



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISIOLOGIA**

**KARINE GEHLEN BAJA**

**Farmacocinética do cloridrato de tramadol de liberação prolongada administrado por  
via oral em cães com a mutação nt230(del4) no gene MDR1**

Porto Alegre

2013

**KARINE GEHLEN BAJA**

**Farmacocinética do cloridrato de tramadol administrado por via oral em cães com a mutação nt230(del4) no gene MDR1**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia como requisito parcial para a aquisição do grau de doutora.

Orientador: Cláudio Corrêa Natalini

Porto Alegre

2013

### CIP - Catalogação na Publicação

Gehlen Baja, Karine

Farmacocinética do cloridrato de tramadol de liberação prolongada administrado por via oral em cães com a mutação nt230(del4) no gene MDR1 / Karine Gehlen Baja. -- 2013.  
152 f.

Orientador: Cláudio Corrêa Natalini.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Farmacogenética. 2. Terapêutica Veterinária.  
3. Genética Veterinária. I. Corrêa Natalini, Cláudio, orient. II. Título.

**KARINE GEHLEN BAJA**

**Farmacocinética do cloridrato de tramadol administrado por via oral em cães com a  
mutação nt230(del4) no gene MDR1**

Tese de Doutorado em Ciências Biológicas: Fisiologia para a obtenção do título de Doutora, submetido ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Banca Examinadora:

---

Relatora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Rosane Gomez - UFRGS

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Bibiana Verlindo de Araújo - UFRGS

---

Prof. Dr. Vagner Ricardo Lunge - ULBRA

Conceito:

---

Porto Alegre, 09 de agosto de 2013.

*Aos meus amados filhos  
Bruna e Zafir.*

## **AGRADECIMENTOS**

*À minha família, meu marido Anuar Baja e meus filhos Bruna e Zafir, pela paciência, apoio e amor verdadeiro, sem vocês não teria conseguido.*

*Aos meus pais pelo exemplo e aos meus irmãos pela compreensão e apoio.*

*Ao meu amigo Paulo Schmidtke pela ajuda com meus filhos e pela amizade.*

*Ao professor Cláudio Correa Natalini pela orientação e ensinamentos, além da oportunidade de realizar minha pesquisa de doutorado com cães.*

*Aos professores do Curso de Ciências Biológicas-Fisiologia da UFRGS pela excelente qualidade e pelo apoio para a concretização desta tese, em especial à professora Maria Flávia Marques Ribeiro, à professora Ilma Simoni Brum da Silva e à professora Rosane Gomez.*

*Aos meus colegas do LAFA, pela ajuda e apoio. Em especial à querida Ananda, que me acompanhou durante a fase experimental com os cães, alguém muito capaz a quem pude confiar totalmente.*

*À Camila Calliari, Anderson Assumpção, Fernando Mentz e Johanna Gama, pela confiança, por terem cedido seus queridos cães, além do auxílio e parceria durante o experimento.*

*Ao Vanderlei e à professora Ilma por todo auxílio e colaboração na área de biologia molecular, a parceria com o laboratório foi imprescindível para a realização da parte de genética deste trabalho.*

*À Gabriela Pasqualim, à Dra. Úrsula e à Patrícia Koeler pela disponibilidade e grande auxílio no sequenciamento gênico.*

*Ao laboratório de análises clínicas da ULBRA, que generosamente realizou os exames bioquímicos e hemograma dos cães.*

*Ao laboratório de biotecnologia da ULBRA, local onde todo o processo de PCR iniciou.*

*À direção do Hospital Veterinário da ULBRA, por ter permitido que utilizasse sua excelente estrutura para a experimentação.*

*À professora Teresa Dalla Costa, pelos ensinamentos, por ter me acolhido em seu laboratório, colaborando de forma essencial para o término deste trabalho.*

*À Bruna Torres, um agradecimento especial, uma pessoa dedicada, paciente e de grande conhecimento que possibilitou a parte de cromatografia deste estudo.*

*Aos meus colegas professores e a coordenação do curso de Medicina Veterinária da ULBRA, pelo incentivo e compreensão nas minhas ausências e pela amizade, em especial à Virgínia Lunardi, Viviane Pinto, Maria Inês Witz, Simone Thomé, Cristine Fisher e Mariângela Allgayer.*

*À Luna, Lessie, Sole, Tadinho, Frida, Brenda, Sunny morena, Tomy, Lua, Sunny loira, Guria, Trago, Feijão, Pinga, Baiana, Viola, Caneco, Molengo, Caroco e Olavo, os 20 cães que utilizei no experimento, por terem me dado um voto de confiança, pelo carinho demonstrado e pela disposição. Vocês foram maravilhosos!*

*Às instituições CNPq, CAPES e ao Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do Hospital de Clínicas Hospital de Porto Alegre, pelo apoio financeiro.*

## RESUMO

A P-glicoproteína (P-gp) é uma transportadora transmembrana de múltiplos fármacos, produto do gene MDR1 (ABCB1). A P-gp contribui para a função de barreira de vários tecidos e órgãos, funcionando como uma bomba de efluxo para muitos substratos. Diminuição na expressão desta proteína é associada à sensibilidade a fármacos. Cães da linhagem dos Collies possuem uma alta incidência de uma mutação no gene MDR1, denominada nt230(del4). Animais homocigotos para a mutação apresentam a supressão total de uma P-gp funcional e um animal heterocigoto apresenta uma maior sensibilidade para substratos da P-gp, devido a uma diminuição na expressão da mesma. Alguns fármacos opioides, como a morfina e a metadona, foram identificados como substratos da P-gp. O tramadol é um dos analgésicos opioides mais utilizados em cães. No presente trabalho, a mutação MDR1 nt230(del4) foi analisada em vinte cães Collie, utilizando reação em cadeia de polimerase (PCR). A identificação foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida de alta resolução, sendo o resultado confirmado por análise de sequenciamento de DNA. Como resultado, seis cães apresentaram normalidade nos dois alelos e 14 apresentaram heterocigose para a mutação. Estes animais foram submetidos à segunda fase do experimento, quando se administrou uma dose única de 100 mg de tramadol oral de liberação prolongada (SR), objetivando investigar o tramadol como sendo substrato da P-gp. Outro objetivo foi avaliar a farmacocinética deste tipo de formulação, pois ainda não foi estabelecida para cães. A análise farmacocinética do tramadol foi realizada utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção por espectrometria de massas para a determinação e quantificação de tramadol no soro canino. O analito e o padrão interno foram extraídos do soro por método líquido-líquido. A separação cromatográfica foi obtida a partir de uma coluna analítica C18, mantida a 30°C, sob condições isocráticas de uma fase móvel constituída por uma mistura de acetonitrila e ácido fórmico a 0,1% (80:20). A concentração de tramadol no soro foi maior do que o limite de quantificação (LOQ), em 17 cães. Os cães foram divididos em dois grupos, cães normais (MDR1 +/+) e heterocigotos (MDR1 +/-). Os cálculos farmacocinéticos para o tramadol oral SR obtiveram valores médios de concentração máxima no soro (C<sub>max</sub>) de 63,12 ng/mL ± 33,35 para o grupo normal e 58,00 ng/mL ± 27,29 para o grupo heterocigoto. T<sub>max</sub> (tempo de concentração plasmática máxima) foi de 4 h para ambos os grupos e t<sub>1/2</sub> (meia-vida) foram 2,85 h ± 1,61 e 2,81 ± 1,46 h para os cães normais e heterocigotos, respectivamente. A área sob a curva (AUC) média para o tramadol oral SR para o grupo normal e heterocigoto foram 350,20 ± 216,61 e 312,15 ± 155,43 ng.h/mL, respectivamente. A biodisponibilidade foi de 22% e 23% para os cães normais e heterocigotos, respectivamente. Não houve diferença estatística entre os grupos em todos os parâmetros farmacocinéticos. Os resultados sugerem que o tramadol não é um substrato da P-gp. A quantidade de dados farmacocinéticos do tramadol oral na formulação de liberação prolongada (SR) em cães é escassa, sendo necessários mais estudos farmacocinéticos e farmacodinâmicos para o tramadol oral de liberação prolongada em cães para estabelecer adequada dose e frequência de administração em cães.

Palavras-chave: MDR1, P-glicoproteína; mutação genética; cães; tramadol de liberação sustentada.



## ABSTRACT

The P-glycoprotein (P-gp) is a transmembrane multidrug transporter, product of the MDR1 (ABCB1) gene. P-gp contributes to the barrier function of several tissues and organs, acting as an efflux pump for many substrates. Decreased expression of this protein is associated with sensitivity to drugs. Collie dogs have a high incidence of a mutation in MDR1 gene, denominated MDR1 nt230 (del4). In homozygosis, this mutation results in the total absence of a functional P-gp and a heterozygote animal presents a greater sensibility to P-gp substrates, probably due to a decrease in the expression thereof. Some opioid drugs such as morphine and methadone were identified as P-gp substrates. Tramadol is one of the most commonly opioid used in dogs. In the present work MDR1nt230 (del4) mutation was analyzed in 20 healthy Collie dogs using allele-specific polymerase chain reaction (PCR) method. Thereby, 6 homozygous intact and 14 heterozygous mutated MDR1 genotypes can be differentiated by high resolution polyacrylamide gel electrophoresis, confirmed by DNA sequence analysis. These animals underwent the second phase of the experiment, when a single oral administration of 100 mg of sustained release (SR) tramadol was administrated to investigate the tramadol as P-gp substrate. In addition, another aim was evaluate the pharmacokinetics of sustained release formulation, which has not been established for dogs. Pharmacokinetic analysis of tramadol was evaluated using high performance liquid chromatography (HPLC) with tandem mass spectrometry for determination and quantification of tramadol in canine serum. The analyte and internal standard (IS) were extracted from serum using liquid-liquid method. Chromatographic separation was achieved on a C18 analytical column, kept at 30°C, under isocratic conditions of a mobile phase consisted by a mixture of acetonitrile and water contained 0,1% formic acid (80:20). Serum tramadol concentration was greater than the limit of quantification (LOQ) in 17 dogs. The dogs were divided into two groups, normal dogs (MDR1 +/+) and heterozygous (MDR1 +/-) according to the MDR1 genotype. The median values of maximum serum concentration (C<sub>max</sub>) were 63.13 ng/mL ± 33.35 for the normal group and 58.01 ng/mL ± 27.29 for the heterozygous group. T<sub>max</sub> (time to maximum serum concentration) was 4 h for both groups and t<sub>1/2</sub> (half-life) were 2,85h ± 1,61 e 2,81h ± 1,46 for normal and heterozygous dogs, respectively. The mean area-under-the-curve (AUC) values for the sustained release tramadol compounds for the normal and heterozygous group were 350,20 ± 216,61 and 312,15 ± 155,43 ng.h/mL, respectively. The bioavailability was 22% and 23% for normal and heterozygous dogs respectively. There was no statistic difference between groups in all pharmacokinetics parameters. The findings suggest that tramadol is not a P-gp substrate. The amount of pharmacokinetics data of SR formulation of tramadol in dogs is sparse. Therefore, more studies of oral SR tramadol in dogs are needed to establish appropriate dose and frequency of administration in dogs.

Keywords: MDR1; P-glycoprotein; genetic mutation, dogs, sustained release tramadol.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Representação estrutural da P-gp, contendo 12 regiões transmembrana, organizadas em duas porções homólogas, formando os domínios transmembrana (TMD- *transmembrane domain*), cada um com um sítio para ligação de ATP (NBD- nucleotide binding domain). ..... 24
- Figura 2.** (a) Ciclo de transporte do efluxo de substratos pela P-gp. O substrato é representado na cor vermelha e o ATP na cor roxa. (b) Proteína vista de cima, com suas 12 porções transmembrana (TM) e a porção central demonstrando o local de ligação com o substrato ou inibidor. A P-gp possui tamanho de cerca de 70 Å de diâmetro (no plano da membrana) por 136 Å altura (perpendicular à membrana). ..... 25
- Figura 3.** Raças de cães que apresentam relatos da mutação nt230 (del4) no gene MDR1. .... 32
- Figura 4.** Sequência de nucleotídeos do gene MDR1 amplificadas por PCR. Destacado no texto em amarelo a região de anelamento do *primer forward* e em azul o anelamento do *primer reverse*. Em negrito e sublinhado está em destaque a região onde cães mutantes possuem a deleção gênica. .... 38
- Figura 5.** Gel de poliacrilamida a 10% corado com nitrato de prata e fotografado no transiluminador. Amostras com bandas de 148 pb (MDR1+/+), normais homozigotos e bandas de 144/148 pb (MDR1-/+) , heterozigotos para a mutação. .... 45
- Figura 6.** Gel de poliacrilamida a 10% corado com nitrato de prata. Amostras de vinte cães Collies, seis com bandas de 148 pb (MDR1+/+), normais homozigotos e 14 com bandas de 144/148 pb (MDR1-/+) , heterozigotos para a mutação. Marcador molecular utilizado de 25 pb. .... 46
- Figura 7.** Registros de sequência de nucleotídeos do MDR1 do GenBank para cães normais e mutantes. Resultado da análise gênica de 20 Collies, quanto à mutação canina MDR1 nt230 (del4) realizada por sequenciamento de DNA. Sublinhado na sequência encontra-se em destaque a região da mutação, onde ocorre deleção de quatro nucleotídeos. .... 47
- Figura 8.** Eletroferograma parcial de duas sequências de DNA obtida de dois cães Collies, com amplificação da largura das ondas para melhor visualização. Circulado em destaque a região de deleção gênica da mutação MDR1 nt230 (del4). A: Cão sem a mutação. B: Cão heterozigoto para a mutação. .... 48
- Figura 9:** Fórmula estrutural do cloridrato de tramadol. .... 56

<b>Figura 10.</b> Principais vias metabólicas do tramadol.....	60
<b>Figura 11.</b> Demonstração esquemática dos mecanismos de ação do tramadol no corno dorsal da medula (Fonte: Schug, 2007). .....	62
<b>Figura 12.</b> Coluna cromatográfica Luna® C18, acoplada à pré-coluna C18- Phenomenex .....	74
<b>Figura 13.</b> Vista da sala de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao espectrofotômetro de massas. ....	74
<b>Figura 14.</b> Espectro dos produtos iônicos do (a) tramadol (263,95→58 m/z), (b) propranolol (PI, 260,14→115,65 m/z) .....	80
<b>Figura 15.</b> Cromatogramas para (a) tramadol (263,7 →57,4) e (b) propranolol (PI 259,06→115,65) e para a soma dos dois (c) em soro duplo branco.....	89
<b>Figura 16.</b> Cromatogramas obtidos por LC-MS/MS para (a) tramadol (263,7 →57,4) e (b) propranolol (PI 259,06→115,65) e para a soma dos dois (c) em soro branco com PI. ....	89
<b>Figura 17.</b> Cromatogramas obtidos por LC-MS/MS para (a) tramadol (263,7 →57,4) e (b) propranolol (PI 259,06→115,65) e para a soma dos dois (c) em soro com 50 mg de tramadol (ponto da curva) com PI. ....	90
<b>Figura 18.</b> Cromatogramas obtidos por LC-MS/MS para (a) tramadol (263,7 →57,4) e (b) propranolol (PI 259,06→115,65) e para a soma dos dois (c) em amostra de soro de cão do experimento no tempo de 4 horas após a aplicação do tramadol com PI.....	90
<b>Figura 19.</b> Perfil da concentração plasmática média do tramadol após administração intravenosa de 3 mg/kg em 4 cães Collie. ....	91
<b>Figura 20.</b> Média ± DP das concentrações plasmáticas de tramadol em seis cães da raça Collie sem a mutação MDR1 nt230 (del4) e 11 cães heterozigotos, após administração de 4,16 mg/kg ± 0,67 mg/kg (média ± EP) de tramadol oral de liberação prolongada (SR). ....	93

---

---

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Fármacos substratos e inibidores da P-gp .....	27
<b>Tabela 2-</b> Raças de cães que apresentaram a mutação MDR1 nt230 (del4) comprovada por análise gênica, frequência encontrada de alelos mutantes em três estudos em diferentes países .....	31
<b>Tabela 3-</b> Protocolo de pipetagem do PCR utilizado no estudo .....	39
<b>Tabela 4-</b> Protocolo utilizado para a programação do termociclador para o PCR .....	40
<b>Tabela 5.</b> Concentração final de DNA extraído das amostras de sangue realizada com Genomic DNA Mini Kit ® da Invitrogen .....	43
<b>Tabela 6.</b> Resultados da análise gênica de 20 cães Collies referente ao gene MDR1 .....	44
<b>Tabela 7-</b> Mecanismos de ação específicos dos enantiômeros do tramadol e do <i>O</i> -desmetiltramadol (M1).....	63
<b>Tabela 8</b> – Nomenclatura dos receptores opioides. ....	65
<b>Tabela 9-</b> Escala de sedação utilizada para avaliar cães submetidos à administração de tramadol oral .....	78
<b>Tabela 10-</b> Parâmetros analíticos da CLAE acoplada ao detector de massas (LC-MS) para a detecção do cloridrato de tramadol em soro canino .....	81
<b>Tabela 11-</b> Parâmetros farmacocinéticos médios de quatro cães Collies após administração de uma dose de 3 mg/kg de tramadol IV. ....	92
<b>Tabela 12-</b> Parâmetros farmacocinéticos para seis cães Collies sem a mutação e 11 Collies heterozigotos para a mutação MDR1 nt230 (del 4) após uma dose média de 4,16 mg/kg ± 0,67 mg/kg X de cloridrato de tramadol de liberação prolongada administrado por via oral. ....	94

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A - ampere

ABC - *ATP-binding cassette*

ABCB1 - Gene de resistência a múltiplos fármacos

a.C. – antes de Cristo

AINE – Anti-inflamatório não esteroidal

AMPc – adenosil monofosfato cíclico

ANOVA-MR – análise de variância de medidas repetidas

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APS – persulfato de amônio

ASC – área sob a curva

ASC<sub>0-∞</sub> - área sob a curva do tempo zero de coleta ao infinito

ASC<sub>extr</sub> - área sob a curva extrapolada

ATP – adenosina trifosfato

ATPase – enzimas que catalisam a hidrólise do ATP

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*

Bpm – batimentos por minuto

Cl – *clearance*; depuração

C<sub>máx</sub> – concentração máxima

CBIM - Centro Bioanalítico de Medicamentos

CEUA - Comissão de Ética na Utilização de Animais

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência

CH<sup>R</sup> - hamster chinês resistentes à colchicina

cDNA - ácido desoxirribonucleico complementar

CQ – controle de qualidade

D – dose administrada

DEF - Dicionário de Especialidades Farmacêuticas

DNA – ácido desoxirribonucleico

DNTPs - deoxyribonucleotide triphosphates

DP – desvio padrão

ECDD - *Expert Committee on Drug Dependence*

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

EM –metabolizadores rápidos (“*extensive metabolizers*”)

EP – erro padrão

ex.- exemplo

*F* - biodisponibilidade

FDA - *Food and Drug Administration*

g - grama

GEE - *Generalized Estimating Equations*

GI - gastrointestinal

GPPG - Grupo de Pesquisa de Pós- Graduação

h - hora

HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

IM – via intramuscular

IR –liberação imediata (“*immediate release*”)

IV – via intravenosa

IUPHAR – *International Union of Pharmacology*

L - litro

LAFA – Laboratório de Farmacogenética Animal

LC-MS – Cromatografia líquida acoplada a detector de espectrometria de massas

Log - logarítmo

LOQ - limite inferior de quantificação (“*Limit of Quantitation*”)

M1- *O*- desmetiltramadol

M2- *N* -desmetiltramadol

M3- *N,N* -didesmetiltramadol

M4 – *N,N,O*- tridesmetiltramadol

M5- *N,O* - desmetiltramadol

MAO - monoaminoxidase

MAP – proteína ativada por mitógenos

MDR – resistência a múltiplas drogas (“*multi drug resistance*”)

MDR1 – Gene de resistência a múltiplos fármacos

min. - minutos

MRT – tempo de residência média (“*mean residence time*”)

MRTns – tempo de residência média em uma administração não sistêmica

N – tamanho amostras  
NBD – sítio de ligação a nucleotídeos (“*nucleotide binding domain*”)  
NBF - sítio de ligação a nucleotídeos (“*nucleotide binding folds*”)  
NCBI - National Center for Biotechnology Information  
NK – *natural killer*  
NMDA – receptor *N*-metil *D*-Aspartato  
OVH - ovariectomia  
pb – pares de base  
PCR - *Polymerase Chain Reaction*  
PEG – polietilenoglicol  
P -gp – P glicoproteína  
PI – padrão interno  
PM –metabolizadores fracos (“*poor metabolizers*”)  
rpm – rotações por minuto  
RNAm - ácido ribonucleico mensageiro  
RNase - ribonuclease  
SC – via subcutânea  
seg. - segundos  
SNC – Sistema Nervoso Central  
SNPs - *single nucleotide polymorphism*  
SR –liberação prolongada (“*sustained release*”)  
SRD – sem raça definida  
TBE – Tris/Borato/EDTA  
TGI – trato gastrointestinal  
TM - membrana  
TMDs – domínios transmembrana (“*transmembrane domains*”)  
TPLO – *Tibial Plateau Leveling Osteotomy*  
TPMP – tiopurina metiltransferase  
UI – unidades internacionais  
ULBRA – Universidade Luterana do Brasil  
UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
UV - ultravioleta  
V - volts

## LISTA DE SÍMBOLOS

Da – dalton

Å- ângstrons

2D – duas dimensões

™ - *trade mark*

μ - micro;  $10^{-6}$

g – força G - referência à força gravitacional

°C – graus Celsius

MgCl<sub>2</sub> – cloreto de magnésio

M – massa molar

® - marca registrada

AgNO<sub>3</sub> – nitrato de prata

NaOH – hidróxido de sódio

NaCl – cloreto de sódio

H<sub>2</sub>O – água

m – mili;  $10^{-3}$

n- nano;  $10^{-9}$

p- pico;  $10^{-12}$

k – kilo;  $10^3$

n°- número

pH – potencial hidrogênico

pKa – constante de dissociação ácida

μ - mu

δ – delta

κ - kappa

α – alfa

σ – sigma

Ca<sup>++</sup>- cálcio



COOH – ácido fórmico

m/z – massa para trocar a carga

$\lambda$  – constante de eliminação

$\infty$  - infinito

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL .....	18
<b>CAPÍTULO I : P- GLICOPROTEÍNA.....</b>	<b>21</b>
1 INTRODUÇÃO .....	22
1.1 CLASSIFICAÇÃO E ESTRUTURA DA P-GLICOPROTEÍNA .....	23
1.2 MECANISMO DE TRANSPORTE DA P-GP .....	24
1.3 SUBSTRATOS E INIBIDORES DA P-GLICOPROTEÍNA .....	25
1.4 EXPRESSÃO TECIDUAL DO MDR1 .....	28
1.5 POLIMORFISMOS E MUTAÇÕES DO GENE MDR1 .....	29
1.5.1 Polimorfismos do gene MDR1 .....	29
1.5.2 Mutação no gene MDR1 nt230(del4) em cães .....	30
2 OBJETIVOS .....	34
3 MATERIAIS E MÉTODOS .....	35
3.1 REAGENTES .....	35
3.2 EQUIPAMENTOS.....	36
3.3 ANIMAIS E AMOSTRAS.....	36
3.4 EXTRAÇÃO DE DNA .....	37
3.5 AMPLIFICAÇÃO.....	38
3.6 ELETROFORESE EM POLIACRILAMIDA .....	40
3.7 PURIFICAÇÃO DO MATERIAL AMPLIFICADO.....	41
3.8 SEQUENCIAMENTO GÊNICO .....	41
4 RESULTADOS .....	43
4.1 EXTRAÇÃO DE DNA .....	43
4.2 ANÁLISE GÊNICA POR ELETROFORESE EM POLIACRILAMIDA .....	44
4.3 ANÁLISE GÊNICA POR SEQUENCIAMENTO .....	46
5 DISCUSSÃO .....	49
<b>CAPÍTULO II: TRAMADOL.....</b>	<b>53</b>
1 INTRODUÇÃO .....	54
1.1 ESTRUTURA E PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS .....	56
1.2 FARMACOCINÉTICA .....	57
1.2.1 Absorção .....	57
1.2.2 Distribuição .....	58
1.2.3 Metabolização .....	59
1.2.4 Eliminação.....	61
1.3 FARMACODINÂMICA.....	62
1.3.1 Mecanismos de ação.....	62
1.3.2 Efeitos farmacológicos.....	66

