEROTTA D. Pharmacokinetic–Pharmacodynamic Modelling: History and Perspectives. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 33(3): 227- 279, 2006.

DAVIS TME, DALY F, WALSH JP, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of gliclazide in Caucasians and Australian Aborigines with type 2 diabetes. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 49 (3): 223-230, 2000.

DEACON C F. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in the treatment of type 2 diabetes: a comparative review. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 13: 7–18, 2011.

DEL PRATO S, BIANCHI C, MARCHETTI P. β -cell function and anti-diabetic pharmacotherapy. *Diabetes/ Metabolism Research and Reviews*. 23: 518–527, 2007.

DERENDORF H, MEIBOHN B. Modeling of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) relationship: concepts and perspectives. *Pharmaceutical Research*. 6 (2): 176-185, 1999.

FURA A, KHANNA A, VYAS V, et al. Pharmacokinetics of the Dipeptidyl Peptidase 4 Inhibitor Saxagliptin in Rats, Dogs, and Monkeys and Clinical Projections. *Drug metabolism and Disposition*. 37 (6): 1164- 1171, 2009.

GAUTIER JF, CHOUKEM SP & GIRARD J. Physiology of incretins (GIP and GLP-1) and abnormalities in type 2 diabetes. *Diabetes & Metabolism*. 34 (Suppl 2): S65–S72, 2008.

GIBBS JP, FREDRICKSON J, BARBEE T, et al. Quantitative Model of the Relationship Between Dipeptidyl Peptidase-4 (DPP-4) Inhibition and Response: Meta-Analysis of Alogliptin, Saxagliptin, Sitagliptin, and Vildagliptin Efficacy Results. *Journal of Clinical Pharmacology*. 52:1494-1505, 2012.

GILLIAM LA AND NEUFER PD. Transgenic Mouse Models Resistant to Diet-Induced Metabolic Disease: Is Energy Balance the Key? *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 342:631–636, 2012.

GUO L, TABRIZCHI R. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma as a drug target in the pathogenesis of insulin resistance. *Pharmacology & Therapeutics*. 111:145-173, 2006.

GROOP L, WFIHLIN-BOLL E, GROOP RH et al. Pharmacokinetics and Metabolic Effects of Glibenclamide and Glipizide in Type 2 Diabetics. *European Journal of Clinical Pharmacology*. 28:697-704, 1985.

GROTH L, JORGENSEN A. In vitro microdialysis of hydrophilic and lipophilic compounds. *Analytica Chimica Acta*. 355: 75-83, 1997.

HE YL, WANG Y, BULLOCK JM. Pharmacodynamics of Vildagliptin in Patients With Type 2 Diabetes During OGTT. *Journal of Clinical Pharmacology*. 47: 633-641, 2007.

HOME PD. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of rapid-acting insulin analogues and their clinical consequences. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 14: 780–788, 2012.

HONG Y, ROHATAGI S, HABTEMARIAM B, et al. Population Exposure-Response Modeling of Metformin in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus. *Journal of Clinical Pharmacology*, 48: 696-707, 2008.

INZUCCHI SE, SHERWIN RS. Type 2 Diabetes Mellitus. *In: Goldman L., Ausiello D. Cecil Medicine. 23rd edition. Philadelphia: Saunders, 2008.*

KIM KA, PARK JY. Simple and extractionless high-performance liquid chromatographic determination of rosiglitazone in human plasma and application to pharmacokinetics in humans. *Biomedical Chromatography*. 18: 613–615, 2004.

KWON Y. Pharmacodynamics and Pharmacokinetic/ Pharmacodynamic Relationships *in Handbook of essential pharmacokinetics, pharmacodynamics and drug metabolism for industrial scientists. New York: Kluwer Academic/ Plenum Publishers, 2001.*

LANDERSDORFER CB, JUSKO WJ. Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Modelling in Diabetes Mellitus. *Clinical Pharmacokinetics*. 47 (7): 417-448, 2008.

LANDERSDORFER CB, HE YL, JUSKO WJ. Mechanism-based population pharmacokinetic modelling in diabetes: vildagliptin as a tight binding inhibitor and substrate of dipeptidyl peptidase IV. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 73 (3): 391-401, 2012 a.

LANDERSDORFER CB, HE YL, JUSKO WJ. Mechanism-based population modelling of the effects of vildagliptin on GLP-1, glucose and insulin in patients with type 2 diabetes. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 73(3): 373-390, 2012 b.

LEE SH & KWON K. Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modeling for the Relationship between Glucose-Lowering Effect and Plasma Concentration of Metformin in Volunteers. *Archives of Pharmaceutical Research*. 27(7): 806-810, 2004.

LORENZINI KI, DAALI Y, DAYER P, et al. Pharmacokinetic–Pharmacodynamic Modelling of Opioids in Healthy Human Volunteers. A MiniReview. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 110: 219–226, 2012.