---

1.4 DETERMINAÇÃO DE TRAMADOL EM PLASMA.....	69
1.5 FARMACOGENÉTICA .....	70
2 OBJETIVOS .....	72
2.1 OBJETIVO GERAL .....	72
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	72
3 MATERIAIS E MÉTODOS .....	73
3.1 FÁRMACOS .....	73
3.2 REAGENTES .....	73
3.3 EQUIPAMENTOS.....	73
3.4 ANIMAIS.....	75
3.5 PROCEDIMENTOS PRÉVIOS AO EXPERIMENTO.....	75
3.6 ADMINISTRAÇÃO DO CLORIDRATO DE TRAMADOL E COLETA DE AMOSTRAS...76	
3.7 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS FISIOLÓGICOS .....	77
3.8 TÉCNICA CROMATOGRÁFICA .....	78
3.8.1 Metodologia analítica para a detecção e quantificação do cloridrato de tramadol.....	78
3.8.2 Detecção e quantificação do tramadol em solução .....	81
3.8.3 Preparo das amostras .....	81
3.8.4 Validação parcial do método analítico .....	82
3.8.5 Análise das amostras .....	83
3.8.6 Análise estatística.....	87
4 RESULTADOS .....	88
4.1 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS FISIOLÓGICOS .....	88
4.2 VALIDAÇÃO PARCIAL DA METODOLOGIA ANALÍTICA POR LC- MS PARA A QUANTIFICAÇÃO DE TRAMADOL EM SORO DE CÃES.....	88
4.3 AVALIAÇÃO FARMACOCINÉTICA DO TRAMADOL .....	91
4.3.1 Farmacocinética do tramadol após administração intravenosa .....	91
4.3.2 Farmacocinética do tramadol após administração oral de comprimidos de liberação prolongada .....	92
5 DISCUSSÃO .....	95
CONCLUSÕES .....	102
REFERÊNCIAS .....	103
APÊNDICE: Artigo Submetido .....	113
ANEXOS .....	138

## INTRODUÇÃO GERAL

A resposta de um indivíduo a determinado fármaco irá depender de diversos fatores ambientais e genéticos, gerando variabilidade de resposta terapêutica. Tanto a resistência quanto a sensibilidade a fármacos são problemas importantes na escolha do tratamento. Indivíduos com maior resistência aos fármacos irão responder menos ou até mesmo não responder ao tratamento, enquanto indivíduos com maior sensibilidade estarão mais sujeitos a efeitos adversos e propensos a intoxicação. Enzimas metabolizadoras de fármacos, como aquelas pertencentes ao complexo enzimático P450, são muito estudadas devido a polimorfismos identificados, que resultam em variações de diversas intensidades na funcionalidade destas enzimas. Porém, nas últimas décadas, também tem recebido merecida atenção às proteínas de transporte de fármacos, em especial, a P- glicoproteína (P-gp) (SHASTRY, 2006).

A P-gp é codificada pelo gene MDR1 e funciona como uma bomba de efluxo celular a diferentes substâncias em várias espécies animais (DOIGE e AMES, 1993), possuindo um amplo espectro de substratos (BAARS et al., 2008). Vários estudos demonstram a relevância da P-gp na farmacocinética e disposição de muitos fármacos, pois sua expressão limita o acesso de medicações ao tecido alvo e interfere com a absorção intestinal, quando administrados pela via oral (MEALEY, 2004; KUKANICH et al., 2005).

Mealey et al. (2001) identificaram uma mutação no gene MDR1 canino, denominada MDR1 nt230 (del4). Cães da raça Collie possuem cerca de 80% da população com pelo menos um alelo mutante para o MDR1 (MEALEY, 2007). Os indivíduos homozigotos para a mutação não expressam a P-gp, e os heterozigotos apresentam baixa expressão para a proteína. Este fato justifica a utilização de cães Collie para o estudo da atividade da P-gp. A utilização de cães como modelo animal apresenta vantagens sobre camundongos e ratos por sua maior massa corporal, facilitando a coleta de materiais sem a necessidade de morte dos animais. A maior proximidade da espécie canina à espécie humana com relação à domesticação facilita a manipulação e as observações clínicas (SAMPAOLESI et al., 2006).

Slanar (2007) propôs que o tramadol seria um possível substrato da P-gp, sendo assim, o gene MDR1 influenciaria na sua absorção intestinal e biodisponibilidade. O tramadol é um dos fármacos analgésicos mais utilizados no pós-operatório em cães (KUKANICH e PAPICH, 2004). Com o reconhecimento do processo doloroso em animais e a preocupação com bem estar animal, cresceu a preocupação com uma adequada avaliação da dor e promoção de uma analgesia eficaz nesses indivíduos (HANSEN, 2003).

Dor é uma experiência subjetiva, caracterizada por uma percepção física desagradável (LIVINGSTON, 2010). A dor sinaliza dano tecidual real ou potencial, que provoca a retirada ou comportamento de recuperação. A dor é fundamental e protetora, porém dependendo da intensidade e duração, torna-se inadequada, levando a alterações fisiológicas, alto grau de sofrimento e ao possível surgimento da dor crônica (La CROIX-FRALISH e MOGIL, 2009).

O conceito de dor em animais tem sido uma fonte de discussões e debates. Os animais apresentam respostas aversivas a estímulos nocivos. Para a maioria dos veterinários e das pessoas que convivem de maneira próxima aos animais é claramente percebido que os animais demonstram sofrimento de maneira muito semelhante à experiência humana da dor. A partir de perspectivas anatômicas e fisiológicas, todos os animais têm os receptores necessários, nervos, neurotransmissores e anatomia comparativa do sistema nervoso central para ser capaz de experimentar o que os seres humanos descrevem como dor (LIVINGSTON, 2010).

Muitos analgésicos são considerados efetivos para o controle da dor em cães. Anestésicos locais, opioides, anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), assim como outros analgésicos utilizados em humanos são efetivos para o uso em animais (MATHEWS, 2000), porém existem várias razões para a limitação de uso, como seus importantes efeitos colaterais, principalmente quando utilizados cronicamente (McMILLAN et al., 2008).

O tramadol é um analgésico sintético de ação central, análogo à morfina, tendo como vantagem não apresentar a mesma gama de efeitos adversos. É utilizado na medicina humana desde 1977 e foi introduzido como analgésico na medicina veterinária na década de 1990 (GIORGI et al., 2009c; KUKANICH e PAPICH, 2004; McMILLAN et al., 2008).

O presente estudo avalia a influência da P-gp na absorção do tramadol após administração oral em cães com e sem a mutação MDR1 nt230 (del4), investigando a possibilidade de o tramadol ser um substrato desta proteína de transporte. O estudo também avalia o comportamento cinético do tramadol oral na apresentação farmacêutica de comprimidos de liberação prolongada (SR) em cães.

No primeiro capítulo da presente tese, além de revisão bibliográfica sobre o gene MDR1 e a P-glicoproteína, produto de sua expressão, será apresentada a metodologia utilizada para a detecção da mutação MDR1 nt230(del4) em cães.

No capítulo II, serão descritos os aspectos químicos e farmacológicos do tramadol, tendo como objetivo a detecção do cloridrato de tramadol em soro de cães normais e cães com a mutação MDR1 nt230 (del4), administrado por via oral, na apresentação de comprimidos de liberação prolongada, utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), acoplado a um detector de espectrometria de massas (LC-MS) para a detecção e quantificação do fármaco.

**- CAPÍTULO I -**

---

**P- GLICOPROTEÍNA**

---

## 1 INTRODUÇÃO

A resistência a múltiplas drogas (MDR) foi inicialmente observada em células tumorais na década de 60. Na década de 70, foi demonstrado que o acúmulo de xenobióticos em tecidos não depende somente de sua capacidade de penetrar nas células, mas também da sua capacidade de sair delas. Dano (1973) realizou um estudo em uma cultura de células tumorais resistentes a daunorrubicina e observou que ocorria uma acentuada diminuição da concentração do fármaco no interior das células tumorais, mas também havia diminuição nas células normais (*wild type*), em uma intensidade menor, sugerindo uma extrusão ativa da medicação nos dois tipos celulares de modo diferenciado.

Correlacionando à resistência a fármacos, Juliano e Ling (1976) conseguiram isolar uma glicoproteína de membrana a partir de uma cultura de células ovarianas de hamster chinês resistentes à colchicina ( $CH^R$ ). Essa proteína de grande massa atômica, com cerca de 170 kDa foi então denominada P-glicoproteína (P-gp), sendo a letra “P” referente a sua interferência na permeabilidade da célula

O gene responsável pela expressão da P-gp foi identificado a partir de duas linhagens de células tumorais, resistentes à colchicina e doxorubicina, das quais se amplificou uma região comum de DNA contendo uma unidade transcricional, designada MDR. O genoma humano contém pelo menos dois genes da família MDR, o MDR1 e o MDR2, mas apenas a expressão do MDR1 está correlacionada à resistência a múltiplos fármacos (RONINSON et al., 1986). Em humanos, o gene MDR1, também conhecido como ABCB1 é responsável pela expressão da P-gp. Em roedores, a P-gp é codificada por dois genes, o *mdr1a* (também chamado de *mdr3*) e *mdr1b* (também chamado de *mdr1*). As duas isoformas de P-gp dos camundongos possuem a mesma função que a P-gp humana (SCHINKEL et al., 1994; SCHINKEL, 1997).

A P-gp é uma importante proteína de transporte, sendo identificada em diversos tecidos da espécie humana e em outros mamíferos, como camundongos, ratos, cães, equinos, bovinos, macacos (LINARDI e NATALINI, 2006), cobaios (SAITO et al., 1997), ovelhas (BOUGOIN et al., 2008), gatos (VAN DER HADEN et al., 2009) dentre outras espécies. A estrutura da P-gp apresenta alto grau de semelhança entre as espécies, nos camundongos há 87% de homologia com a proteína da espécie humana (ALLER et al., 2009).

Existem proteínas de transporte de múltiplos fármacos análogas à P-gp em bactérias. A LmrA da bactéria *Lactococcus lactis* e a MsbA da *Escherichia coli* possuem um alto grau de

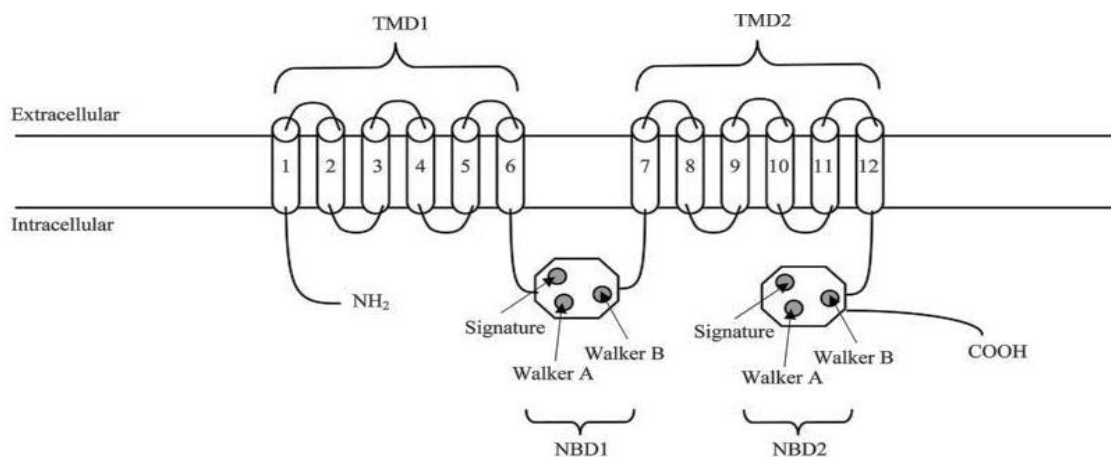


similaridade a P-gp, além de compartilhar a especificidade dos substratos (GUTMANN et al., 2009; SIARHEYEVA, 2006). Doige e Ames (1993) já haviam revisado as proteínas de transporte do tipo *ATPases*, de espécies procariotas, utilizando as estruturas das permeases da *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli*, espécies mais extensivamente estudadas e compararam com as permeases de espécies eucariotas. Aparentemente, as numerosas semelhanças entre as proteínas de transporte do tipo *ATPases* de procariotas e eucariotas justifica considerá-los como parentes próximos, demonstrando a existência de uma grande conservação filogenética destas estruturas (CHEN et al., 1986; GROS et al., 1986). O efluxo celular a diferentes medicações que ocorre pela presença destas proteínas de transporte é responsável pela resistência a fármacos de diversos microrganismos (JOHNSON et al., 2004).

### 1.1 CLASSIFICAÇÃO E ESTRUTURA DA P-GLICOPROTEÍNA

A P-gp pertence à família ABCB da superfamília de transportadores ABC (*ATP-binding cassette*). As proteínas de transporte ABC representam a maior família de transportadores de membrana. Estas proteínas são expressas nos mais diversos organismos animais e vegetais (GUTMANN et al., 2009), sendo que já foram descritos cerca de 50 transportadores da superfamília ABC em humanos (DEAN et al., 2001). Os transportadores ABC utilizam a energia da hidrólise de ATP para transportar substâncias contra o gradiente de concentração, dentre os substratos se encontram diversas substâncias como íons, aminoácidos, carboidratos, peptídeos, proteínas e fosfolípidios. Dentre os transportadores desta superfamília, 14 tem evidências de terem atividade transportadora de xenobióticos, sendo a P-gp a principal transportadora (COUTURE et al., 2006).

Transportadores ABC possuem sítios de ligação para ATP, também conhecidos como NBD (*nucleotide binding domain*) ou ainda NBF (*nucleotide binding folds*) e domínios transmembrana, os TMDs (*transmembrane domains*). A P-gp, assim como algumas proteínas de transporte vinculadas a transportes de fármacos (ex.: BSEP, MRP4, MRP5, MRP8 e MRP9), possui dois TMDs. Cada TMD é formado por seis regiões hidrofóbicas ligadas por alfa-hélices, com um sítio de ligação para nucleotídeos (NBD) localizado no citoplasma (Figura 1). Os TMDs são correlacionados aos sítios de ligações aos diferentes substratos (CHEN et al., 2012; FROMM, 2004).



**Figura 1.** Representação estrutural linear da P-gp, contendo 12 regiões transmembrana, organizadas em duas porções homólogas, formando os domínios transmembrana (TMD- *transmembrane domain*), cada um com um sítio para ligação de ATP (NBD- nucleotide binding domain).

Fonte: COUTURE et al, 2006.

As proteínas de transporte são classificadas conforme a organização de seus NBDs, além da similaridade estrutural do seu gene (COUTURE et al., 2006). O NBD contém 3 domínios: Walker A e Walker B (encontrados em todas as proteínas com ligação para ATP), e o domínio C (sendo este a assinatura dos transportadores ABC) (DEAN, 2001).

Os dois NBDs ficam afastados cerca de 30 Å. Perpendicular à membrana, a glicoproteína possui um tamanho de 136 Å e 70 Å no plano da membrana. A porção interna da proteína resulta em uma grande cavidade interna aberta ao citoplasma (Figura 2) (ALLER et al., 2009).

O gene MDR1, em humanos, está localizado no cromossomo 7, possui 28 exons e codifica os 1280 aminoácidos da P-glicoproteína. Nos cães, o gene está localizado no cromossomo 14, composto de 28 exons (CALLEN et al., 1987; ROULET et al, 2003).

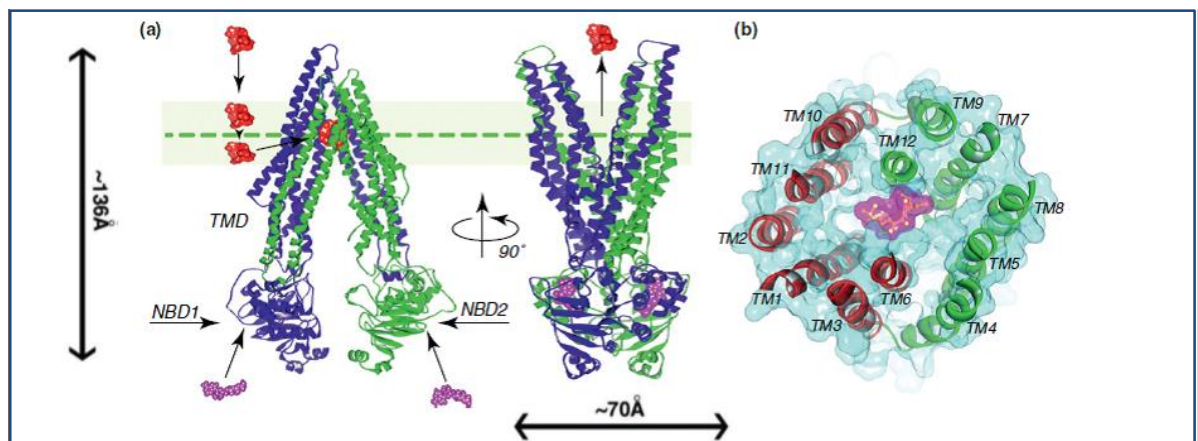
## 1.2 MECANISMO DE TRANSPORTE DA P-GP

A P-gp funciona como uma bomba de efluxo celular, de maneira que, a partir da hidrólise de ATP, transporta para fora da célula uma série de substratos dos seus domínios intracelulares para os extracelulares (DEAN et al., 2001; FROMM, 2004; UEDA et al., 1987).

A P-gp possui uma grande cavidade interna que fica aberta para o citoplasma e para a camada lipídica interna da membrana. A proteína possui dois portais, locais de ligação dos substratos para o seu transporte. A partir de estudos utilizando marcadores moleculares, evidenciou-se que a proteína permite o acesso de substratos hidrofóbicos diretamente da

membrana, durante sua difusão para o interior da célula (ALLER et al., 2009). Da mesma maneira, substâncias anfipáticas também são interceptadas durante a sua passagem pela membrana celular. Estas substâncias são removidas da célula antes mesmo de atingirem o citoplasma. Esse mecanismo propicia um acúmulo das substâncias transportadas na interface lipídio-água da porção externa da membrana (GUTMANN et al., 2009).

Foi proposto que o mecanismo de transporte inicie com a ligação do substrato à face interna da proteína, o que desencadeia a ligação do ATP ao NBD, levando a dimerização dos NBDs, que causa uma grande alteração estrutural, onde a abertura da proteína que ficava voltada para a face interna da membrana passa a ficar para a parte externa. A afinidade da proteína ao substrato diminui, sendo este liberado para o fluido extracelular. O ATP é hidrolizado, a dimerização dos NBDs é desfeita e o sistema é restabelecido, voltando a ter a abertura voltada para o interior da célula, podendo reiniciar o ciclo de transporte (Figura 2) (ALLER et al., 2009; CHEN et al., 2012).



**Figura 2.** (a) Ciclo de transporte do efluxo de substratos pela P-gp. O substrato é representado na cor vermelha e o ATP na cor roxa. (b) Proteína vista de cima, com suas 12 porções transmembrana (TM) e a porção central demonstrando o local de ligação com o substrato ou inibidor. A P-gp possui tamanho de cerca de 70 Å de diâmetro (no plano da membrana) por 136 Å altura (perpendicular à membrana)

Fonte: Chen et al., 2012 (modificado).

### 1.3 SUBSTRATOS E INIBIDORES DA P-GLICOPROTEÍNA

A P-gp pode interagir com um grande número de compostos estruturalmente diversos, sugerindo múltiplos sítios de ligação. De acordo com as interações, estes compostos podem ser classificados em três categorias: substratos, inibidores e moduladores. Substratos são aqueles ativamente transportados pela P-gp, enquanto que aqueles que comprometem a função de transporte são classificados como inibidores. Os moduladores não interagem com os mesmos

sítios de ligação dos substratos, mas reduzem a afinidade dos substratos à proteína, sendo o efeito biológico dos inibidores e moduladores muito semelhante. Técnicas atuais de computação têm sido utilizadas para prever inibidores e substratos da P-gp utilizando informações estruturais da proteína, porém este recurso é limitado devido à complexidade das possíveis interações com a proteína e a variedade de compostos com afinidade de ligação relativamente fraca (CHEN et al., 2012).

Alguns ligantes interagem com o transportador como molécula simples, mas alguns interagem em pares. A ligação do substrato com um sítio de ligação aumenta a interação no outro sítio (GUTMANN et al., 2009).

Inibidores como o verapamil são substratos para o transportador e inibem a função de transporte de um modo competitivo sem interromper o ciclo catalítico da P-gp. Outros agentes moduladores, como a ciclosporina-A, inibem o transporte por interferirem com o reconhecimento do substrato e a hidrólise de ATP. Devido a alguns dos fármacos inibidores serem substratos para a bomba, altas concentrações destes compostos podem ser necessárias para permitir o acúmulo de drogas citotóxicas em células que “superexpressam” a P-gp (MORONI et al., 2008). Alguns protocolos quimioterápicos utilizados em neoplasias fazem uso deste princípio, utilizando concomitantemente fármacos inibidores, como a ivermectina, aumentando então a concentração do fármaco antineoplásico na célula tumoral (POULIOT et al., 1997). A potência dos inibidores normalmente depende da droga citotóxica para a qual a resistência está sendo sensibilizada, por exemplo, o verapamil é um potente inibidor da resistência de daunorrubicina, paclitaxel, e vinblastina, enquanto a ciclosporina-A é um melhor inibidor de resistência a colchicina (MORONI et al., 2008). Kukanich et.al (2005) realizaram estudo com 6 cães, utilizando o cetoconazol como inibidor da P-gp na administração de metadona e este mostrou-se fraco inibidor, aumentando a absorção da metadona (substrato da P-gp) em apenas um dos cães do experimento.

A P-gp possui um amplo espectro de substratos, tão pequeno quanto 330 daltons até 4000 daltons, incluindo antiparasitários, antineoplásicos, glicocorticoides, analgésicos e glicosídeos cardíacos (BAARS et al., 2008). A maioria dos substratos da P-gp são hidrofóbicos, sendo que vários possuem anéis aromáticos (ALLER et al., 2009). Estudos demonstram a relevância da P-gp na farmacocinética e disposição de muitos fármacos, pois sua expressão limita o acesso de medicações ao tecido alvo e interfere com a absorção intestinal quando administrados pela via oral (MEALEY, 2004; KUKANICH, et al., 2005).

Vários substratos da P-gp são identificados a cada ano. Na Tabela 1 são citados alguns substratos e inibidores da P-gp.

**Tabela 1-** Fármacos substratos e inibidores da P-gp

### Substratos da P-gp

<b>Antagonista <math>\beta</math> adrenérgico:</b> Bunitrolol Carvedilol Celiprolol Talinolol Reserpina	<b>Antiinflamatório:</b> Colchicina	<b>Bloqueadores de canal de <math>Ca^{2+}</math>:</b> Diltiazem Mibefradil Nicardipina Verapamil	<b>Inibidores das proteases do HIV:</b> Amprenavir Indinavir Nelfinavir Ritonavir Saquinavir
<b>Antiácidos:</b> Cimetidina Ranitidina	<b>Antifúngico</b> Itraconazol	<b>Bloqueadores Neuromusculares:</b> Vecurônio	<b>Opioides:</b> Azimalodina Fentanil Loperamida Metadona Morfina Pentazicina
<b>Antialérgicos:</b> Fexofenadina Terfenadine	<b>Antineoplásicos:</b> Actinomicina Daunorrubicina Docetaxel Doxorrubicina Etoposide Imatinib Irinotecan Mitomicina C Paclitaxel Tamoxifen Tapotectan Teniposida Vinblastina Vincristina Vindesina	<b>Cardiotônicos</b> Digitoxina Digoxina	<b>Psicotrópicos:</b> Amitriptilina Carbamezepina Felbamato Fenitoína Fenobarbital Flufenazina Gabapentina Lamotrigina Perfenazina Topiramato
<b>Antiarrítmicos:</b> Amiodarona Quinidina Propafenona	<b>Antieméticos:</b> Domperidona Ondansetrona	<b>Esteroides:</b> Aldosterona Corticosterona Cortisol Dexametazona Hidrocortisona Metilprednisolona Progesterona	
<b>Antibacterianos:</b> Cefazolina Cefoperazon Eritromicina Esparfloxacina Fenoxazina Gramicidina Levofloxacina Rifampicina Tetraciclina Valinomicina	<b>Antiparasitário</b> Ivermectina	<b>Imunossupressores:</b> Ciclosporina A Sirolimus Tacrolimus	

### Inibidores da P-gp

<b>Alcaloides</b> Colchicina Reserpina Staurosporina	<b>Neurolépticos</b> Fenotiazinas Flufopentixol Tioxanteno	<b>Outros</b> Cetoconazol Ciclosporina Cloroquina Ivermectina Quinidina Primaquina Valspodar Verapamil
<b>Estruturas com anéis tricíclicos</b> Acetato de resurfina Acridina Fenantrolina Fenotiazina Fenoxazina Quinacrina Xantene	<b>Peptídeos</b> Prenilcisteínas	

Lista baseada em revisão bibliográfica (BRINKMANN e EICHELBAUM, 2001; GONZALEZ, 2006; GOTTESMAN e PASTAN, 1988 MEALEY, 2004)

#### 1.4 EXPRESSÃO TECIDUAL DO MDR1

A P-gp foi primeiramente descrita por possuir uma expressão aumentada em vários tipos de tecidos neoplásicos, os tornando resistentes a diversos quimioterápicos. Apesar da correlação a tumores, a P-gp foi identificada em diversos tecidos normais, sendo fisiologicamente correlacionada com proteção celular a xenobióticos (THIEBAULT et al, 1987).

Fojo et al. (1987) identificaram a expressão do gene MDR1 em uma grande escala nos rins e glândulas adrenais, em uma média escala nos pulmões, fígado, jejuno, cólon e reto e em escalas menores em outros tecidos como coração, subcutâneo, pele, baço, medula óssea, e medula espinhal. Couture et al. (2006) através de ampla revisão da expressão da P-gp no tecido cardíaco demonstraram a importância desta proteína como barreira de defesa para o miocárdio, semelhante à hematoencefálica. O uso concomitante de medicações utilizadas para a insuficiência cardíaca com outros substratos da P-gp pode causar interações medicamentosas importantes.

A P-gp está presente em tecidos excretores, como fígado e rim, promovendo a eliminação de fármacos na bile e urina; em tecidos que funcionam como barreiras, como intestino, endotélio vascular cerebral, testicular, ovariano e placenta. A P-gp age protegendo os tecidos às medicações possivelmente tóxicas e prevenindo o acúmulo de fármacos em órgãos mais sensíveis (FROMM, 2004; KUDZI et al., 2010; TANABE et al., 2001).

Células sanguíneas mononucleadas também expressam a P-gp, permitindo a pesquisa de sua expressão a partir de sangue periférico (ROBEY et al., 2006; TURRIZIANI et al., 2008). A presença da P-gp em linfócitos T e B, monócitos, macrófagos e células NK (*natural killer*) tem como provável função fisiológica a liberação de citocinas. Células tronco da medula óssea também expressam a P-gp, tendo nestas a provável função de proteção celular contra agentes tóxicos (GUPTA e GOLLAPUDI, 1993).

Recentemente foi realizado um estudo em cães, nos quais identificaram uma expressão elevada de P-gp na conjuntiva ocular, e em níveis menores na córnea (HARITOVA et al., 2013).

Conforme a localização anatômica, a função de proteção da P-gp pode ocorrer em três estágios: 1- a P-gp limita a absorção de fármacos administrados por via oral, por sua expressão nos enterócitos; 2- após absorção do fármaco, a P-gp promove sua eliminação pela bile ou renal por sua expressão nas membranas dos canalículos hepáticos e na membrana luminal do túbulo proximal nos néfrons; 3- uma vez atingido a célula alvo, a P-gp limita a concentração do fármaco nas células (FROMM, 2004).

A exposição a fármacos substratos da P-gp aumenta a expressão celular da mesma. Couture et al. (2006) constataram, após revisão de diversas publicações, que este mecanismo de *up-regulation* pode ser correlacionado a um aumento da expressão gênica ou a um aumento do tempo de meia vida da proteína.

## 1.5 POLIMORFISMOS E MUTAÇÕES DO GENE MDR1

Os genes consistem em uma sequência ordenada de nucleotídeos que irá determinar sua expressão proteica. Mutações são alterações hereditárias na sequência base do DNA, podendo levar a alterações da sequência de aminoácidos. Polimorfismo é quando a alteração na sequência de DNA é presente em uma frequência alélica igual ou superior a 1% em determinada população (EVANS e JOHNSON, 2001).

### 1.5.1 Polimorfismos do gene MDR1

Os polimorfismos mais comuns são os moleculares, especialmente os SNPs (*single nucleotide polymorphism*, polimorfismos de um único nucleotídeo). Todos os polimorfismos para o MDR1 humano identificados são SNPs (IEIRI et al., 2004). Referente ao gene MDR1, 48 SNPs já foram detectadas, sendo que algumas das deleções são silentes, mas algumas têm sido associadas a uma baixa expressão da P-gp em indivíduos homocigotos (CHEN et al., 2009).

Dos polimorfismos identificados, três têm sido especialmente estudados, C1236T, G2677T/A e C3435T. Apenas o SNP na posição 3435 (exon 26), onde ocorre a variação alélica entre os nucleotídeos C e T, ambas codificando o aminoácido isoleucina, apresentou correlação com níveis menores de expressão da P-gp. Apesar do polimorfismo C3435T ser detectado em todas as populações étnicas já estudadas, na população afrodescendente esta aparece com uma maior frequência (GONZALES, 2006), sendo correlacionada diretamente a uma importante variação na biodisponibilidade de fármacos administrado pela via oral (IEIRI et al., 2004). Indivíduos com baixa expressão da P-gp, devido ao polimorfismo C3435T, apresentaram concentrações plasmáticas mais elevadas de digoxina administrada pela via oral, quando comparado a indivíduos sem a variação gênica (IEIRI et al., 2004).



### 1.5.2 Mutação no gene MDR1 nt230(del4) em cães

Algumas linhagens animais possuem uma maior sensibilidade a determinadas medicações. Nos cães, algumas raças específicas possuem uma maior incidência de intoxicação por ivermectinas (BAARS et al., 2008).

A mutação no gene MDR1 em cães foi primeiramente correlacionada a uma sensibilidade à ivermectina, ectoparasiticida utilizado amplamente na medicina veterinária, sendo utilizada também na medicina humana. Em 1983 iniciaram descrições de relatos de cães da linhagem do Collie com intoxicações graves com ivermectina (PRESTON, 1983; SEWARD, 1983). Alguns anos depois, foi evidenciado um aumento do fármaco no SNC, sendo percebido que a sensibilidade devia-se a uma falha na barreira hematoencefálica. Em 1994 houve relato de uma intoxicação grave com ivermectina em camundongos *knockout* para o gene *Abcb1a*, referência murina ao gene MDR1 canino (SCHINKEL et al., 1994).

A ivermectinas leva a uma paralisia tônica da musculatura dos invertebrados. As avermectinas ativam os canais de cloreto controlados por ligantes, como o glutamato, que estão presentes no sistema nervoso periférico dos invertebrados. O aumento da condutância ao cloreto leva a uma hiperpolarização de membrana das células nervosas e musculares dos nematódeos e outros parasitas, levando a paralisia e morte (ROULET et al., 2003). A ivermectina não causa paralisia nos vertebrados, pois nestes, a P-gp presente na barreira hematoencefálica impede sua ação nos canais de cloreto controlados pelo glutamato presentes apenas no SNC (NEFF et al., 2004).

Mealey et al. (2001) fez um mapeamento gênico do MDR1 em cães que apresentavam sensibilidade à ivermectina, revelando uma deleção de 4 pares de base no exon 4, denominando a mutação como MDR1 nt230 (del4), também conhecida como MDR1-1 $\Delta$  ou ABCB1-1 $\Delta$  (NEFF et al., 2004). Sendo assim, a diminuição ou ausência da P-gp que ocorre em cães com a mutação deixa estes animais suscetíveis a intoxicações graves por ivermectina. Essa deleção resulta em códons *stop* prematuros, a sequência de aminoácidos traduzida equivale a menos de 10% da P-gp. Sendo assim, homozigotos para a mutação não expressam a P-gp, mostrando alta sensibilidade a vários substratos deste transportador, tais como moxidectina, milbemicina, acepromazina, butorfanol, digoxina, vincristina e loperamida (GRAMER et al., 2010).

Neff et al. (2004) realizaram um estudo filogenético baseado em relatos de raças que apresentaram intoxicações a medicações e em linhagens Collie descendentes. Neste estudo, após a análise genética de mais de 4000 cães, 7 raças da linhagem dos Collies e duas raças da



linhagem dos galgos apresentaram pelo menos um alelo mutante. Após análise da origem de cada raça que apresentava a mutação, os pesquisadores chegaram à conclusão que esta teria iniciado a partir de um ancestral comum que vivia na Grã-Bretanha anteriormente ao ano de 1873, ano em que iniciou o isolamento genético das raças.

A Tabela 2 lista as raças de cães que apresentaram a mutação MDR1 nt230 (del4) em três estudos de diferentes países. A Figura 3 ilustra as diferentes raças citadas.

**Tabela 2-** Raças de cães que apresentaram a mutação MDR1 nt230 (del4) comprovada por análise gênica, frequência encontrada de alelos mutantes em três estudos em diferentes países.

RAÇA	Frequência do alelo mutante (%)		
	Neff et al., 2004 EUA n = 4000	Gramer et al., 2010 Alemanha n= 6544	Kawabata et al., 2005 Japão n= 193
Australian Shepherd	16,6	22	33,3
Australian Shepherd miniatura	25,9	24	-
Border Collie	-	1	-
Collie	54,6	59	58,3
English Shepherd	7,1	-	-
Longhaired Whippet	41,6	45	-
McNab	17,1	-	-
Old English Sheepdog	3,6	4	-
Pastor de Shetland	8,4	30	1,2
Pastor Branco Suíço	-	14	-
Silken Windhound	17,9	-	-
Wäller	-	17	-
Mestiço Collie	-	8	-
SRD	-	2	-



**Figura 3.** Raças de cães que apresentam relatos da mutação nt230 (del4) no gene MDR1.

**Fontes:**

1. <http://legacyaussie.com/>;
2. [www.isdogs.net/4702/Mini-Australian-Shepherd-dog](http://www.isdogs.net/4702/Mini-Australian-Shepherd-dog);
3. [http://commons.wikimedia.org/File:Shetland Sheepdog and Rough Collie.jpg](http://commons.wikimedia.org/File:Shetland_Sheepdog_and_Rough_Collie.jpg);
4. <http://onpuppies.com/border-collie-wallpaper-4>;
5. <http://runjumpweave.com/justEmma.html>;
6. <http://cinoclubebivar.files.wordpress.com/2010/10/longhairedwhippet.jpg>;
7. [http://www.a1animaltalent.com/mcnab\\_mHanklt35P20H22L16C26G.jpg](http://www.a1animaltalent.com/mcnab_mHanklt35P20H22L16C26G.jpg);
8. <http://wakpaper.com/id77253/old-english-sheepdog-wallpaper-3-herding-dogs-900-662-900x662-pixel.html>;
9. <http://www.whiteswiss-shepherds.co.uk/asha.html>;
10. <http://www.silkenwindhounds.org/gallery/sf07-crystal/rio2>;
11. <http://waellerclub-regionalgruppe-sued.connys-dogs.de/>

Na Universidade Estadual de Washington, nos Estados Unidos, o grupo de pesquisa que identificou a mutação MDR1nt230(del4) em cães oferece o serviço de genotipagem de cães para a referida mutação a partir de *swab* bucal. Este exame tem um custo de U\$70,00 mais custos de envio dos kits para coleta de amostra.

Não existem estudos no Brasil avaliando a mutação MDR1 em cães. A genotipagem para a mutação do MDR1 em raças descendentes de Collie, assim como SRDs fenotipicamente semelhantes a estas raças, é importante para avaliar o maior risco de intoxicações por fármacos comumente utilizados na prática terapêutica da medicina veterinária.

Neste capítulo, será descrito a metodologia empregada para a genotipagem de cães da raça Collie, sendo que a partir desta, o Laboratório de Farmacogenética Animal da UFRGS (LAFA) iniciou a genotipagem da mutação do MDR1 de cães, a partir de amostras de sangue.

## **2 OBJETIVO**

Genotipar, a partir de amostra sanguínea, 20 cães da raça Collie quanto à mutação MDR1 nt230 (del4), classificando os cães como homozigotos normais (ausência da mutação); heterozigotos ou homozigotos mutantes.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 REAGENTES

- Ácido acético glacial
- Acrilamida
- AgNO<sub>3</sub>
- Água destilada
- Água Milli-Q® Millipore
- Agarose
- APS (persulfato de amônio- Promega®)
- Azul de bromofenol
- Brometo de etídeo
- Cateter periférico 18 e 20 G BD®
- dNTPs - Sigma® Chemical Company
- EDTA
- Etanol 70 e 100%
- Formaldeído
- Low DNA Mass™
- MgCl<sub>2</sub>
- NaCl
- NaOH
- PEG 8000
- Primers
- Pure Link™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen).
- Sybr Gold™.
- Taq polimerase
- TRIS
- TBE
- Temed (Invitrogen)

### 3.2 EQUIPAMENTOS

- Agitador magnético
- Balança de precisão
- Banho-maria
- Capela de fluxo de exaustão
- Centrífuga
- Cuba horizontal para eletroforese
- Cuba vertical para eletroforese
- Freezer -20°C
- Forno micro-ondas
- Pipetas 1000, 100 e 20µL
- Refrigerador 4°C
- Termociclador
- Transiluminador
- Vórtex

### 3.3 ANIMAIS E AMOSTRAS

Participaram do estudo 20 cães da raça Collie, saudáveis, de propriedades particulares. Os cães tinham entre 1 e 12 anos de idade, sendo 11 fêmeas e 9 machos. Os animais não possuíam histórico clínico de intoxicações ou sensibilidade medicamentosa.

Para extração do DNA dos cães, foi coletado 2 mL de sangue da veia cefálica e colocado em um frasco de coleta com EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético). Imediatamente, o sangue foi colocado em refrigeração a 4° C para posterior extração de DNA.

Este projeto foi aprovado pela Comissão Científica e pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as diretrizes e normas nacionais e internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08/10/2008 que estabelece o uso de animais em experimentos científicos (Anexo A).

### 3.4 EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA foi extraído a partir de sangue total utilizando Pure Link™ Genomic DNA Mini Kit da Invitrogen.

#### ***Protocolo de extração do kit:***

---

##### *Blood Lysate*

- 200 µL sangue refrigerado
- 20 µL proteinase K (mantida refrigerada)
- 20 µL RNase A (refrigerada)
- Vórtex 2 minutos a temperatura ambiente
- 200 µL Pure Link™ Genomic Lysis/ Binding Buffer
- Vórtex
- Incubação em banho maria a 55° C por 10 minutos
- 200 µL de etanol 100%
- Vórtex

##### *Binding DNA*

- Colocar o material preparado (~640 µL) na coluna de sílica
- Centrifugação a 10000 g, 1 minuto à temperatura ambiente
- Descarte do tubo coletor, coluna em novo tubo coletor

##### Lavagem do DNA

- Adicionado 500 µL *Buffer* de lavagem 1
- Centrifugação 10000 g, por 1 minuto
- Descarte do tubo coletor, coluna em novo tubo coletor
- 500 µL *Buffer* lavagem 2
- Centrífuga a 13000 g por 3 minutos

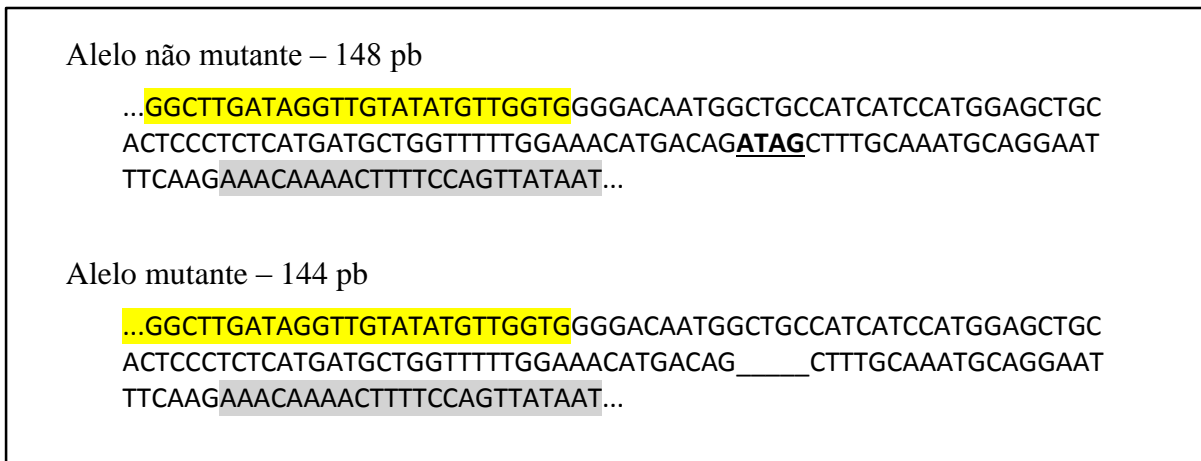
##### Eluição

- No tubo de armazenamento (Ependorf)
  - Adicionar 100µL *Buffer* de Eluição
  - Incubado a temperatura ambiente por 1 minuto
  - Centrifugação a 13000 g por 1 minuto.
-

Uma pequena amostra do material contendo DNA purificado era utilizada para identificar a sua concentração a partir de espectrofotometria. O restante do material era congelado à -20° C.

### 3.5 AMPLIFICAÇÃO

Para a identificação dos alelos e classificação como mutantes ou normais foi amplificado por *Polymerase Chain Reaction* (PCR) a região alélica do gene MDR1 incluindo o exon 4, região onde ocorre a deleção de nucleotídeos, nt230 (del4). Optou-se pelos primers utilizados por Hugnet et al.(2004) e Fecht et al.(2007). O anelamento dos primers foi confirmado utilizando-se a sequência gênica do MDR1 canino presente no GenBank de registro AF 045016.1 para cães sem a mutação (cDNA Beagle dog) e registro AJ 419568.1 para cães mutantes (Collie). A sequência dos *primers* utilizados foi: *primer forward*- 5'- GGC TTG ATA GGT TGT ATA TGT TGG TG-3' , *primer reverse* – 5'- ATT ATA ACT GGA AAA GTT TTG TTT-3'. Estes *primers* selecionam um fragmento para a amplificação de 144pb para os alelos mutantes e 148pb para os alelos não mutantes, conforme a Figura 4.



**Figura 4.** Sequência de nucleotídeos do gene MDR1 amplificadas por PCR. Destacado no texto em amarelo a região de anelamento do *primer forward* e em cinza o anelamento do *primer reverse*. Em negrito e sublinhado está em destaque a região onde cães mutantes possuem a deleção gênica.

A pipetagem para o PCR foi realizada para um volume final de 25 µL, sendo realizada em uma sequência que aperfeiçoasse a técnica, evitando anelamentos inespecíficos e ação precoce da TAQ polimerase. Para realização do PCR foram pipetados primeiramente um primeiro, “MIX 1”, contendo 16,4 µL de água Milli-Q; 2 µL de *buffer*; e 0,6 µL de MgCl<sub>2</sub> e adicionado 1 µL de DNA resultando num volume de 20 µL. A mistura foi colocada no



termociclador a 94° C, durante 4 minutos. Enquanto isso, foi pipetado o “MIX 2”, contendo 2,7 µL de água Milli-Q®, 0,5µL de *buffer*, 0,15µL de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µL de DNTPs, 0,5 µL de cada *primer*, em uma concentração de 10 µM e a *Taq* Polimerase 0,15µL. Após o *hotstart* do “MIX 1” contendo DNA, foi adicionado o “MIX 2” e então foi colocado no termociclador.

O termociclador foi programado para 40 ciclos de 94° C por 40 seg. (desnaturação do DNA), 55° C durante 30 seg. (anelamento dos *primers*), 72° C por 30 seg. (extensão). Após os 40 ciclos, 4 minutos a uma temperatura de 72° C (extensão final).

Após o término o produto de PCR foi congelado numa temperatura de – 20° C, sendo descongelado apenas para a purificação e sequenciamento. O protocolo de PCR será esquematizado nas Tabelas 3 e 4.

**Tabela 3-** Protocolo de pipetagem do PCR utilizado no estudo.

	MIX 1	MIX2
Água Milli-Q	16,4 µL x (n.amostras +2)	2,7 µL x (n.amostras +2)
<i>Buffer</i>	2,0 µL x (n.amostras +2)	0,5 µL x (n.amostras +2)
MgCl <sub>2</sub>	0,6 µL x (n.amostras +2)	0,15 µL x (n.amostras +2)
<i>Dntp</i>		0,5 µL x (n.amostras +2)
<b>Primer 1</b>		0,5 µL (10µM) x (n.amostras +2)
<b>Primer 2</b>		0,5 µL (10µM) x (n.amostras +2)
DNA	1,0 µL	
TAQ		0,15 µL x (n.amostras +2)
<b>VOLUME FINAL</b>	20 µL	5 µL

**Tabela 4-** Protocolo utilizado para a programação do termociclador para o PCR

	Temperatura	Tempo	Número de ciclos
<i>Hot Start</i>	94° C	4 minutos	1
<b>Desnaturação</b>	94° C	40 segundos	} 40 ciclos
<b>Anelamento</b>	55° C	30 segundos	
<b>Extensão</b>	72° C	30 segundos	
<b>Extensão Final</b>	72° C	4 minutos	1

Parte do produto foi interpretada por eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% e parte foi purificada e sequenciada.

### 3.6 ELETROFORESE EM POLIACRILAMIDA

Para o preparo do gel foi utilizado 45,5 mL de TBE 1X; 24,5 mL de acrilamida 30%; 920µL de APS 5%; 100 µL de Temed®. Depois de preparado, o gel era vertido em uma cuba de eletroforese de vidro previamente limpa e montada. Posteriormente, era colocado o pente que formaria os poços para as pipetagens. A polimerização do gel ocorria em cerca de 30 minutos.