LUNA B and FEINGLOS MN. Oral Agents in the Management of Type 2 Diabetes Mellitus. *American Family Physician*. 63 (9): 1747-1756, 2001.

MASSI-BENEDETTI M. Glimepiride in Type 2 Diabetes Mellitus: A Review of the Worldwide Therapeutic Experience. *Clinical Therapeutics*. 25 (3): 799-816, 2003.

OLOKOBA AB, OBATERU OA, OLOKOBA LB. Type 2 Diabetes Mellitus: A Review of Current Trends. *Oman Medical Journal*. 27(4): 269-273, 2012

PHILLIPS LK AND PRINS JB. Update on incretin hormones. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 00: 1-20, 2012.

RELAÇÃO NACIONAL DE MEDICAMENTOS ESSENCIAIS (RENAME), 2012. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/>. Acessado em 11 de fevereiro de 2013.

REZENDE KF, FERRAZ MB, MALERBI DA, et al. Predicted annual costs for inpatients with diabetes and foot ulcers in a developing country - a simulation of the current situation in Brazil. *Diabetic Medicine*. 27: 109–112, 2010.

SCHMIDT MI. Diabetes Melito: Diagnóstico, Classificação e Abordagem Inicial. *In: Medicina Ambulatorial: Conduas de atenção primária baseada em evidências*. 3ª edição. Artmed: Porto Alegre, 2006.

SCOTT LJ. Repaglinide: A Review of Its Use in Type 2 Diabetes Mellitus. *Drugs*. 72 (2): 249-272, 2012.

SEINO S, TAKAHASHI H, TAKAHASHI T, et al. Treating diabetes today: a matter of selectivity of sulphonylureas. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 14

(Suppl. 1): 9–13, 2012.

SIMPSON SH, CORABIAN P, JACOBS P et al. The cost of major comorbidity in people with diabetes mellitus. *Canadian Medical Association Journal*. 168 (13) 1661- 1667, 2003.

SILVA, P. Farmacologia. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, pag.1369, 2006.

SJÖBERG P, OLOFSSON I-M, LUNDQVIST T. Validation of different microdialysis methods for the determination of unbound steady-state concentrations of theophylline in blood and brain tissue. *Pharmaceutical Research*. 9 (12): 1592-1598, 1992.

SUN S, JI Y, KERSTEN S, et al. Mechanisms of Inflammatory Responses in Obese Adipose Tissue. *Annual Review of Nutrition*. 32: 261-286, 2012.

SRIPALAKIT P, NEAMHOM P, SARAPHANCHOTIWITTHAYA A. High-performance liquid chromatographic method for the determination of pioglitazone in human plasma using ultraviolet detection and its application to a pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B*. 843: 164-169, 2006.

TAHRANI AA, PIYA MK, KENNEDY A, et al. Glycaemic control in type 2 diabetes: Targets and new therapies. *Pharmacology & Therapeutics*. 125: 328-361, 2010.

TUCKER GT, CASEY C, PHILLIPS PJ, et al. Metformin kinetics in healthy subjects and in patients with diabetes mellitus. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 12:235-246, 1981.

WAGSTAFF A, GOA KL. Rosiglitazone: A review of its use in the management of Type 2 Diabetes Mellitus. *Drugs*. 62(12): 1805-1837, 2002.

WAUGH J, KEATING JM, PLOSKER GL, et al. Pioglitazone: A Review of its Use in Type 2 Diabetes Mellitus. *Drugs*. 66(1): 85-109, 2006.

YUN HY, PARK HC, KANG W, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling of the effects of glimepiride on insulin secretion and glucose lowering in healthy humans. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*. 31: 469–476, 2006.

ZHU Y, ZHANG Q, YU C, et al. Relative Fasting Bioavailability of Two Formulations of Nateglinide 60 mg in Healthy Male Chinese Volunteers: An Open-Label, Randomized-Sequence, Single-Dose, Two-Way Crossover Study. *Clinical Therapeutics*. 34 (7): 1505-1510, 2012.



UFRGS
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 20352

Título: Modelagem PK-PD da vildagliptina em ratos diabéticos induzidos por aloxano

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

BIBIANA VERLINDO DE ARAUJO - coordenador desde 31/03/2011
TERESA CRISTINA TAVARES DALLA COSTA - pesquisador desde 31/03/2011
CRISTIANE DE ANDRADE - Aluno de Graduação desde 31/03/2011

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo, em reunião realizada em 23/05/2011 - Sala de Reuniões do 2º andar da Reitoria, Campus Central, em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, Segunda-Feira, 6 de Junho de 2011

FLAVIO ANTONIO PACHECO DE ARAUJO
Coordenador da comissão de ética