A placa contendo o gel era colocada em uma cuba vertical de eletroforese, esta contendo TBE 1x para condução elétrica.

Em um ependorf, contendo 10 µL do produto de PCR, era adicionado 1 µL de corante azul de bromofenol. As amostras eram pipetadas nos poços do gel, assim como um controle negativo (produto de PCR sem o DNA) e um marcador de peso molecular de 25 pb.

A eletroforese era realizada em uma voltagem de 70V durante 6 horas.

Após a eletroforese, o gel era retirado cuidadosamente da cuba de vidro e era corado. Para a coloração utilizava-se uma solução fixadora de ácido acético por 5 minutos; posteriormente era corado com nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>) por 5 minutos; era feito uma lavagem com água destilada; após era revelado com formaldeído e hidróxido de sódio (NaOH) e fixado com a solução de ácido acético.

### 3.7 PURIFICAÇÃO DO MATERIAL AMPLIFICADO

Parte do produto de PCR foi purificada com protocolo baseado no uso de PEG 8000 (polietilenoglicol-8000M), descrito por Dunn e Blattner (1987). Para o preparo da solução de PEG, adicionou-se 2,92g NaCl (2,5M); 10g PEG (8000M), 20mL H<sub>2</sub>O para injeção. A solução foi solubilizada em agitador eletromagnético até ficar homogênea.

Pipetou-se 15 µL do produto de PCR e foram adicionados 15 µL da solução PEG previamente preparada. Este material foi colocado em banho seco à 37° C durante 30 minutos. Posteriormente, foi feita centrifugação a 13000 rpm durante 20 minutos. Retirou-se delicadamente toda a solução de PEG pela parede inversa ao pellet. Adicionou-se 125 µL de etanol 80% gelado, deixado a temperatura ambiente por 2 minutos seguido de centrifugação a 13000 rpm durante 1 minuto. Após, retirou-se o etanol, adicionando-se 125 µL de etanol 100% com retirada imediata e posterior secagem por evaporação em bancada. O material seco foi ressuspenso em 10 µL de água para injeção e incubado novamente a 37° C em banho seco por 1 hora.

O produto purificado foi quantificado em gel de agarose a 1,5%. O volume colocado no gel de agarose para realização da eletroforese foi de 2 µL do produto de PCR, adicionado como marcador fluorescente *Sybr Gold™*. Utilizou-se como marcador o *Low DNA Mass™*. A eletroforese foi realizada em uma cuba horizontal, com o gel submerso em tampão TBE 1X, com uma tensão de 95 V e uma corrente de 300 mA por 30 minutos. Depois de feita a quantificação, realizou-se o ajuste da concentração do produto de PCR para 1-3 ng, diluindo-se o DNA em água Milli-Q® quando necessário.

As amostras foram enviadas para o sequenciamento em um volume de 5 µL do PCR purificado, numa concentração entre 1- 3 ng, adicionado de 3,2 pmol do *primer forward* utilizado na realização do PCR.

### 3.8 SEQUENCIAMENTO GÊNICO

O sequenciamento das amostras foi realizado na Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (Centro de Pesquisa Experimental, HCPA) utilizando o equipamento *ABI 3500 Genetic Analyzer* com capilares de 50 cm e polímero POP7 (Applied Biosystems). Os produtos de PCR foram marcados utilizando-se 3,2 pmol do *primer 5'* - GGC TTG ATA GGT TGT ATA TGT TGG TG-3' e 1 µL do reagente *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) em um volume final de 10 µL. As reações de marcação foram realizadas em

termociclador *Veriti® 96-Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems) com uma etapa de desnaturação inicial a 96°C por 1 min seguida de 35 ciclos de 96°C por 15 seg., 50°C por 15 seg. e 60°C por 4 min. Após marcadas, as amostras foram purificadas pela precipitação com *BigDye X Terminator Purification Kit* (Applied Biosystems) e eletroinjetadas no sequenciador automático.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 EXTRAÇÃO DE DNA

As amostras dos 20 cães foram identificadas como C1 – C20.

A quantificação de DNA das extrações foi realizada por fluorometria, os resultados estão listados na Tabela 5.

**Tabela 5.** Concentração final de DNA extraído das amostras de sangue realizada com Genomic DNA Mini Kit ® da Invitrogen.

Cães	DNA µg/mL	Cães	DNA µg/mL
<b>C1</b>	19,9	C11	22,8
<b>C2</b>	23,2	C12	15,8
<b>C3</b>	19,4	C13	14,7
<b>C4</b>	17,5	C14	22,4
<b>C5</b>	14,0	C15	20,4
<b>C6</b>	19,9	C16	18,2
<b>C7</b>	14,2	C17	26,6
<b>C8</b>	15,8	C18	35,8
<b>C9</b>	13,1	C19	20,2
<b>C10</b>	25,0	C20	24,8

As concentrações de DNA extraído a partir de sangue total, com Genomic DNA Mini Kit ® da Invitrogen, foram satisfatórias.

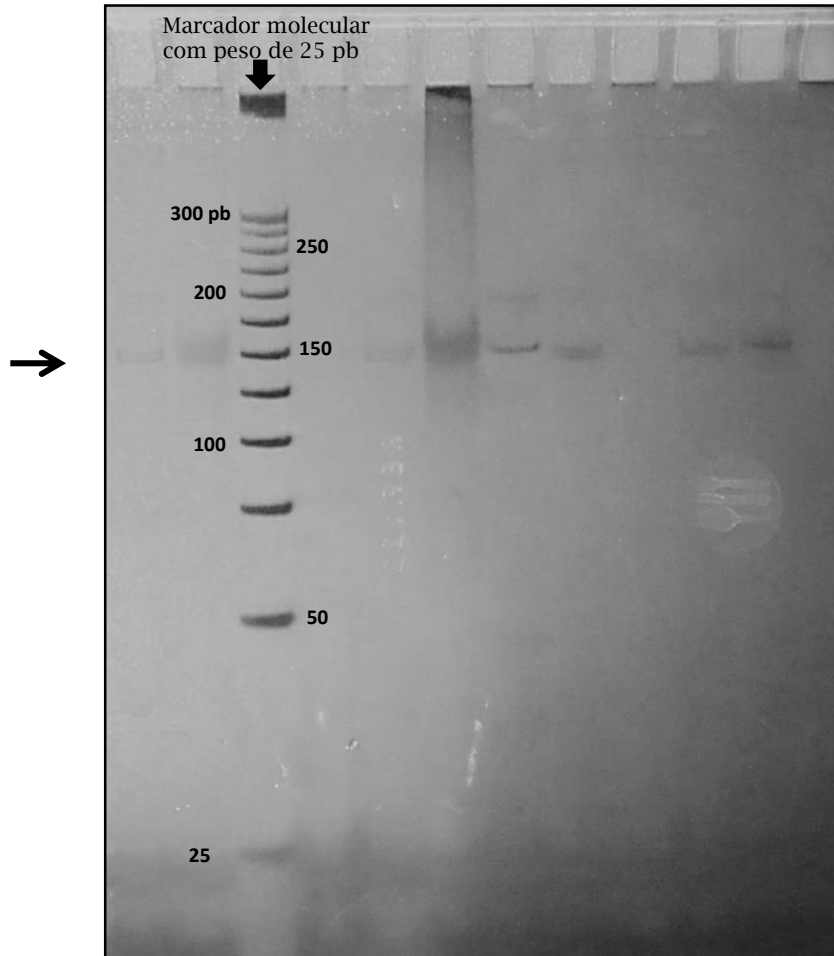
#### 4.2 ANÁLISE GÊNICA POR ELETROFORESE EM POLIACRILAMIDA

Foram genotipados 20 cães Collie para a mutação MDR1 nt230 (del4). A análise gênica foi feita a partir de segmento do MDR1 na região onde se localiza a mutação canina nt230 (del4), exon 4, amplificado por PCR.

Com base nos resultados obtidos por eletroforese em gel de poliacrilamida, evidenciou que dos 20 cães analisados, 6 não apresentaram a mutação, estes apresentaram fragmento amplificado com 148 pb; e 14 apresentaram um alelo normal e um alelo mutante, apresentando dois fragmentos amplificados, um com 144 e outro com 148 pb, sendo estes heterozigotos para a mutação (Tabela 6), nenhum dos cães era homozigoto para a mutação. A Figura 5 ilustra um dos géis de poliacrilamida utilizado para a análise do PCR.

**Tabela 6.** Resultados da análise gênica de 20 cães Collies referente ao gene MDR1.

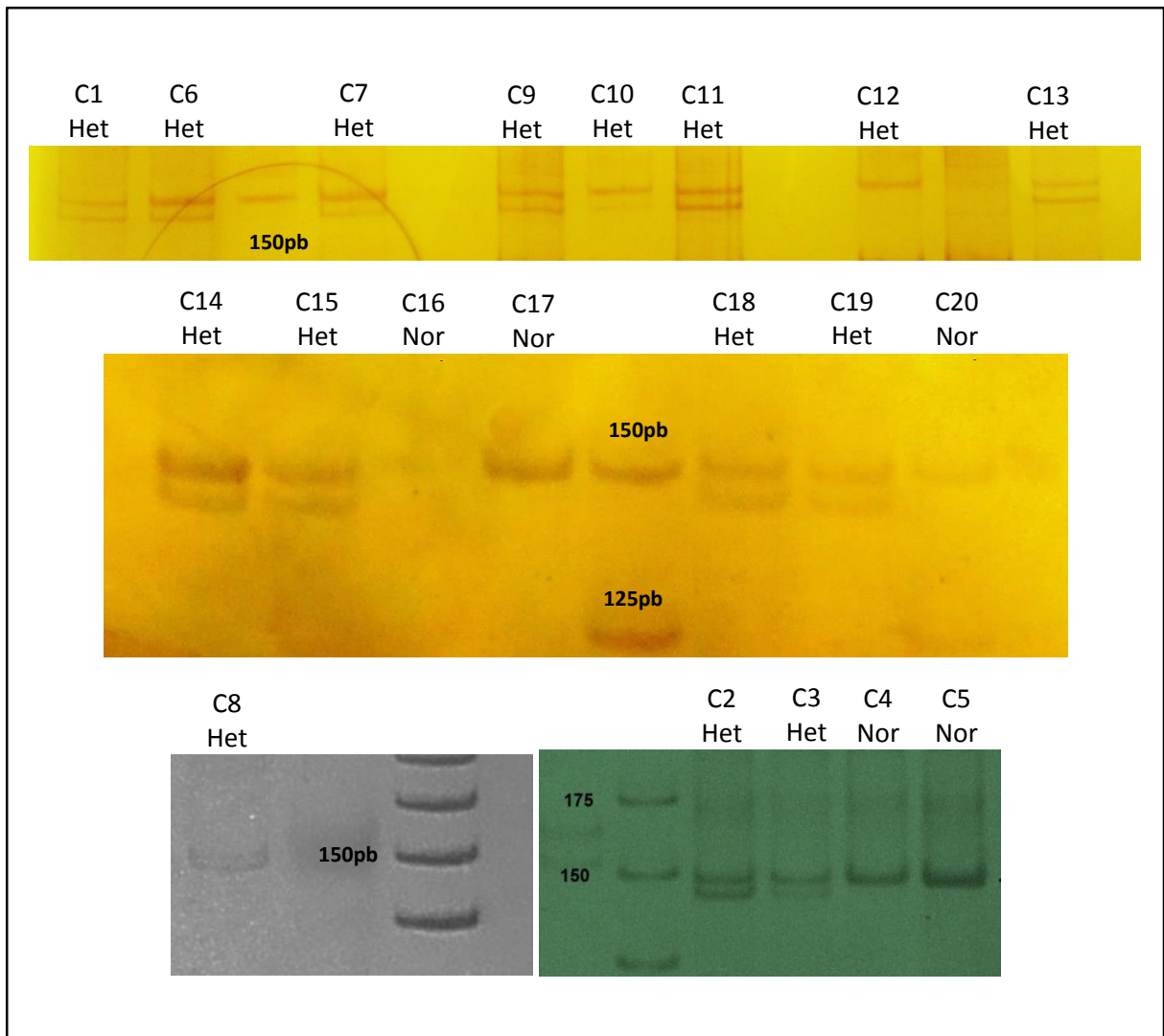
CÃES	Tamanho do fragmento -Status gênico	CÃES	Tamanho do fragmento Status gênico
<b>C1</b>	144/148 - heterozigoto	<b>C11</b>	144/148 - heterozigoto
<b>C2</b>	144/148 - heterozigoto	<b>C12</b>	148 – normal
<b>C3</b>	144/148 - heterozigoto	<b>C13</b>	144/148 – heterozigoto
<b>C4</b>	148 - normal	<b>C14</b>	144/148 – heterozigoto
<b>C5</b>	148 - normal	<b>C15</b>	144/148 – heterozigoto
<b>C6</b>	144/148 - heterozigoto	<b>C16</b>	148 – normal
<b>C7</b>	144/148 - heterozigoto	<b>C17</b>	148 – normal
<b>C8</b>	144/148 - heterozigoto	<b>C18</b>	144/148 – heterozigoto
<b>C9</b>	144/148 - heterozigoto	<b>C19</b>	144/148 – heterozigoto
<b>C10</b>	144/148 - heterozigoto	<b>C20</b>	148 – normal



**Figura 5.** Gel de poliacrilamida a 10% corado com nitrato de prata e fotografado no transiluminador. Amostras com bandas de 148 pb (MDR1<sup>+/+</sup>), normais homozigotos e bandas de 144/148 pb (MDR1<sup>-/+</sup>), heterozigotos para a mutação.

A Figura 6 mostra os géis de poliacrilamida utilizados para a análise do PCR dos 20 cães do experimento.

Algumas análises precisaram ser feitas mais de uma vez pela dificuldade de visualização das bandas de algumas amostras.



**Figura 6.** Gel de poliacrilamida a 10% corado com nitrato de prata. Amostras de vinte cães Collies, 6 com bandas de 148 pb ( $MDR1^{+/+}$ ), normais homozigotos (nor) e 14 com bandas de 144/148 pb ( $MDR1^{-/+}$ ), heterozigotos para a mutação (het.). Marcador molecular utilizado de 25 pb.

#### 4.3 ANÁLISE GÊNICA POR SEQUENCIAMENTO

Os diagnósticos da mutação  $MDR1$  nt 230 (del4) realizadas por PCR e eletroforese em gel de poliacrilamida foram confirmados no sequenciamento, os cães tiveram o mesmo diagnóstico quanto ao *status* gênico. Seis cães não apresentaram a mutação e 14 cães foram heterozigotos para a mutação, nenhum homozigoto mutante foi diagnosticado no estudo.

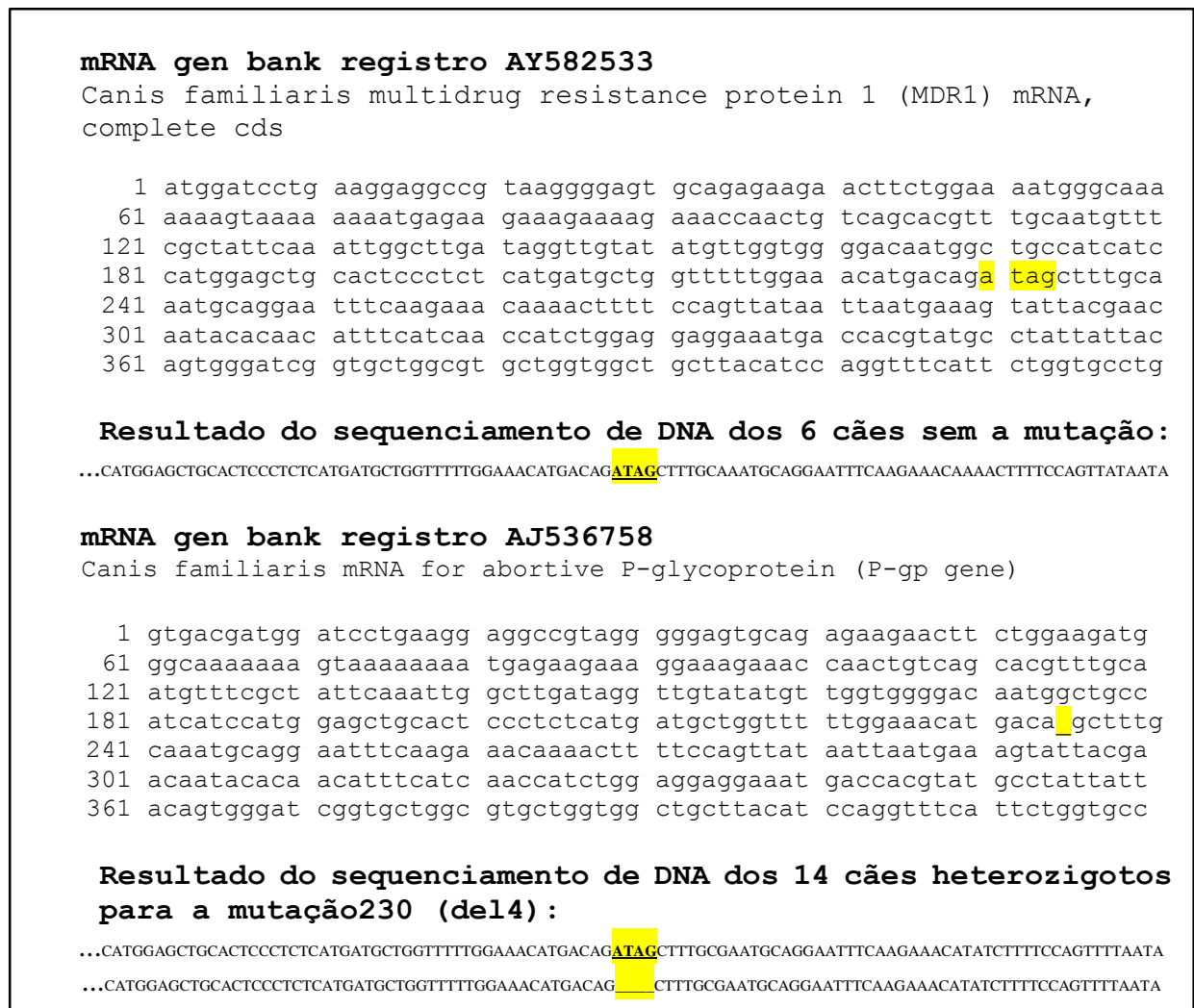
A análise dos resultados do sequenciamento foi realizada utilizando o programa Chromas Lite™ para possibilitar o acesso aos eletroferogramas gerados, auxiliando nas leituras dos mesmos. Em seguida, as sequências foram submetidas à consulta de similaridade de



nucleotídeos por meio do programa Blast (“Basic Local Alignment Search Tool”), para comparação com sequências homólogas depositadas no banco de dados público mundial GenBank (National Center for Biotechnology Information – NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), utilizando como referência a sequência de registro AY582533.

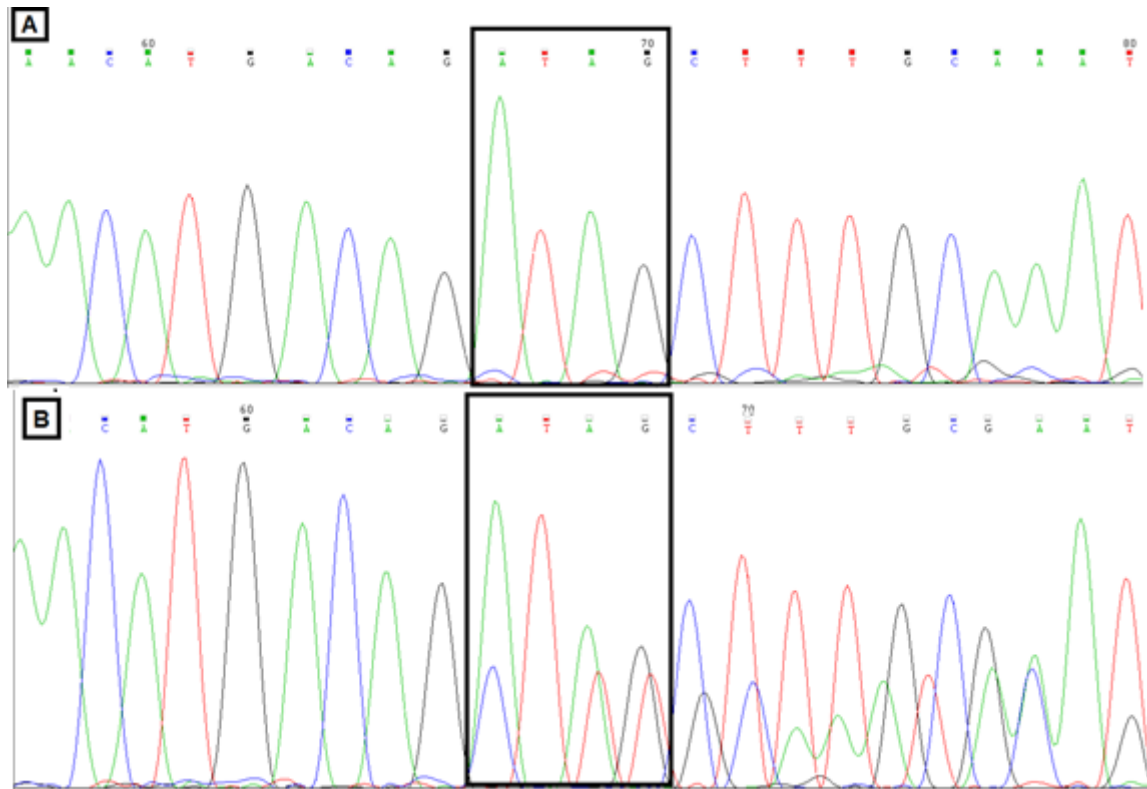
Os cães heterozigotos apresentaram duas sequências de nucleotídeos diferentes a partir do local da mutação, uma sequência referente ao alelo não mutante e uma sequência conforme descrito no GenBank para Collies com sensibilidade à ivermectina sob registro AJ419568.1, indicando dois alelos distintos.

As sequências de nucleotídeos do GenBank e as encontradas no sequenciamento dos cães do presente estudo estão listadas na Figura 7, sendo que todos os animais normais apresentaram sequências idênticas entre si, assim como os heterozigotos.



**Figura 7.** Registros de sequência de nucleotídeos do MDR1 do GenBank para cães normais e mutantes. Resultado da análise gênica de 20 Collies, quanto à mutação canina MDR1 nt230 (del4) realizada por sequenciamento de DNA. Sublinhado na sequência encontra-se em destaque a região da mutação, onde ocorre deleção de quatro nucleotídeos.

A Figura 8 ilustra dois eletroferogramas resultantes do sequenciamento gênico dos cães do experimento, um de cão normal e um de heterozigoto. Para os cães heterozigotos (Figura 8b) percebe-se sobreposição de dois nucleotídeos a partir da região da mutação, indicando dois alelos distintos. Os eletroferogramas do sequenciamento dos vinte cães do experimento podem ser visualizados no Anexo B.



**Figura 8.** Eletroferograma parcial de duas sequências de DNA obtida de dois cães Collies, com amplificação da largura das ondas para melhor visualização. Enquadrado em destaque a região de deleção gênica da mutação MDR1 nt230 (del4). A: Cão sem a mutação. B: Cão heterozigoto para a mutação.

## 5 DISCUSSÃO

A sequência de nucleotídeos do gene MDR1 canino está descrita por completo no GenBank. O gene está localizado no cromossomo 14, possui 28 exons, num total de 3846 pb transcritas pelo RNAm (GenBank). Algumas raças caninas, como Collie, Pastor de Shetland, dentre outras, possuem uma maior sensibilidade a determinadas medicações, tendo uma maior incidência de intoxicação por ivermectinas (BAARS et al., 2008; GRAMER et al., 2010; NEFF et al., 2004). A mutação do gene MDR1 foi denominada MDR1 nt230 (del4), por se referir a uma deleção de 4 nucleotídeos que ocorre na posição 230, primeiramente descrita por Mealey (2001). Como protocolo, o nome da mutação leva o número da posição 1º nucleotídeo do cDNA mutado e, em caso de deleção, a indicação do número de deleções. Basicamente, existem três diferentes tipos de mutação: substituição, deleção ou inserção, sendo mais comum a ocorrência em um único nucleotídeo (REGATEIRO, 2003). Esta deleção no gene MDR1 modifica a sequência de bases do gene, conduzindo a uma modificação de sua leitura, isso provoca o aparecimento de *códon stop* prematuros, resultando em uma proteína com menos de 10% de sua estrutura e afuncional (FECHT et al., 2007; MEALEY et al., 2001).

Os cães que possuem os dois alelos normais, sem a mutação, são classificados como MDR1<sup>+/+</sup>, também chamados de *wild type* (selvagens). Dos 20 Collies testados neste estudo, seis (30%) foram classificados com ausência de mutação, MDR1<sup>+/+</sup>, estes apresentaram sequência de nucleotídeos idêntica ao referenciado no GenBank no sequenciamento gênico, não possuindo uma susceptibilidade maior a intoxicações que cães de outras raças. Nestes cães, terapias utilizando ivermectinas, por exemplo, não precisariam ser evitadas. Quatorze cães deste estudo (70%) apresentaram um alelo mutante e um normal (MDR1<sup>+/-</sup>). O alelo mutante destes cães apresentaram uma deleção de 4 bases na posição 230 do mRNA correspondente ao exon 4, conforme mutação descrita por Mealey et al (2001) e registrada no GenBank (AJ536758). Os cães heterozigotos são portadores da mutação, tendo uma sensibilidade aos substratos intermediária, podendo apresentar diferentes intensidades de intoxicação (BISSONNETTE et al., 2009).

Animais homozigotos mutantes (MDR1<sup>-/-</sup>) apresentam uma extrema sensibilidade a determinados fármacos substratos da P-gp, principalmente as lactonas macrocíclicas sistêmicas, como as avermectinas (BISSONNETTE et al., 2009; MEALEY, 2004). Cães homozigotos para a mutação apresentam efeitos adversos neurológicos após dose única de ivermectina (0,1 mg/kg). Heterozigotos e cães normais não são sensíveis a essa dose, porém, heterozigotos

podem apresentar neurotoxicidade com doses um pouco mais elevadas, principalmente em casos de doses repetidas diariamente, como utilizado no tratamento de demodicose (MEALEY, 2004).

A eletroforese em gel de poliacrilamida nem sempre evidenciou a amplificação na primeira tentativa diagnóstica, algumas vezes se fez necessário a repetição da técnica para a confirmação diagnóstica. Como vantagem, a eletroforese fornece um diagnóstico que depende de poucos equipamentos, sendo sua realização possível em um laboratório que possua uma estrutura pequena, porém adequada para a confecção do gel de poliacrilamida e coloração e uma cuba vertical para a eletroforese.

O sequenciamento realizado na Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (Centro de Pesquisa Experimental, HCPA) utilizando o equipamento *ABI 3500 Genetic Analyzer* mostrou-se de boa qualidade por apresentar picos altos, agudos e distintos no eletroferograma. Segundo Prosdoci (2006), a produção de moléculas de DNA está atrelada a três fatores principais: (1) a realização da reação de amplificação; (2) a eletroforese capilar e (3) a nomeação das bases, onde se conclui que as máquinas sequenciadoras de DNA atuam apenas em parte do processo de obtenção da sequência de uma molécula desejada. Sendo assim, analisamos o processo de sequenciamento como um todo. Como o produto final, denominação da sequência de nucleotídeos, corroborou com dados referenciados no GenBank, podemos afirmar que a qualidade da amplificação da região desejada do gene *MDR1* por PCR, tanto no sentido “forward” como no “reverse”, foi adequada e produziu sequências de 144 e 148 pb. Essa afirmação baseia-se na boa qualidade dos eletroferogramas resultantes do sequenciamento, seus picos foram bem definidos, indicando a amplificação apenas do fragmento desejado. A análise do produto de PCR por sequenciamento mostrou ser um método confiável, rápido e sensível, não havendo necessidade de repetição da técnica.

A detecção de DNA após reação de PCR é rotineiramente realizada por gel de eletroforese, porém este é regularmente pouco sensível e requer longo tempo para separação o que impõe limitações para uma total eficiência das técnicas de PCR para análise rápida, específica e automatizada (DIAS et al., 2006).

Em todos os géis do estudo, bandas inespecíficas com fragmentos maiores foram detectadas, pelo fato do sequenciamento do mesmo produto de PCR resultar de uma amplificação limpa, deduz-se que estes fragmentos são resultantes de anelamentos ocorridos durante o processamento da eletroforese.

Dos 20 cães Collies analisados, 70% apresentaram a mutação canina MDR1 nt230 (del4). Esse dado corrobora com estudo realizado por Geyer et al. (2005a), onde o grupo realizou a análise gênica de diversas raças caninas na Alemanha, dentre ela 578 cães da raça Collie, destes, 76,1% apresentou pelo menos um alelo mutante. Porém, 33% dos cães deste experimento foram classificados como homozigotos para a mutação, sendo que nenhum dos 20 cães deste experimento apresentou este status gênico.

Se considerarmos o percentual dos alelos mutantes, o presente estudo teve um menor índice, 35% de alelos mutantes, quando comparados com estudos realizados nos EUA (NEFF et al., 2004), Alemanha (GRAMER et al., 2010) e Japão (KAWABATA et al., 2005), que apresentaram um percentual de 54,6%, 59% e 58,3% respectivamente. O principal fato a ser destacado para um menor índice de alelos mutantes é a ausência de cães homozigotos para a mutação no presente estudo. Este fato deve-se, provavelmente ao pequeno número de animais analisados, sendo necessário um número maior de análises para uma melhor representação dos Collies do Brasil.

Cães homozigotos para a mutação MDR1 nt230 (del4) revelam uma perigosa sensibilidade a diversas medicações. A sensibilidade à ivermectina tem sido amplamente relatada ao longo dos anos e correlacionada aos Collies. A intoxicação por ivermectina leva a graves sintomas neurológicos, com depressão nervosa central, podendo levar facilmente o paciente a óbito (HOPPER et al., 2002; PAUL et al., 1987; PULLIAM et al., 1985; TRANQUILLI et al., 1989). Também foram descritos efeitos neurotóxicos graves após o uso de doses terapêuticas únicas de moxidectina (GEYER et al., 2005b) e doramectina (YAS-NATAN et al., 2003), fármacos antiparasitários da classe das avermectinas; assim como loperamida, um opioide utilizado como antidiarreico; e dexametasona, anti-inflamatório corticoide amplamente utilizado na veterinária (MEALEY et al., 2007).

Indivíduos heterozigotos para a mutação possuem uma sensibilidade maior que indivíduos sem a mutação. Substratos da P-gp como a vincristina, vimblastina e doxorubicina provocaram efeitos adversos neurotóxicos em cães com um alelo mutante e um normal para o gene MDR1 (MEALEY et al., 2003). Fármacos como a vincristina e vimblastina são amplamente utilizados como terapia antineoplásica em cães. Recentemente, Krugman et al. (2011) foi relatado o caso de um Collie realizando tratamento quimioterápico com vincristina que apresentou graves sinais neurológicos, tais como automutilação, ataxia, déficit proprioceptivo e dor ortopédica grave, além de vômito, diarreia e inapetência. Após vários exames de sangue e de imagem descartarem as principais doenças de maior incidência para

estes sintomas, realizou-se o teste gênico para a mutação MDR1 nt 230 (del4), demonstrando que o paciente era homocigoto mutante. A partir do diagnóstico o tratamento quimioterápico foi alterado, utilizando fármacos não substratos da P-gp.

A sensibilidade de cães a fármacos substratos da P-gp não fica restrita apenas a raça Collie, tampouco ao substrato ivermectina, desta maneira a determinação de um status gênico frente à mutação canina do gene MDR1 torna-se uma ferramenta indispensável para a individualização terapêutica dos pacientes, evitando possíveis intoxicações e reações adversas medicamentosas, além de auxiliar na monitoração da mutação frente aos criadores das raças predispostas.

**- CAPÍTULO II -**

---

**TRAMADOL**

---

## 1 INTRODUÇÃO

O tramadol é um analgésico opioide, porém sua ação analgésica não é restrita aos mecanismos opioides, sendo assim classificado como um opioide atípico. Além da ativação de receptores opioides, o tramadol atua na inibição da recaptação de noradrenalina e serotonina (LEPPERT, 2009; RAFFA et al., 1992). A ampla margem de segurança e os limitados efeitos colaterais levam a uma grande utilização do fármaco no controle de dores moderadas a graves, particularmente para o controle da dor pós-operatória em cães e gatos (FLOR et al., 2013; LIVINGSTON, 2010).

Os opioides apresentam propriedades sedativa e hipnótica, além de serem analgésicos potentes. Sendo utilizados no tratamento de dores agudas e crônicas, sozinhos ou em associação a outros fármacos, como AINEs. Na medicina veterinária, os opioides mais utilizados pela via oral são o tramadol e a codeína (LIVINGSTON, 2010).

O termo opioide refere-se ao mecanismo de ação do ópio, retirado das sementes da papoula, *Papaver somniferum*, usado na medicina desde os primórdios da história. Evidências arqueológicas demonstraram vestígios de semente de papoula e cápsulas no período neolítico na Suíça (CHOUVY, 2010). Os escritos de Theophrastus (Séc.III a.C.) são os primeiros a referenciar o ópio. Os médicos árabes utilizavam na terapêutica e ajudaram a divulgar o uso para o extremo oriente. No início do século XVI, os portugueses iniciaram o hábito de fumar ópio. Nesta época, o ópio foi reintroduzido na literatura médica europeia por Paracelsus como láudano: um composto de ópio, sucos cítricos e quintessência de ouro, denominadas de pílulas pretas ou “Pedras da Imortalidade”, sendo receitadas como analgésicos. No século seguinte, moradores da Pérsia e da Índia começam a comer e beber misturas de ópio com finalidade recreativa (MARTINS et al., 2012). O médico inglês Sydenham, em 1680, considerou o ópio como sendo a substância mais eficaz e universal para aliviar todos os sofrimentos do homem (BERRIDGE e EDWARDS, 1981).

Farmacologicamente, os constituintes ativos do ópio são alcaloides. A morfina foi o primeiro alcaloide a ser isolado, sendo o sulfato de morfina seu principal sal. Com a modificação molecular da morfina foram produzidos os derivados semissintéticos (MARTINS et al., 2012). Denomina-se opiáceo todas as substâncias de origem natural originadas do ópio, tais como morfina, tebaína, codeína, papaverina e noscapina. Após o início da produção de compostos totalmente sintéticos semelhantes à morfina em sua ação, designou-se o termo opioide para todas as substâncias naturais ou sintéticas que tenham ação nos receptores



opioides. Os opioides têm propriedades e ação muito semelhantes ao ópio ou à morfina, sendo estes utilizados primariamente como analgésicos. A morfina continua sendo o modelo comparativo para os demais, por sua superior capacidade analgésica. Etorfina, meperidina, levorfanol, metadona, fentanil, hidromorfona, hidrocodona, butorfanol e tramadol são alguns exemplos de analgésicos opioides (MARTINS, 2012).

A empresa farmacêutica Grünenthal GmbH, fundada em 1946 na Alemanha, sintetizou a molécula de tramadol em 1962 (PEDERSEN et al., 2006), sendo comercializado na Alemanha em 1977 sob o nome comercial de Tramal® na forma injetável, sendo a forma oral inicialmente comercializada em meados de 1980 (ALMEIDA, 2009; McMILLAN et al., 2008). Nesta altura, a descoberta da molécula veio revolucionar o mercado farmacêutico de analgésicos. Posteriormente, outras indústrias farmacêuticas introduziram esta molécula com outros nomes comerciais e também com diferentes formas farmacêuticas. As diferentes formas farmacêuticas desenvolvidas ao longo dos tempos têm permitido que o tramadol continuasse a ser uma molécula muito utilizada na terapêutica da dor, melhorando a qualidade de vida a milhões de pessoas em todo o mundo (ALMEIDA, 2009). Inicialmente, o tramadol oral foi comercializado na formulação de cápsulas de liberação imediata (IR) e gotas. Comprimidos de tramadol de liberação prolongada (SR) foram comercialmente disponíveis na Europa desde meados dos anos 1990, permitindo mais conveniente de dosagem de duas vezes por dia (LIKAR et al., 2006).

No Brasil, o tramadol é comercializado sob a forma de cloridrato de tramadol como componente único e em associações. Nas farmácias humanas, está disponível na forma de solução injetável de ampolas com 50 mg em 1 mL e ampolas com 100 mg em 2 mL; na forma oral como gotas (50 mg/1 mL), cápsulas com 50 mg e comprimidos de liberação prolongada de 50 e 100 mg. A única associação disponível do tramadol é com paracetamol, em comprimidos revestidos com 37,5 e 325 mg respectivamente (DEF, 2011/12). Nas farmácias veterinárias, o tramadol é comercializado como cloridrato de tramadol na apresentação de comprimido palatável de 12 mg (DIÁRIO NACIONAL - DOU – ANVISA, 2013).

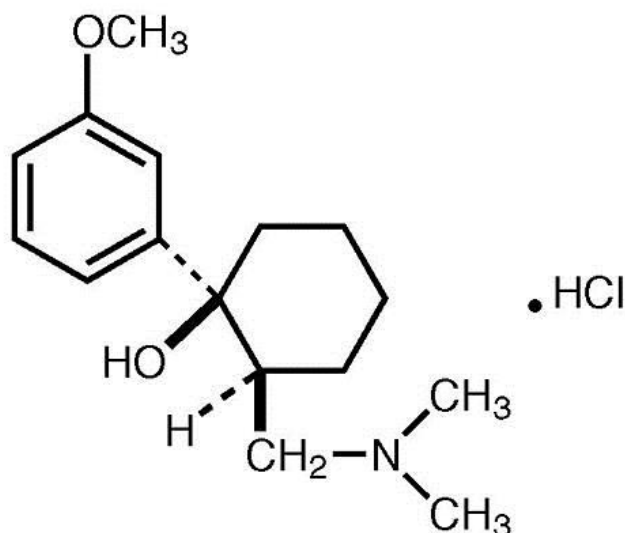
O tramadol é um medicamento de uso hospitalar e ambulatorial na medicina humana e veterinária, sendo necessária a apresentação de uma prescrição médica válida para que possa ser adquirido. De acordo com a portaria nº 344, de 12 de maio de 1998, o tramadol é listado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) na Lista A2- lista de substâncias entorpecentes de uso permitido somente em concentrações especiais, sujeitas a Notificação de Receita “A” (ANVISA, 1998).

## 1.1 ESTRUTURA E PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

O tramadol é um opioide sintético do grupo amino-ciclohexano (MALANA e ZOHRA, 2013). A denominação química do tramadol é  $(\pm)$  -cis-2- [(dimethylamino)methyl]-1- (3-methoxyphenyl)-cyclohexanol, apresentando a fórmula molecular  $C_{16}H_{25}NO_2$  e um peso molecular de 263,4 (ECDD, 2006).

O tramadol apresenta dois estereoisômeros e quatro enantiômeros, que são o  $(+/-)$  cis-2- dimethylaminomethyl- 1- (3- methoxyphenyl)- cyclohexanol e o  $(+/-)$  trans- 2- dimethylaminomethyl- 1- (3- methoxyphenyl)- cyclohexanol.

O tramadol é comercializado sob a forma de uma mistura racêmica da sua estrutura *cis* (ECDD, 2006), apresentando-se sob a forma de um sal, o cloridrato de tramadol, com um peso molecular de 299,84 (Figura 9). O cloridrato de tramadol é um pó branco, cristalino, amargo, inodoro, sendo facilmente solúvel em água, em etanol e metanol, porém muito pouco solúvel em acetona. O pH de uma solução aquosa a 1% (1 g/ 100 mL de água) é de 5,4. Apresenta um pKa básico de 9,41 (DAILY MED, 2007; DRUG BANK, 2012; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).



**Figura 9:** Fórmula estrutural do cloridrato de tramadol.

## 1.2 FARMACOCINÉTICA

Para minimizar a possibilidade de efeitos colaterais e toxicidade de um fármaco é importante que se conheça a farmacocinética da molécula. Farmacocinética é o estudo da absorção, distribuição, metabolização (biotransformação) e excreção de um fármaco. A farmacocinética é a medida e interpretação das variações das concentrações do fármaco no organismo ao longo do tempo em relação à dose administrada (BAUER, 2008).

### 1.2.1 Absorção

Absorção é definida como a passagem do fármaco do local de administração para a corrente sanguínea. Quando uma medicação é administrada extravascular, a absorção é necessária para que as moléculas alcancem o sistema circulatório. A absorção do tramadol, assim como dos demais fármacos, depende da via de administração, assim como a apresentação do fármaco (BAUER, 2008; ALMEIDA, 2009).

Um fármaco administrado pela via oral para ser absorvido, além de atravessar a mucosa intestinal, deve ficar intacto, sem sofrer a ação de enzimas metabolizadoras intestinais e hepáticas, referido como metabolização de primeira passagem. A fração do fármaco íntegro que chega à circulação sistêmica é denominada biodisponibilidade (BAUER, 2008). Vários fatores poderão interferir na biodisponibilidade de um fármaco administrado oralmente, tais como suas propriedades físico-químicas, a velocidade de trânsito gástrico e intestinal, o pH luminal, o fluxo sanguíneo local. Proteínas transportadoras de fármacos e enzimas metabolizadoras presentes no trato gastrointestinal também poderão interferir na absorção. A P-glicoproteína é uma importante proteína de transporte de fármacos presente na membrana apical do epitélio intestinal que limita a absorção de seus substratos, sendo uma bomba de efluxo celular (HUNTER e HIRST, 1997). Caso a molécula permaneça nos enterócitos intestinais por tempo suficiente, pode ser metabolizada por enzimas do complexo citocromo P450 que é altamente expresso nestas células. Os metabólitos serão absorvidos, aumentando sua concentração no sangue e então no fígado. Os metabólitos podem ser inativos ou ativos. Em algumas situações os metabólitos podem ter uma ação mais potente que o próprio fármaco (BRESOLIN, 2005).

Segundo Martin (1984), os opioides, de uma maneira geral, possuem uma boa absorção administrados pela via subcutânea (SC), intramuscular (IM) ou oral. O metabolismo de primeira passagem diminui a biodisponibilidade dos opioides, portanto, a dose oral muitas vezes deve ser maior que a parenteral para produzir o mesmo grau de analgesia.

O cloridrato de tramadol, após administração intramuscular, apresenta uma biodisponibilidade absoluta de 100% em cães (GIORGI et al, 2009c), semelhante ao encontrado em humanos (ALMEIDA, 2009).

Um estudo, realizado por Georgi et al. (2009c), demonstrou uma biodisponibilidade em cães de cerca de 10% do cloridrato de tramadol retal na apresentação de supositórios. Sendo que em humanos, a biodisponibilidade dos supositórios é de cerca de 80% (GRÜNENTHAL, 2008).

Em humanos, a absorção oral de tramadol é rápida, tanto na formulação de cápsulas de liberação imediata (IR) como em gotas. A biodisponibilidade de tramadol oral em humanos é cerca de 70%, podendo chegar em 100% quando administrado em doses múltiplas (ECDD, 2006). Em cães, a absorção oral de comprimidos e cápsulas de liberação imediata é rápida, entre 25 e 45 minutos (KUKANICH e PAPICH 2004; GIORGI, 2009a). Poucos estudos foram realizados com tramadol oral em cães, sendo os dados de biodisponibilidade um pouco controversos. Kukanich e Papich (2004) realizaram o primeiro estudo do tramadol administrado oralmente para cães, neste a biodisponibilidade do tramadol foi de 70%, semelhante ao encontrado em humanos. Porém, um estudo mais recente, utilizando técnicas de detecção mais precisas, demonstram que a biodisponibilidade de tramadol oral é mais baixa em cães, cerca de 30%, quando administrado na apresentação de cápsulas de liberação imediata (GIORGI et al., 2009c).

O tramadol na formulação de liberação prolongada foi desenvolvido para melhorar a adesão do paciente e reduzir a frequência de administração em humanos. Para modular a liberação de um fármaco, o método mais comumente utilizado é o de incluí-lo em um sistema de matriz. Sistemas de matriz de polímero hidrofílico provaram ser flexíveis para se obter um perfil de liberação desejável do fármaco, estes sendo amplamente utilizados na entrega controlada de drogas por via oral, promovendo uma liberação prolongada, especialmente para medicamentos hidrossolúveis como o tramadol (MALANA e ZOHRA, 2013). Existe apenas um estudo realizado por Giorgi et al. (2009b) com a administração de comprimidos de liberação prolongada de tramadol em cães que demonstrou uma baixa biodisponibilidade, cerca de 10% (GIORGI et al., 2009b).

### **1.2.2 Distribuição**

Após chegar à corrente sanguínea, o fármaco é distribuído para os líquidos intersticiais e intracelulares. A distribuição depende de características físico-químicas do fármaco, assim

como de fatores fisiológicos, tais como débito cardíaco, fluxo sanguíneo tecidual, permeabilidade capilar e volume tecidual (GIBALDI e PERRIER, 2007).

A ligação a proteínas plasmáticas do cloridrato de tramadol é baixa, aproximadamente 20% (MALONNE et al, 2003; ALMEIDA, 2009). A saturação das proteínas plasmáticas ocorre apenas quando são atingidas concentrações superiores ao limite considerado terapêutico (DAILY MED, 2007).

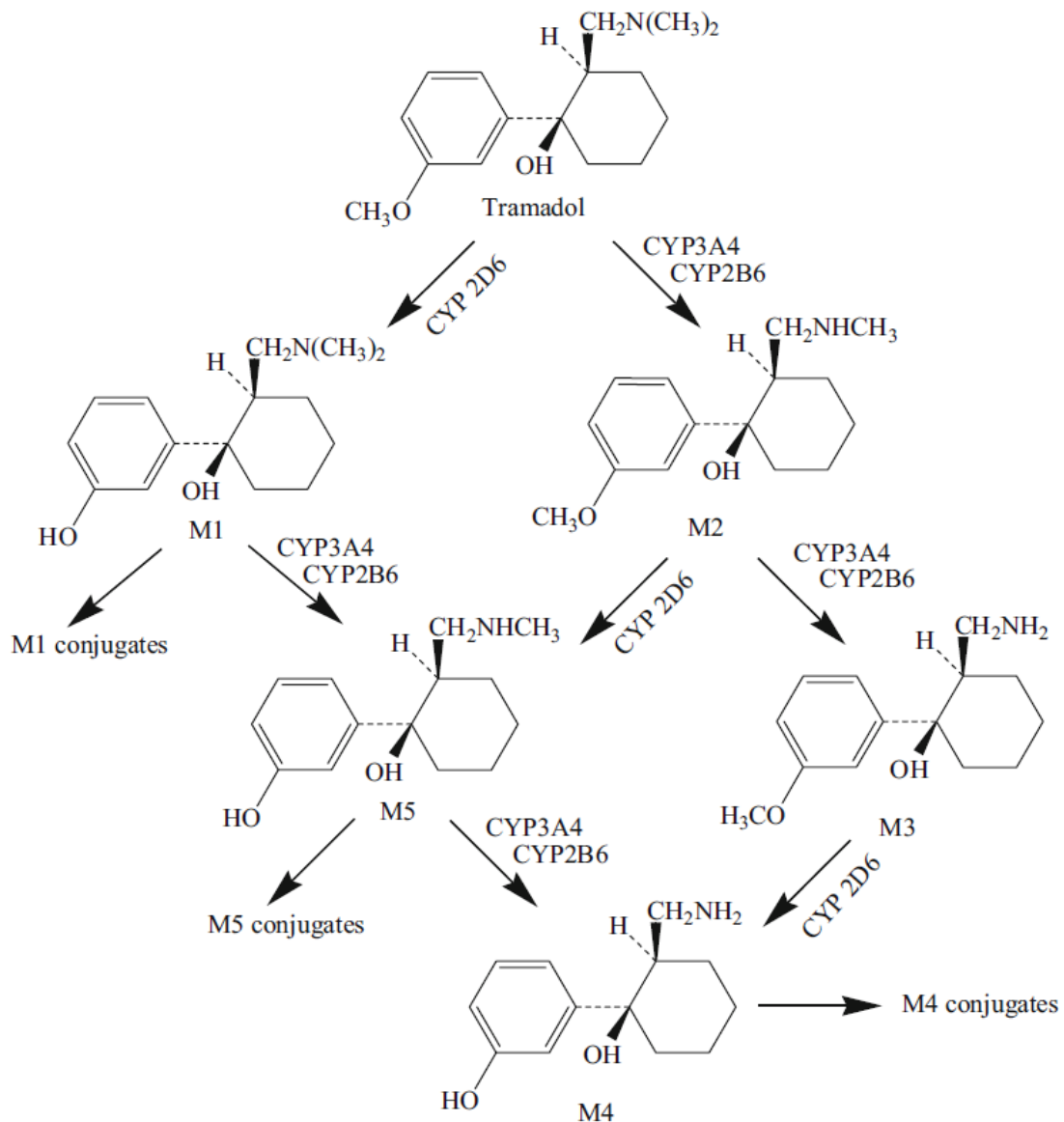
O tramadol apresenta uma elevada afinidade para os tecidos ( $V_d = 203 \pm 40$  L), tendo a capacidade de passar as barreiras hematoencefálica e placentária. Apenas uma pequena fração da dose de tramadol administrado é encontrada no leite materno (0,1%) e o mesmo se passa com o seu metabólito M1 (0,02%) (GRÜNENTHAL, 2008).

### 1.2.3 Metabolização

Os organismos vivos desenvolveram sistemas complexos para detoxicar xenobióticos. O metabolismo dos fármacos envolve dois tipos de reação, conhecidos como fase 1 e fase 2, ocorrendo normalmente no fígado. Podendo ocorrer ou não de modo sequencial. A metabolização tem a finalidade de tornar o fármaco mais hidrofílico, facilitando sua excreção renal (BAUER, 2008).

As reações de fase 1 são catabólicas, como oxidação, redução ou hidrólise, sendo seus produtos normalmente mais reativos, podendo ter mais ação que o fármaco original. Normalmente é introduzido na molécula um grupo reativo, como uma hidroxila, servindo como ponto de ataque para conjugação (fase 2). As reações de fase 2 são anabólicas e envolvem a conjugação, geralmente formando produtos inativos. Na conjugação ocorre a ligação de um grupamentos como glicuronil, sulfato, metil ou acetil. A maior parte da metabolização de fase 2 ocorre no fígado, mas pode ocorrer também nos pulmões e rins (BAUER, 2008).

A metabolização do tramadol é hepática. O tramadol possui pelo menos 11 metabólitos que já foram identificados, porém apenas um é importante por sua atividade farmacológica, o *O*-desmetiltramadol (M1) (MALONNE et al, 2003). Além do M1, os principais metabólitos encontrados no plasma são: *N*-desmetiltramadol (M2), e em menor proporção *N,N*-didesmetiltramadol (M3) e *N,N,O*-tridesmetiltramadol (M4), e *N,O*-desmetiltramadol (M5), conforme esquematizado na Figura 10 (LINTZ et al, 1981).



**Figura 10:** Principais vias metabólicas do tramadol. (Fonte: Lintz et al., 1981)

Ao sofrer metabolização de fase 1 o tramadol pode seguir duas vias metabólicas distintas, pode sofrer *O*-desmetilação, através da ação da enzima citocromo P450 2D6 (CYP2D6), formando o principal metabólito ativo M1, ou *N*-desmetilação, catalisada pelas enzimas CYP 2B6 e 3A4, formando o M2 (inativo). A proporção da formação de cada um destes dois metabólitos irá depender das concentrações das respectivas enzimas. Ainda através das reações de fase 1, a partir do M1 e M2, podem ainda surgir três metabólitos secundários adicionais, *N,N*-didesmetiltramadol (M3), o *N,N,O*-desmetiltramadol (M4) e o *N,O*-

didesmetiltramadol (M5) (Figura 10). O M5 é fracamente ativo, além de ter baixa penetração cerebral. Os metabólitos *O*-desmetilados podem ainda sofrer metabolização de fase 2, com reações de conjugação (ácido glucorônico) e de sulfatação (ácido sulfúrico), antes de serem eliminados pela urina (GIORGI et al., 2009a).

O metabólito ativo *O*-desmetiltramadol (M1) tem uma afinidade pelo receptor  $\mu$  opioide cerca de 200 vezes maior que o próprio tramadol (QUETGLAS et al., 2007; RAFFA et al., 1992). Um estudo recente em cães demonstrou que após 5 minutos da administração endovenosa de cloridrato de tramadol é possível a detecção de *O*-desmetiltramadol (M1), tendo um pico de concentração em 2 horas, estando presente por até 8 horas (VETTORATO et al., 2010).

O metabolismo do cloridrato de tramadol pode ser afetado por fatores variados, tais como a funcionalidade hepática, associação com outras medicações metabolizadas pelas mesmas rotas metabólicas ou ainda fatores genéticos do indivíduo, principalmente relacionados à enzima de metabolização CYP2D6 (ALMEIDA, 2009).

#### 1.2.4 Eliminação

Os fármacos são eliminados, pelo processo de excreção, inalterados ou como metabólitos. Os rins são os órgãos mais importantes para a excreção. A excreção fecal ocorre predominantemente para fármacos administrados oralmente que não foram absorvidos, ou metabólitos excretados na bile ou secretados no trato gastrointestinal (GIBALDI e PERRIER, 2007).

Aproximadamente 90% do tramadol absorvido é eliminado na urina, tanto na forma inalterada (30%) quanto na forma de metabólito (60%) o restante sendo eliminado nas fezes (MALONNE et al., 2003; GRÜNENTHAL, 2008).

A eliminação do tramadol pode ser descrita por um modelo farmacocinético bicompartimental. Na espécie humana o tempo de meia vida de eliminação relatado fica entre 5 e 6 h. A meia vida do metabólito M1 é mais longa, cerca de 9 horas (MALONNE et al., 2003). Pacientes idosos, com idade acima de 75 anos pode ter um acréscimo de 1,4 h. Pacientes com cirrose hepática ou com insuficiência renal apresentaram um tempo de meia vida bastante prolongado tanto do tramadol como do M1 (GRÜNENTHAL, 2008).

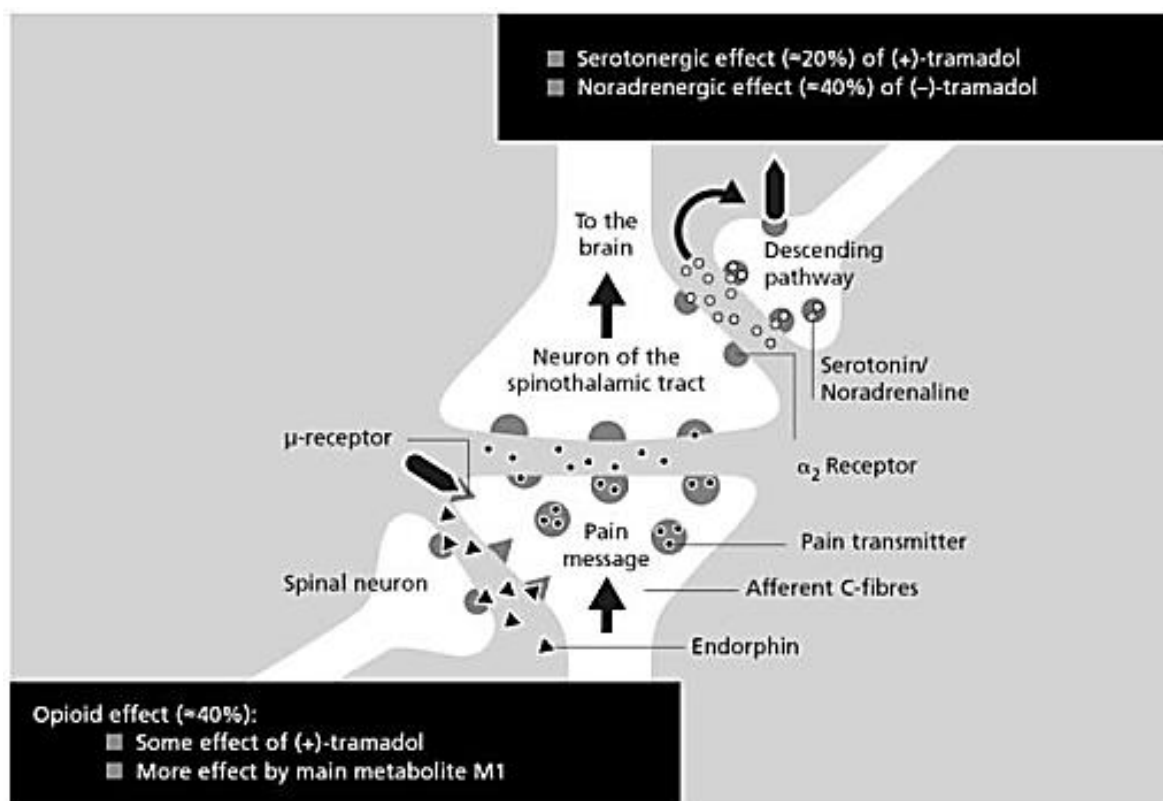
A meia vida de eliminação é acentuadamente mais curta nos cães quando comparado a humanos. Kukanich e Papich (2004) observaram um tempo de meia vida de eliminação de 0,80

$\pm 0,12$  h quando o fármaco era administrado por via intravenosa e de  $1,71 \pm 0,12$  após administração oral. Neste mesmo estudo, o M1 teve um tempo de meia vida de eliminação de  $1.69 \pm 0.45$  e  $2.18 \pm 0.55$  h após administração intravenosa e oral respectivamente. Estudos posteriores também observaram um tempo de meia vida de eliminação do tramadol acentuadamente mais curto nos cães comparado aos humanos, assim uma administração mais frequente seria necessária para manter a concentração plasmática do fármaco em níveis terapêuticos (GIORGI et al., 2009a).

### 1.3 FARMACODINÂMICA

#### 1.3.1 Mecanismos de ação

O tramadol produz ação antinociceptiva através de um duplo mecanismo: 1- ação sobre os receptores opioides e 2- inibição da recaptação da noradrenalina e serotonina e estímulo de liberação de serotonina (Figura 11). Sendo que os dois mecanismos de ação agem sinergicamente, produzindo analgesia. O efeito clínico do tramadol está diretamente correlacionado com seu metabolismo, sendo que tanto a droga mãe quanto um de seus metabólitos tem atividade analgésica (RAFFA et al., 1992; RAFFA et al., 1993).



**Figura 11.** Demonstração esquemática dos mecanismos de ação do tramadol no corno dorsal da medula (Fonte: Schug, 2007).



O tramadol possui afinidade moderada pelos receptores opioides  $\mu$  (mu), tendo uma fraca afinidade pelos receptores opioides  $\delta$  e  $\kappa$  (delta e kappa), cerca de 20 vezes menor (RAFFA et al., 1992). Quando o fármaco liga-se aos receptores opioides, principalmente  $\mu$ , inibe a percepção da nocicepção (ALMEIDA, 2009).

A transmissão da dor é inibida pelo tramadol pelo seu efeito na inibição da recaptação da serotonina, por interação nos receptores serotoninérgicos e, inibição da recaptação da noradrenalina, por interação com os receptores  $\alpha 2$  adrenérgicos. O aumento destes dois neurotransmissores na fenda sináptica inibe a transmissão ascendente do estímulo nociceptivo. Outros fármacos com este mesmo mecanismo de ação de inibição ou bloqueio da recaptação dos neurotransmissores monoaminas (ex. amitriptilina) quando utilizados em conjunto com os opioides podem ser considerados adjuvantes importantes na terapêutica da dor, uma vez que potencializam o seu efeito, através de mecanismo complementar e sinérgico (ALMEIDA, 2009).

O tramadol é uma mistura racêmica (1:1) de seus dois enantiômeros ( $\pm$ ), cada enantiômero possui um mecanismo de ação, sendo ambos farmacologicamente ativos como analgésicos. A desmetilação hepática do tramadol produz um importante metabólito ativo, *O*-desmetiltramadol (M1), que também está presente como uma mistura racêmica. (+) Tramadol interage com receptores opioides ( $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\kappa$ ), serotoninérgicos e  $\alpha 2$  adrenérgicos. (-) Tramadol interage nos receptores  $\alpha 2$  adrenérgicos. (+) M1 interage com receptor  $\mu$  opioide, tendo uma ligação muito mais potente com o receptor, 2 a 200 vezes maior que o (+) Tramadol. (-) M1 interage com os receptores  $\alpha 2$  adrenérgicos (Tabela 7) (KUKANICH e PAPICH, 2004).

**Tabela 7-** Mecanismos de ação específicos dos enantiômeros do tramadol e do *O*-desmetiltramadol (M1).

ENANTIÔMERO	RECEPTOR ATIVADO
(+) Tramadol	Opioides ( $\mu, \delta, \kappa$ )- fraca afinidade Serotoninérgicos $\alpha 2$ adrenérgicos
(-) Tramadol	$\alpha 2$ adrenérgicos
(+) M1	$\mu$ opioide (afinidade 200x maior que tramadol)
(-) M1	$\alpha 2$ adrenérgicos

### 1.3.1.1 Receptores Opioides

Os receptores opioides têm como ligantes endógenos as encefalinas:  $\beta$ -endorfinas e dinorfinas (HOWLETT e REES, 1986). As encefalinas são dois dos membros de uma grande família de peptídeos opioides endógenos, as endorfinas, todas com resíduo de tirosina no N-terminal. Parte da estrutura química da morfina assemelha-se a uma porção da tirosina, um grupamento amina separado do anel fenólico por dois átomos de carbono (SAWYNOK, 2003).

Os receptores opioides foram identificados a partir de estudo realizado em 1976 com preparados de fêto de roedores (Martin et al., 1976 *apud* MARTINS, 2012). Foram identificados a princípio três receptores, sendo estes nomeados por letras gregas,  $\mu$  (mu),  $\kappa$  (kappa) e  $\sigma$  (sigma), correspondentes às substâncias utilizadas para estimulá-los, morfina, cetociclazocina e SKF 10047 (*N*-alilnormetazocina), respectivamente. Estudos comprovaram que o receptor  $\sigma$  não era bloqueado pelos antagonistas opioides clássicos, como a naloxona e a naltrexona. Atualmente o receptor  $\sigma$  não é mais classificado como receptor opioide. Os efeitos de fármacos, como a fenciclidina, primeiramente relacionados à ativação deste receptor, ocorriam devido ao bloqueio dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA. No início da década de 1980, foi determinado um novo tipo de receptor opioide, denominado  $\delta$  (delta), perfazendo novamente três receptores opioides (MARTINS, 2012). Posteriormente identificou-se um quarto receptor opioide o ORL<sub>1</sub> que apesar da homologia com os demais receptores, não é antagonizado pela naloxona (WALDHOER et al., 2004).

A terminologia dos quatro receptores sofreram algumas revisões, sendo proposto pelos biólogos moleculares a nomenclatura de MOPr ( $\mu$  = mu de morfina), DOPr ( $\delta$ - delta de deferente, por ter sido primeiramente identificado na *vas deferens* no rato), KOPr ( $\kappa$  – kappa de cetociclazocina) e NOPr (ORL<sub>1</sub> de nociceptina/orfanina) (WALDHOER et al., 2004). A *International Union of Pharmacology (IUPHAR)* estabeleceu uma nova denominação conforme a sequência cronológica de clonagem dos receptores, sendo utilizadas as letras OP seguidas pelo número referente, sendo assim, OP<sub>1</sub> o delta ( $\delta$ ), OP<sub>2</sub> o kappa ( $\kappa$ ), OP<sub>3</sub> o mu ( $\mu$ ) e OP<sub>4</sub> o ORL<sub>1</sub> (MARTINS, 2012) (Tabela 8).

**Tabela 8** – Nomenclatura dos receptores opioides.

<b>Nomenclatura farmacológica</b>	<b>Recomendação da IUPHAR</b>	<b>Nomenclatura da biologia molecular</b>
$\mu$	OP3	MOPr
$\delta$	OP1	DOPr
$\kappa$	OP2	KOPr
ORL <sub>1</sub>	OP4	NOPr

Os receptores opioides são ligados à proteína G. Quando ativados pelo ligante, ocorre inibição da enzima adenilato ciclase, reduzindo o AMPc (adenosil monofosfato cíclico), além da ativação na MAP quinase (proteína quinase ativada por mitógenos). A redução de AMPc causa um fechamento dos canais de  $Ca^{++}$  voltagem dependentes nas terminações nervosas pré sinápticas, reduzindo a liberação de neurotransmissor, e abertura de um tipo de canal de potássio – canal de potássio retificador interno, este último causando hiperpolarização de membrana nas membranas pós sinápticas (WEBSTER, 2005).

Os receptores estão localizados em diferentes regiões cerebrais, medulares e periféricas, esta última tanto nos plexos mioentéricos, como nas terminações dos neurônios aferentes nociceptores (ALMEIDA, 2009). Periféricamente, os opioides inibem a descarga de terminações aferentes nociceptivas, ficando mais evidenciado seus efeitos sob condições inflamatórias. A infiltração de morfina, após cirurgia articular no joelho, em cirurgias dentárias, em pacientes com osteoartrite, demonstrou efetiva analgesia (SAWYNOK, 2003). Ao nível espinal, os opioides inibem a transmissão sináptica dos neurônios aferentes nociceptivos no corno dorsal da medula, tanto via membrana pré-sináptica, inibindo a liberação de neurotransmissor, quanto na pós-sináptica, hiperpolarizando a membrana. Além disso, ocorre liberação de serotonina nas fibras inibitórias descendentes. A analgesia supraespinal envolve, além do mecanismo de ação já mencionado, a liberação de peptídeos opioides endógenos (WALDHOER et al., 2004).

Os receptores do tipo  $\mu$  já foram localizados nas lâminas III e V do córtex, no tálamo, substância cinzenta periaquedutal, substância gelatinosa e trato gastrointestinal. Os receptores  $\kappa$  foram identificados nos neurônios sensitivos periféricos, substância gelatinosa na medula espinal, hipotálamo e substância cinzenta periaquedutal. Os receptores  $\delta$  são localizados nos

núcleos pontinhos, amígdalas, bulbo olfatório, córtex cerebral profundo e neurônios sensitivos periféricos (MARTINS et al., 2012). Os receptores ORL<sub>1</sub> estão localizados em diversas áreas corticais, áreas olfatórias, estruturas límbicas, tálamo, substância cinzenta periaquedutal, substância negra, cornos dorsal e ventral da medula, na musculatura lisa, em gânglios periféricos e no sistema imune (MOLLEREAU e MOULEDOUS, 2000).

### *1.3.1.2 Recaptação de neurotransmissores monoaminas*

A noradrenalina e a serotonina são neurotransmissores de baixo peso molecular de ação rápida da classe das aminas. As vesículas sinápticas destes neurotransmissores são recicláveis, sendo utilizadas inúmeras vezes, isso é possível por existirem transportadores que realizam a recaptação destes para os neurônios pré-sinápticos (FIELDS et al., 1991).

A transmissão de processos da dor pode ser diminuída acentuadamente por um sistema fisiológico de analgesia do SNC (sistema nervoso central). Neste sistema de analgesia estão envolvidos três sistemas principais: (1) área periaquedutal cinzenta do mesencéfalo e parte superior da ponte; (2) núcleo magno da rafe na parte inferior da ponte e superior do bulbo, que recebe sinais da área periaquedutal cinzenta; estes sinais são transmitidos para a medula; (3) complexo para a inibição da dor no corno dorsal da medula. Outras áreas cerebrais que estimulem alguma das regiões de analgesia podem também modular a dor (BASBAUM e FIELD, 1984).

A modulação da transmissão dor ocorre por vias descendentes provenientes do mesencéfalo e do tronco encefálico, exercendo importante efeito inibitório sobre a transmissão no corno posterior. Várias substâncias estão envolvidas no sistema de analgesia, dentre elas a encefalina, a 5-HT (serotonina), a noradrenalina e adenosina. As fibras originadas do núcleo central da rafe secretam serotonina e noradrenalina nas suas terminações nervosas, atuando nos interneurônios inibitórios da dor. A inibição da recaptação da serotonina e noradrenalina irão aumentar suas concentrações na fenda sináptica, aumentando o efeito analgésico das mesmas (GEBHART, 2004; LEPPERT, 2009).

### **1.3.2 Efeitos farmacológicos**

Em humanos, a ação analgésica do tramadol está relacionada parcialmente a sua interação e de seu metabólito ativo M1, molécula com uma afinidade 200 vezes maior pelo receptor  $\mu$  opioide que o tramadol (RAFFA et al, 1992). Os receptores  $\mu$  opioides estão presentes principalmente no córtex cerebral, tálamo e substância cinzenta periaquedutal

(ALMEIDA, 2009). A analgesia deve-se também a inibição da recaptação de serotonina e noradrenalina a nível medular (RAFFA et al, 1992). Um estudo realizado por Collart et al. (1993) demonstrou que apenas 30% da atividade analgésica do fármaco em humanos era bloqueada pela naloxona, sendo 70% da atividade não relacionada ao receptor  $\mu$  opioide.

Estudos em cães demonstraram que o efeito nociceptivo da administração de tramadol independe das concentrações plasmáticas de M1, sugerindo que o próprio tramadol seja o principal responsável pelo efeito analgésico em cães (GIORGI et al., 2009c; KUKANICH e PAPICH, 2011).

A concentração plasmática entre 100-300 ng/mL apresenta analgesia efetiva em humanos. Existe uma correlação direta entre concentração plasmática e efeito analgésico, mas também há bastante variação individual (GRÜNENTHAL, 2008).

Os efeitos dos opioides estão correlacionados diretamente com o tipo de receptor ao qual se liga, assim como o tipo de ligação, como o grau de afinidade e especificidade. Os receptores opioides tem uma ampla distribuição no cérebro e nas estruturas periféricas. Apesar do principal efeito dos opioides ser a analgesia, estes fármacos produzem muitos outros efeitos (YAKSH e WALLACE, 2012).

Os opioides representam a base para o tratamento da dor, porém, dependendo da causa da dor, o uso isolado ou a combinação de analgésicos de diferentes classes pode ser necessário, tais como anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), anticonvulsivantes e antidepressivos (YAKSH e WALLACE, 2012). O tramadol, quando utilizado em doses adequadas, não desencadeia os efeitos colaterais típicos dos opioides, tampouco os efeitos indesejáveis dos AINEs. Esse fato torna o tramadol uma excelente escolha para o tratamento analgésico prolongado em animais (GIORGI et al., 2009a). Além da ação analgésica, o tramadol mostrou ser efetivo como antitussígeno, atuando na inibição direta no centro da tosse (KUKANICH e PAPICH, 2004; GRÜNENTHAL, 2008).

O tramadol demonstra ser efetivo como a morfina para dores moderadas, mas menos efetiva para dor aguda severa. É indicado para analgesia após cirurgias, inclusive ortopédicas, tanto em humanos como em animais. Combinado à morfina produz uma maior analgesia quando comparado à morfina sozinha (Webb et.al., 2002 *apud* KUKANICH e PAPICH, 2004).

Sua administração neuraxial (espinal ou extradural) nas anestésias ou analgesias locais é efetiva no controle da dor transoperatória em humanos, podendo ser utilizado também em crianças. Em cães, sua utilização extradural e endovenosa mostrou-se eficaz no controle de dor

trans e pós-operatória em cirurgias ortopédicas com alto grau álgico (GUEDES et al., 2002; VETTORATO et.al., 2010).

O tramadol tem um baixo potencial para causar dependência, não tendo relevante efeito depressivo cardiovascular ou respiratório. Tem um pequeno efeito sobre o peristaltismo intestinal, tendo uma baixa incidência de efeitos colaterais em humanos e animais (KUKANICH e PAPICH, 2004; McMILLAN et al., 2008; GIORGI et al., 2009a).

Takaharu et al. (2011) realizaram um estudo em cães anestesiados com sevoflurano que receberam tramadol IV, na dose de 4 mg/kg, no qual concluíram que o fármaco produz uma prolongada vasoconstrição periférica, efeito provável de sua inibição na recaptção de noradrenalina e serotonina. O efeito no aumento da resistência vascular levou a um aumento transitório e moderado na pressão arterial dos animais, contrabalançando os efeitos depressores cardiovasculares do sevoflurano.

A ausência de efeitos colaterais é dose dependente. Apesar da ligação com os receptores opioides ser mais fraca quando comparado à morfina, com o aumento da dose, ou conforme a via de administração, podem ser observado efeitos como: euforia, náusea, depressão cardiorrespiratória, tremores, convulsões, hipotermia, miose, indução de coma, apneia, dependência, tolerância e constipação. O tramadol não deve ser associado a fármacos que atuem na monoaminoxidase (MAO), para não potencializar seus efeitos depressores (ALMEIDA, 2009).

Administrações repetidas de tramadol oral e parenteral por 6-26 semanas em ratos e cães, assim como em administrações orais por 12 meses em cães não desencadeou alterações hematológicas e bioquímicas nos animais. Alterações neurológicas como sedação, salivação, convulsão e redução de ganho de massa corporal foram observadas apenas em doses superiores as terapêuticas. Ratos toleraram doses de 20 mg/kg e cães toleraram doses de 10 mg/kg sem qualquer reação adversa. Em estudos *in vitro* houve evidência de efeitos mutagênicos, os quais não se repetiram em estudos *in vivo*, podendo ser classificado como não mutagênico (GRÜNENTHAL, 2008).

## 1.4 DETERMINAÇÃO DE TRAMADOL EM PLASMA

Métodos analíticos para a identificação e quantificação de substâncias devem garantir resultados reprodutíveis. A escolha do método depende de vários fatores, tais como: características químicas da substância a ser analisada, concentração na amostra, matriz em que ela se encontra (ALMEIDA, 2009).

Vários métodos de detecção de tramadol em plasma humano têm sido relatados. Métodos analíticos utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), podendo ser acoplado a detectores diversos (VLASE et al., 2008). A CLAE utiliza instrumentos que podem ser totalmente automatizados. A separação é feita através de uma coluna recheada com materiais especialmente preparados e uma fase móvel, eluída sob altas pressões. As separações podem ser feitas a partir de amostras de vários tipos com diversos compostos (JARDIM et al., 2006).

O detector é o componente mais caro e sofisticado do sistema cromatográfico, delimitando muitas vezes a sensibilidade da análise (JARDIM et al., 2006). Os detectores utilizados para a análise do tramadol variam entre detectores ópticos por absorvância no ultravioleta (GAN et al., 2002; KÜÇÜK et al., 2005; KÜÇÜK e KADIOGLU, 2005; SOUSA et al., 2008); detectores por fluorescência (GIORGI et al., 2009b; KUKANICH e PAPICH, 2004; KUKANICH et al., 2005; QUETGLAS et al., 2007; ROUINI, 2006; VETTORATO et al., 2010); e espectrômetro de massas (GERGOV et al., 2009; SACCOMANNI et al., 2010; SHILO et al., 2007; VLASE et al., 2008).

A espectrometria de massas é uma das técnicas mais importantes de análise molecular devido a sua especificidade e sensibilidade de análise. Após a injeção da amostra no espectrômetro de massas, ocorre a produção de íons por uma fonte de ionização. Depois de formados os íons, estes são analisados pelo analisador de massas de acordo com a sua razão massa/carga (JARDIM et al., 2006).

O método de detecção de uma substância deve ser validado segundo critérios pré-estabelecidos, para que os dados sejam confiáveis, com uma boa reprodutibilidade e qualidade (FDA, 2001).

## 1.5 FARMACOGENÉTICA

A farmacogenética e a farmacogenômica estudam as influências genéticas sobre as respostas a medicamentos, estando a farmacogenética focada em efeitos de genes isolados, enquanto que a farmacogenômica estuda simultaneamente vários genes e suas interações. Pacientes tratados com diversos medicamentos apresentam grande variabilidade de resposta, podendo não responder, responder parcialmente ou demonstrar reações adversas ou até mesmo intoxicação medicamentosa. Estas variações de resposta podem levar à hospitalização ou até mesmo à morte um grande número de indivíduos em todo o mundo. A variabilidade ao tratamento pode ser decorrente de vários fatores, tais como doenças, diferenças na farmacocinética e farmacodinâmica dos medicamentos, fatores ambientais e fatores genéticos. Os genes influenciam alterando a expressão de proteínas envolvidas tanto na cinética quanto na dinâmica dos fármacos. Os genes que podem causar variações nas respostas terapêuticas podem ser divididos em três grupos: farmacocinéticos, receptor/alvo e modificadores da doença. Os genes que influenciam na farmacocinética são principalmente os correlacionados a codificação de enzimas metabolizadoras ou proteínas transportadoras (SHASTRY, 2006).

Algumas isoformas das enzimas metabolizadoras possuem polimorfismos importantes, tais como a CYP2C9 e a CYP2D6. Além das enzimas citocromo P450, alterações na expressão de outras enzimas metabolizadoras, como a tiopurina metiltransferase (TPMP) também influenciam em alguns tratamentos farmacológicos (LU e MA, 2012). Estas variações genéticas determinam variações na velocidade/intensidade da biotransformação de fármacos. Os metabolizadores lentos são aqueles que possuem ausência ou diminuição de uma determinada enzima metabolizadora, o que expõe o paciente a quadros tóxicos. Metabolizadores rápidos possuem um aumento na produção da enzima, podendo levar a uma eliminação muito rápida do fármaco, ou à intoxicação devido a uma rápida elevação na concentração plasmática de um metabólito ativo (METZGER et al., 2006).

Variações genéticas de proteínas de transporte de fármacos são importantes por influenciar sua absorção, distribuição e eliminação. Polimorfismos genéticos podem alterar a expressão ou a conformação desses transportadores, afetando a afinidade do mesmo pelo substrato (METZGER et al., 2006). A P-glicoproteína (P-gp), produto do gene MDR1, tem sido bastante estudada por ser um transportador de vários medicamentos. A P-gp é uma bomba de efluxo que evita que fármacos substratos se acumulem no interior celular. A alteração na expressão ou função da P-glicoproteína tem sido associada a uma maior susceptibilidade a



diversas intoxicações em humanos e animais. Estudos adicionais relacionados à expressão e à função da P-gp espécie-específica têm implicação clínica importante em termos de eficiência de diversos tratamentos (LINARDI e NATALINI, 2006).

Algumas linhagens de cães possuem uma mutação no gene MDR1, denominada nt230 (del 4). Indivíduos homozigotos mutantes (MDR1-/-) não expressam a P-gp, e indivíduos heterozigotos (MDR1 +/-) a expressam em menor quantidade. Cães da raça Collie possuem uma alta incidência da mutação, podendo tornar-se modelos experimentais para testes de novos substratos (GEYER et al., 2005a).

Conforme evidenciado na revisão bibliográfica do presente capítulo, o tramadol é amplamente utilizado na medicina veterinária no tratamento de dores agudas e crônicas, sendo prescrito tanto em formulações parenterais quanto orais. Porém, existem poucos estudos farmacocinéticos do fármaco na espécie canina, principalmente na apresentação oral. A variabilidade individual na cinética do tramadol, assim como sua baixa biodisponibilidade quando administrado por via oral pode ser justificado por sua possível interação com a P-gp. Sendo assim, é importante que o tramadol seja testado como possível substrato da P-gp.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a farmacocinética do cloridrato de tramadol administrado por via oral, na formulação de liberação prolongada, comparando cães normais com os portadores da mutação MDR1 nt230 (del4).

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Adaptar a metodologia analítica da detecção do cloridrato de tramadol em soro de cães, por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada a um detector de espectrometria de massa (LC-MS/MS);
- Estabelecer se o *status* gênico da mutação MDR1 nt230 (del4) influencia na absorção oral do tramadol, utilizando dados de concentração plasmática versus tempo de administração.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 FÁRMACOS

- Cloridrato de tramadol padrão – cedido pela União Química (Brasil)
- Cloridrato de tramadol comprimidos de liberação prolongada 100mg – Tramal Retard® (Grünenthal) – adquirido da indústria farmacêutica
- Propranolol – cedido pelo Centro Bioanalítico de Medicamentos (CBIM) da Faculdade de Farmácia da UFRGS

### 3.2 REAGENTES

- Acetonitrila para cromatografia líquida: LiChrosolv® (Merck)
- Acetato de etila para cromatografia líquida: LiChrosolv® (Merck)
- Ácido fórmico (HCOOH)
- Água deionizada Milli-Q® - Millipore Corporation
- Hidróxido de sódio (NaOH) 0,1M

### 3.3 EQUIPAMENTOS

- Agitador de tubos: Finemixer SH 2000 (Digger)
- Banho Ultrassom
- Bomba de vácuo (Edwards)
- Centrífuga a vácuo com liofilizador acoplado: RC 10.10 – RCT 90 (Jouan)
- Centrífuga refrigerada: MR 23i (Jouan)
- Coluna HPLC Luna C18 5µm 150x4,6mm (Phenomenex) (Figura 12)
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência: LC 10 AD (Shimadzu) (Figura 13)
  - Controlador: SCL 10A (Shimadzu)
  - Degasificador: DGU 14A (Shimadzu)
  - Forno para coluna: CTO 10A (Shimadzu)
  - Injetor automático: SIL 10AD (Shimadzu)
- Espectrômetro de massas: Quatro LC (Micromass)
- Freezer – 80°C
- Freezer -20°C
- Holder Universal Security Guard (Phenomenex)

- Pipetas 1000, 100 e 20 $\mu$ L
- Pré-coluna HPLC C18 4 x 3,0mm (Phenomenex)
- Refrigerador
- Vórtex



**Figura 12.** Coluna cromatográfica Luna® C18, acoplada à pré-coluna C18- Phenomenex.



**Figura 13.** Vista da sala de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao espectrofotômetro de massas.

### 3.4 ANIMAIS

Neste experimento foram utilizados 20 cães da raça Collie, 11 fêmeas e 9 machos, com idade entre 1 e 12 anos, com peso corporal entre 19 e 31 kg. Todos os animais estavam clinicamente hígidos durante o estudo, sendo provenientes de propriedades particulares. Os proprietários autorizaram previamente a utilização de seus cães no experimento.

Parte do estudo foi realizada no Hospital Veterinário da ULBRA. Os cães foram agrupados em um número de 2 a 5, conforme a data da experimentação. Eram mantidos juntos em uma sala ampla e ficavam com supervisão constante. Entre as coletas sanguíneas, os animais passeavam nas dependências do campus universitário. Os cães permaneceram nas dependências do hospital durante as 26 horas de experimento, sendo alimentados com ração seca e úmida para a espécie e receberam água *ad libitum*.

Nove cães do estudo eram provenientes de uma mesma propriedade agropecuária. Tendo em vista a distância entre esta e a universidade, realizou-se o experimento na própria fazenda, onde foi montada uma estrutura adequada para o mesmo. Estes receberam os mesmos cuidados citados acima.

Este projeto foi aprovado pela Comissão Científica e pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as diretrizes e normas nacionais e internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08/10/2008 que estabelece o uso de animais em experimentos científicos (Anexo A).

### 3.5 PROCEDIMENTOS PRÉVIOS AO EXPERIMENTO

Os cães foram vermifugados e vacinados previamente ao estudo. Uma semana antes do experimento os cães foram examinados clinicamente. Neste momento foi coletado 5 mL de sangue, sendo distribuído em frascos com e sem anticoagulante, para posterior exames complementares e tipificação genética para o MDR1. Os materiais coletados permaneceram em refrigeração e foram encaminhados para o Laboratório de Análises Clínicas e de Parasitologia do Hospital Veterinário da ULBRA para realização de hemograma e bioquímicos e para o Laboratório de Farmacogenética Animal da UFRGS para extração de DNA e posterior congelamento. A metodologia para análise genética dos animais foi descrita no Capítulo I do presente estudo. A análise gênica foi realizada posteriormente a fase experimental com os cães, sendo assim, os avaliadores não sabiam o *status* gênico dos animais.

Os exames realizados foram hemograma, contagem de proteínas plasmáticas e plaquetas, creatinina e fosfatase alcalina. Todos os animais apresentaram normalidade nos exames. Os animais foram nomeados por números de 1 a 20 para identificação do material biológico e posterior análise.

### 3.6 ADMINISTRAÇÃO DO CLORIDRATO DE TRAMADOL E COLETA DE AMOSTRAS

Os cães foram submetidos a um jejum sólido de 12 horas previamente a administração do medicamento, ficando com livre acesso à água. Duas horas após a administração do comprimido de cloridrato de tramadol, foi oferecido ração comercial para cães. Na espécie humana, a administração oral do cloridrato de tramadol com alimentos não afeta a velocidade ou a quantidade absorvida, não havendo, assim, restrições à sua administração à refeição ou em jejum (MALONNE et al., 2003; DAILY MED, 2007). Apesar disto, no presente estudo realizou-se jejum alimentar devido ao fato de não ter sido investigado a interferência da absorção oral juntamente com alimentos em cães.

Previamente à administração da medicação, foram realizados pesagem e exame clínico geral dos animais. Tricotomizou-se a porção cranial do antebraço direito, onde foi realizada antissepsia da região com álcool 70% e posterior venoclise a partir de um cateter periférico 20G colocado na veia cefálica. Imediatamente após a colocação do cateter, coletou-se a amostra de tempo zero (0), seguindo-se a irrigação do cateter com solução fisiológica heparinizada (1UI/mL), procedimento padrão realizado após a coleta de todas as amostras.

Foi administrado oralmente 1 comprimido de 100 mg de cloridrato de tramadol de liberação prolongada (Tramal Retard®) juntamente com uma pequena porção de ração pastosa para cães, facilitando a deglutição do comprimido. Segundo o laboratório fabricante, o comprimido contém como excipiente: celulose microcristalina, lactose, estearato de magnésio, hidroxipropilmetilcelulose, polietilenoglicol, propilenoglicol, sílica coloidal anidra, talco e dióxido de titânio (GRÜNENTHAL, 2008).

Amostras sanguíneas de 2 mL foram coletadas antes da administração do fármaco, 30 minutos, assim como 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12 e 24 horas. O sangue coletado foi acondicionado em frascos para coleta sanguínea sem anticoagulante (tampa vermelha).

Para a manutenção da via, foi colocada uma solução heparinizada após cada coleta sanguínea, conforme citado anteriormente. Para cada coleta das amostras sanguíneas,

utilizavam-se duas seringas, na primeira era coletado 1 mL de sangue para remoção de resquícios da solução heparinizada, posteriormente, na segunda seringa, era realizada a coleta de 2 mL de sangue que era transferido para o tubo de coleta. Em seguida era injetado no cateter solução heparinizada, o cateter era fechado e protegido com bandagem elástica adesiva. Os tubos foram identificados com a letra C (canino), seguida do número referente ao animal, a letra T (tempo), seguida do tempo de coleta. Os animais foram identificados de C1 a C20, e os tempos identificados de T0 a T9.

Os cães permaneceram com os cateteres durante as primeiras 12 horas do experimento. Não foi necessária colocação de colar elisabetano ou mordanças nos animais durante todo o experimento. O cateter foi removido após a penúltima coleta, para não haver necessidade de colocação de colar elisabetano durante a noite, período entre a coleta das 12 e 24 horas. A última coleta foi realizada por punção venosa com seringa e agulha.

Após a coleta de cada amostra, os tubos ficavam na bancada a temperatura ambiente entre 30 e 40 minutos, até a retração do coágulo. Posteriormente, as amostras eram centrifugadas a uma velocidade de 3000 g durante 10 minutos. O soro era colocado em um criotubo identificado e congelado a -20°C.

### 3.7 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS FISIOLÓGICOS

Os cães foram avaliados por dois veterinários anteriormente a cada coleta sanguínea, nos tempos 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12 e 24 horas após a administração do tramadol. Os parâmetros avaliados foram pulso, frequência respiratória e grau de sedação. A escala de sedação utilizada foi de 0 a 4 (Tabela 9), baseada em estudo realizado por McMillan et al. (2008). Quando havia dúvida referente ao sono fisiológico dos animais, estes eram levemente estimulados para posterior avaliação. Não foram realizados testes nociceptivos nos cães deste experimento, os parâmetros fisiológicos acima referenciados foram observados com o objetivo de avaliar possíveis sinais de sensibilidade ao fármaco.

**Tabela 9-** Escala de sedação utilizada para avaliar cães submetidos à administração de tramadol oral. (McMillan et al., 2008 modificado)

ESCALA DE SEDAÇÃO	DESCRIÇÃO DE COMPORTAMENTO
0	Nenhum grau de sedação
1	Levemente sedado
2	Animal sedado, mais calmo, atividade diminuída.
3	Sedado, muito mais calmo, deitado, ainda respondendo a estímulos externos.
4	Muito sedado, animal dormindo.

### 3.8 TÉCNICA CROMATOGRÁFICA

Os soros dos cães foram processados e analisados no Centro Bioanalítico de Medicamentos (CBIM) pertencente à Faculdade de Farmácia da UFRGS.

Para a identificação e quantificação do tramadol no soro dos cães utilizou-se cromatografia líquida acoplada a um detector de massas (LC-MS), com a metodologia analítica baseada em estudo realizado por Patel et al. (2009), utilizando o propranolol como padrão interno (PI). Foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) LC 10 AD Shimadzu®, com injetor automático SIL 10AD, degasificador DGU-14A, e forno para a coluna CTO 10A, acoplado a um detector de espectrômetro de massas Quatro LC Micromass® (Figura 13).

A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna de fase reversa Luna® C18 5µm 150 x 4,6mm da marca Phenomenex (Figura 12). Utilizou-se uma pré-coluna C18 4 x 3,0mm da mesma marca. O controle e armazenamento dos dados foram feitos por um computador equipado com o *software* MassLynx® (Waters Corporation).

#### 3.8.1 Caracterização da metodologia analítica usada para a detecção, identificação e quantificação do cloridrato de tramadol

A metodologia analítica por LC-MS requer algumas etapas como a preparação da amostra, a separação cromatográfica e a detecção por espectrometria de massa.

Foram preparadas soluções estoque de cloridrato de tramadol e de propranolol (PI) mensalmente, estocadas em um balão volumétrico âmbar em refrigeração. A partir do padrão do cloridrato de tramadol base, preparou-se uma solução de estoque, diluída em uma solução



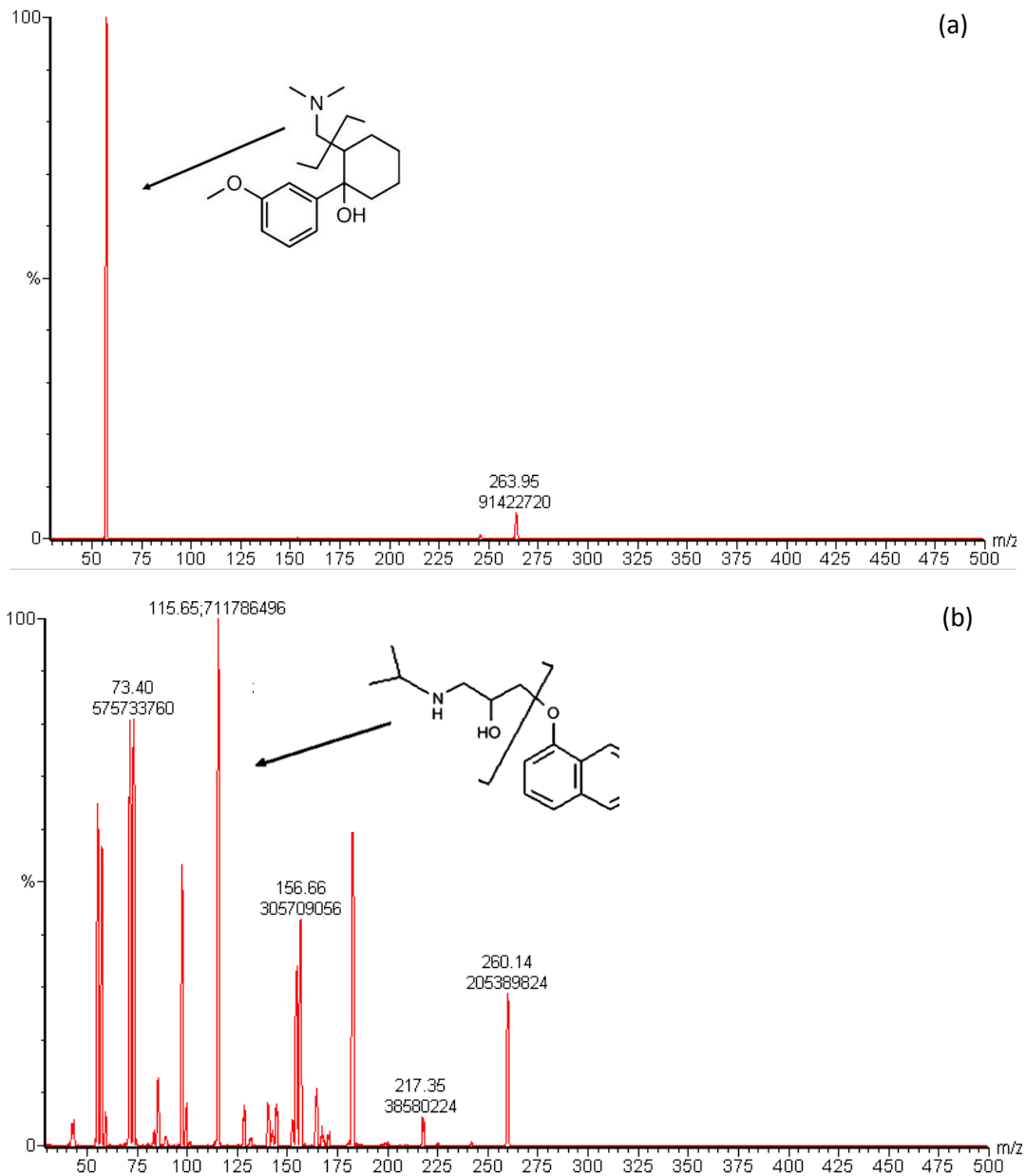
de acetonitrila – água Milli-Q® (50:50) em uma concentração de 200 µg/mL; o propranolol foi preparado na mesma concentração.

Inicialmente, fez-se a injeção direta no detector de massas do padrão analítico do cloridrato de tramadol em uma concentração de 2 µg/mL, realizado com o auxílio de uma bomba de infusão de seringa. Essa infusão prévia foi realizada sem que a solução de análise passasse pela coluna cromatográfica. Com esta injeção direta, ficaram definidas as condições do tipo de *electrospray* a aplicar às substâncias, bem como a voltagem ideal para a fragmentação do tramadol, determinando-se as condições do espectrômetro de cone, lente, voltagem e energia de colisão.

Tanto para o tramadol quanto para o padrão interno propranolol, foram determinados dois íons, sendo um correspondente ao íon principal e o outro correspondente ao íon de confirmação (resultantes da fragmentação das moléculas), denominado íon filho. Para quantificação dos níveis de tramadol monitorou-se a transição do íon formado a partir do tramadol de 263,95 m/z para o fragmento filho de 58 m/z. O propranolol fragmenta-se em vários fragmentos filhos, porém sua quantificação foi feita monitorando a transição do íon principal de 260,14 m/z para o de 115,65 m/z (Figura 14).

Foram então definidas as condições de *electrospray* positivo, bem como a voltagem de colisão de 15 V para a fragmentação do tramadol e do PI, voltagem do cone 20 V para tramadol e 30 V para o PI. Foi definida a temperatura da fonte como 120°C e a temperatura de dessolvatação foi de 350°C.

As substâncias foram identificadas com base no seu cromatograma (pico e tempo de retenção) e o respectivo espectro, confirmando a massa definida para a sua detecção, identificação e confirmação. O tempo de retenção do tramadol e do PI foi de 2,55 min.



**Figura 14.** Espectro dos produtos iônicos do (a) tramadol (263,95  $\rightarrow$  58  $m/z$ ), (b) propranolol (PI, 260,14  $\rightarrow$  115,65  $m/z$ )

### 3.8.2 Detecção e quantificação do tramadol em solução

Após as definições da detecção, procedeu-se o estudo da separação cromatográfica do tramadol em fase móvel. Muitos parâmetros foram variados até que as condições de análise fossem adequadas, para uma boa separação cromatográfica com suficiente sensibilidade.

A partir da solução estoque de tramadol, preparou-se diferentes diluições em acetonitrila e água (50:50) para estabelecer a metodologia da LC. As concentrações de tramadol preparadas foram: 1000, 500, 250, 100, 50, 25 e 10 ng/mL.

Várias combinações de fase móvel foram testadas, assim como taxa de fluxo. A fase móvel de escolha para a utilização durante o experimento foi de acetonitrila e ácido fórmico 0,1% (80:20 (v/v)), no modo isocrático, com uma taxa de fluxo de 0,4 mL/min. A coluna foi mantida a uma temperatura de 30°C. O volume de injeção foi de 10 µL para cada análise. As condições de detecção, assim como os parâmetros da cromatografia estão resumidas na Tabela 10.

**Tabela 10-** Parâmetros analíticos da CLAE acoplada ao detector de massas (LC –MS) para a detecção do cloridrato de tramadol em soro canino.

CROMATOGRAFIA LÍQUIDA (LC)	DETECTOR DE MASSAS (MS)
Fase estacionária: coluna C18	Ionização: <i>eletrospray</i> positivo
Fase móvel: acetonitrila – ácido fórmico 0, 1% (80:20)	Voltagens do cone: 20V (tramadol) e 30V (propranolol)
Fluxo: 0,4 mL/min.	Voltagem do capilar: 3,5 kV
Temperatura da coluna: 30°C	Energia de colisão: 15 V
Volume de injeção: 10 µL	Temperatura da fonte: 120°C
	Temperatura de dessolvatação: 350°C

### 3.8.3 Preparo das amostras

Para a quantificação de uma substância em uma amostra biológica como o plasma ou soro, existe a necessidade de realizar a extração do analito. Uma matriz biológica tem, na sua constituição, diversos elementos que vão desde grandes moléculas proteicas a simples sais orgânicos, podendo, cada uma delas, ser um potencial interferente na análise. O método de extração é baseado nas características do analito.

No presente estudo foi realizada extração do tipo líquido-líquido, conforme protocolo proposto por Küçük et al. (2005) modificado. Este processo extrativo se baseia na diferente

solubilidade dos compostos em diferentes solventes. Estão envolvidas neste processo duas fases imiscíveis, uma aquosa e uma orgânica.

O volume da amostra de soro analisado foi de 100µL. Para a validação do método foi utilizado soro de cão sem tramadol e sem padrão interno, propranolol. O soro branco, livre dos fármacos, foi obtido a partir de coleta sanguínea de vários cães que não haviam recebido as medicações. Os diversos soros brancos foram misturados em um falcon e aliqotados em eppendorfs de 2 mL, com posterior congelamento.

#### ***Protocolo de extração líquido-líquido:***

- Descongelamento do soro em bancada;
- Vórtex do soro
- 100 µL de soro
- 10 µL de PI (propranolol, 5 µg/mL)
- Vórtex por 10 segundos
- 10 µL de NaOH 0,1M
- Vórtex por 10 segundos
- 500 µL acetato de etila
- Shaker por 5 minutos
- Centrifugação a 5000 rpm por 10 minutos
- Congelamento em freezer – 80°C (cerca de 5 minutos)
- Transferência da porção não congelada (fase orgânica) para um tubo de evaporação
- Evaporação em centrífuga a vácuo com liofilizador acoplado (cerca de 40 minutos)
- Ressuspensão em 100 µL de acetonitrila-água (50:50)
- Vórtex vigoroso por 30 segundos.

#### **3.8.4 Validação parcial do método analítico**

A metodologia analítica foi adaptada do estudo realizado por Patel et al. (2009), onde foi analisado tramadol em plasma humano. Foi realizada uma validação parcial, conforme preconizado pela *Food and Drug Administration* (FDA), avaliando-se seletividade, exatidão, precisão intradia e interdia e limite inferior de quantificação (LOQ).

Os métodos analíticos selecionados para a identificação e quantificação de substâncias, em qualquer tipo de matriz em que elas se encontrem, devem garantir resultados reprodutíveis

e confiáveis. A escolha do método depende, não só das características específicas da substância em análise (características físico-químicas e concentração), como da matriz em que ela se encontra (características físico-químicas e presença de outras substâncias interferentes). Para que se possa garantir a qualidade, a segurança e a reprodutibilidade dos resultados obtidos, o método selecionado deve ser validado segundo critérios pré-estabelecidos (ALMEIDA, 2009).

A validação tem como objetivo garantir que o método seja reproduzido com especificidade, recuperação, exatidão e precisão, assegurando a credibilidade para a sua utilização (FDA, 2001).

A especificidade é definida como a capacidade do método em distinguir a substância analisada de todas as outras presentes na amostra. A recuperação indica a eficiência do procedimento de purificação das amostras, indicando a quantidade do fármaco obtida após a extração do plasma, comparada a soluções de tramadol, ambos com concentrações conhecidas de tramadol. Assim, a recuperação corresponde a uma porcentagem do analito recuperada após a extração (CAUSON, 1997).

O processo de validação foi realizado utilizando-se soro branco, livre dos analitos, adicionado de tramadol em concentrações diferentes pré-estabelecidas. Os pontos da curva de análise foram nas concentrações de 1000, 500, 250, 100, 50, 25, 10, 5 e 1 ng/mL, com controles de qualidade (CQ) alto, médio e baixo a partir de soluções padrão de tramadol nas concentrações 800, 200 e 3 ng/mL respectivamente. Nestas soluções foi pipetado o padrão interno (PI) propranolol em uma concentração de 500 ng/mL. Para a validação do método três curvas com as diluições citadas foram injetadas consecutivamente no LC-MS, assim como seis injeções de cada CQ. O procedimento foi repetido no dia seguinte, avaliando-se a linearidade e o limite inferior de quantificação (LOQ). A linearidade foi obtida por meio de construção da curva de calibração que representa a relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito (BRASIL, 2003).

### **3.8.5 Análise das amostras**

A análise das amostras dos cães que receberam tramadol de liberação lenta era realizada posteriormente a passagem de uma curva de calibração com os pontos nas mesmas concentrações utilizadas na validação. Após confirmação da linearidade e sensibilidade eram processadas as amostras dos cães.

As amostras eram descongeladas em bancada e homogeneizadas. Colocava-se 100µL da amostra, 10 µL do PI, para então proceder-se a extração. Após ressuspensão, as amostras eram colocadas em vials de vidro com *insert* para serem injetadas no cromatógrafo.

O perfil sérico do tramadol de liberação prolongada foi avaliado a partir de dados farmacocinéticos calculados pelo método não compartimental. Métodos não compartimentais são usados para estimar valores de biodisponibilidade, *clearance*, volume de distribuição baseado nos dados da concentração detectada pelo tempo após a administração do fármaco. Métodos não compartimentais não exigem um pressuposto modelo compartimental específico para um fármaco, podendo ser aplicados a qualquer modelo compartimentado, desde que se possa assumir uma farmacocinética linear (GIBALDI e PERRIER, 2007).

Foram determinados os parâmetros de biodisponibilidade, tempo de meia vida, depuração, volume de distribuição, utilizando equações que serão listadas a seguir, conforme descrito por Gibaldi e Perrier (2007).

Para a avaliação do perfil farmacocinético das concentrações de tramadol em soro canino, foi utilizado o programa Microsoft Excel® 2010.

A constante de velocidade de eliminação ( $\lambda$ ) foi calculada pela inclinação da porção terminal da curva log-linear dos perfis de concentração por tempo de cada um dos cães, levando em consideração os últimos três pontos do perfil.

A partir do valor de  $\lambda$ , determinou-se o tempo de meia vida do fármaco ( $t_{1/2}$ ), conforme equação 1. O tempo de meia vida é o tempo necessário para a concentração do fármaco no plasma chegar à metade, ou seja, o tempo de meia vida de eliminação do fármaco (GIBALDI e PERRIER, 2007).

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{\lambda} \quad (1)$$

A área sob a curva (ASC) foi calculada pelo método trapezoidal dos tempos 0 a  $t$  ( $ASC_{0-t}$ ), em que  $t$  é o último tempo de coleta, equação 2. Foi calculada a área sob a curva extrapolada, conforme equação 3. A  $ASC_{0-t}$  foi somada a ASC extrapolada ( $ASC_{ext}$ ), resultando na  $ASC_{0-\infty}$ , equação 4.

$$ASC_{0-t} = \frac{(C_0+C_1)}{2} \times (t_1 - t_0) + \frac{(C_1+C_2)}{2} \times (t_2 - t_1) + \dots + \frac{(C_{t-1}+C_t)}{2} \times (t_t - t_{t-1}) \quad (2)$$

$$ASC_{ext} = \frac{C_t}{\lambda} \quad (3)$$

$$ASC_{0-\infty} = ASC_{0-t} + ASC_{ext} \quad (4)$$

Segundo Shargel et al. (2005), o cálculo da área sob a curva está relacionado ao volume da medicação absorvido sistemicamente.

A área sob a curva de primeiro momento ( $ASMC_{0-\infty}$ ) também foi calculada pelo método trapezoidal. Calculando primeiramente  $ASMC_{0-t}$  e  $ASMC_{ext}$ , e posteriormente somando os dois resultados, equações 5, 6 e 7.

$$ASMC_{0-t} = \left( \frac{(C_0 \times t_0) + (C_1 \times t_1)}{2} \right) \times (t_1 - t_0) + \dots + \left( \frac{(C_{t-1} \times t_{t-1}) + (C_t \times t)}{2} \right) \quad (5)$$

$$ASMC_{ext} = \left( \frac{C_t \times t}{\lambda} \right) + \left( \frac{C_t}{\lambda^2} \right) \quad (6)$$

$$ASMC_{0-\infty} = ASMC_{0-t} + ASMC_{ext} \quad (7)$$

A concentração plasmática máxima ( $C_{m\acute{a}x}$ ) e o tempo de concentração máxima ( $t_{m\acute{a}x}$ ) foram obtidos diretamente do gráfico das concentrações plasmáticas pelo tempo de coleta.

O tempo de residência médio (MRT) foi calculado a partir dos valores de  $ASC_{0-\infty}$  e  $ASMC_{0-\infty}$ , conforme equação 8.

$$MRT_{ns} = \frac{ASMC_{0-\infty} (oral)}{ASC_{0-\infty} (oral)} \quad (8)$$

Para a complementação dos parâmetros farmacocinéticos do tramadol oral de liberação prolongada foi realizado a análise do tramadol IV em 4 cães de mesmo porte, com peso entre 23 e 35 kg, sendo administrado 3 mg/kg de cloridrato de tramadol solução injetável (100 mg/

2mL). Foi colocado um cateter periférico 20G na veia cefálica para a realização das coletas sanguíneas. A administração do tramadol foi realizada *in bolus* na veia cefálica contralateral à de venóclise. Foram realizadas coletas de sangue seriadas previamente à administração do tramadol e nos tempos 5, 15, 30 minutos, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas. O soro foi analisado com a mesma metodologia descrita para o tramadol oral.

Para o cálculo de biodisponibilidade, utilizou-se dados da farmacocinética do tramadol administrado na dose de 3 mg/kg intravenoso (IV) a partir de um grupo de 4 cães (equação 9). A biodisponibilidade ( $F$ ) refere à fração de uma dose oral administrada que atingiu a circulação sistêmica.

$$F = \frac{ASC_{0-\infty(oral)} \times Dose_{(i.v.)}}{ASC_{0-\infty(i.v.)} \times Dose_{(oral)}} \quad (9)$$

A depuração ou *clearance* ( $Cl$ ) é o termo utilizado para descrever a eliminação corporal do medicamento sem identificar o mecanismo do processo. A depuração é descrita em termos de volume de líquido corporal livre do fármaco por unidade de tempo (exemplo, mL/min) (Shargel et al., 2005). A depuração foi estimada a partir da dose oral administrada ( $D$ ), sua biodisponibilidade ( $F$ ) e a  $ASC_{0-\infty(oral)}$ , equação 10.

$$Cl = \frac{F \times D_{(oral)}}{ASC_{0-\infty(oral)}} \quad (10)$$

O volume de distribuição ( $Vd$ ) é de um volume hipotético que se relaciona com as concentrações séricas do fármaco para a quantidade deste no corpo, refletindo a extensão em que ele está presente nos tecidos extravasculares. O volume de distribuição ( $Vd$ ) é um parâmetro farmacocinético importante uma vez que determina a dose necessária para alcançar uma concentração uniforme do fármaco nos tecidos determinado imediatamente após a dose administrada. Assim,  $Vd$  é o volume requerido para contabilizar todo o fármaco no organismo, se as concentrações de todos os tecidos fossem as mesmas que a concentração plasmática. A maioria dos pacientes não irá realmente atingir o estado estacionário. O volume de distribuição é em unidades de volume, tais como L ou mL (BAUER, 2008).

O volume de distribuição foi calculado a partir da depuração e do tempo de residência médio, conforme descrito na equação 11.



$$Vd = Cl \times MRT$$

### 3.8.6 Análise estatística

A análise estatística do presente estudo teve o auxílio da Unidade de Bioestatística do GPPG do HCPA. Os animais foram agrupados como normais (homozigotos sem a mutação) e heterozigotos. Os dados também foram analisados entre os indivíduos do grupo.

Para análise estatística os dados foram plotados em uma planilha no software SPSS, versão 18.0.0., conforme orientação de Guimarães e Hirataka (2012).

Os dados das concentrações plasmáticas de tramadol pelo tempo de administração foram analisados utilizando a análise de GEE (Generalized Estimating Equations) que se baseia na metodologia dos Modelos Lineares Generalizados. O método de análise de dados longitudinais pelo GEE possibilita a análise de desfechos contínuos, mesmo quando a variável não apresenta distribuição normal ou esfericidade, sendo mais confiável que a utilização de ANOVA-MR quando utilizamos dados de pacientes onde podem ocorrer variações entre indivíduos, podendo ser ajustadas (GUIMARÃES e HIRAKATA, 2012). Estes dados serão apresentados na forma de média e seu respectivo desvio-padrão. O nível de significância estabelecido foi de 0,05.

Os parâmetros farmacocinéticos, por serem amostras independentes, foram analisados utilizando o teste Mann-Whitney. Os dados serão apresentados como média e desvio padrão dos grupos. O nível de significância estabelecido foi de 0,05.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS FISIOLÓGICOS

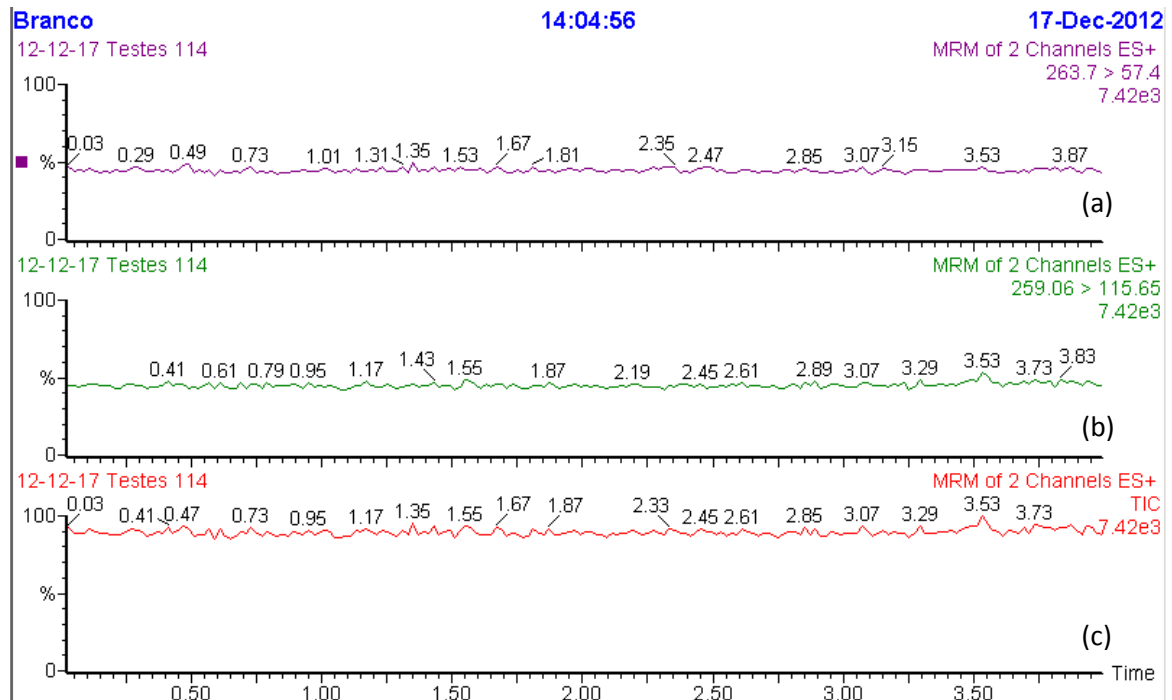
Dos vinte cães do experimento, dezessete apresentaram uma baixa frequência cardíaca de repouso, média de 65 bpm. O fato de que 85% dos Collies apresentaram uma frequência cardíaca de repouso abaixo dos parâmetros médios para a espécie levanta a hipótese de ser uma característica da raça em estudo. Para a comprovação desta hipótese, estudos hemodinâmicos seriam necessários para avaliação cardíaca dos cães.

A dose média de cloridrato de tramadol de liberação prolongada foi de  $4,16 \pm 0,67$  mg/kg (média  $\pm$  DP), sendo administrada como comprimido inteiro de 100 mg. Os cães não apresentaram alterações nas frequências cardíaca e respiratória de repouso entre o tempo zero e vinte e quatro horas após a administração do tramadol oral. O ritmo de pulso também não se alterou. Um leve grau de sedação foi observado duas horas após a administração do tramadol, com uma variação entre o score 1 e 2 da escala, sendo o aumento gradual até as quatro horas, diminuindo gradualmente após 6 horas da administração. Os cães 2, 8 e 20 apresentaram um maior grau de sedação, classificada como grau 3 na escala utilizada, nos tempos correlacionados à concentração plasmática máxima, porém não teve correlação ao genótipo do MDR1, pois dois destes cães eram heterozigotos e um normal. Nenhum outro efeito colateral foi observado nos 20 cães do experimento.

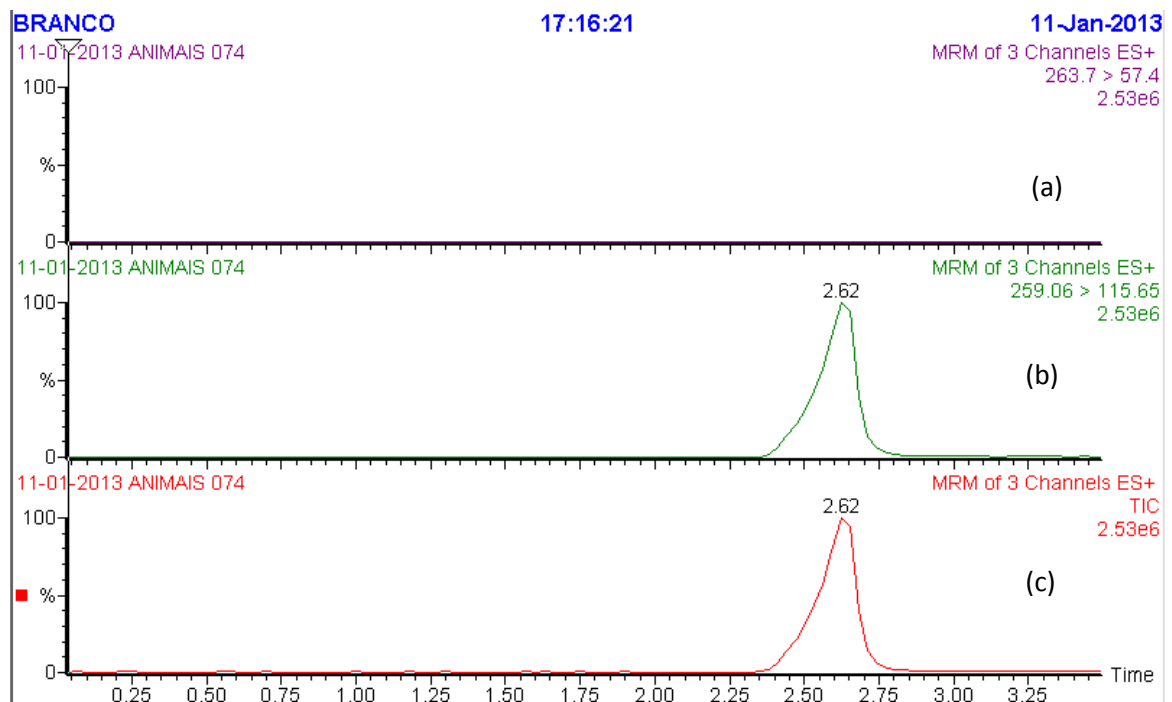
### 4.2 VALIDAÇÃO PARCIAL DA METODOLOGIA ANALÍTICA POR LC- MS PARA A QUANTIFICAÇÃO DE TRAMADOL EM SORO DE CÃES

Os métodos desenvolvidos demonstraram especificidade para os analitos do estudo, não ocorrendo interferência nos picos de identificação do tramadol e do propranolol. Os cromatogramas obtidos por LC- MS do tramadol e do propranolol (PI) em soro canino podem ser observados nas Figuras 15, 16, 17 e 18.

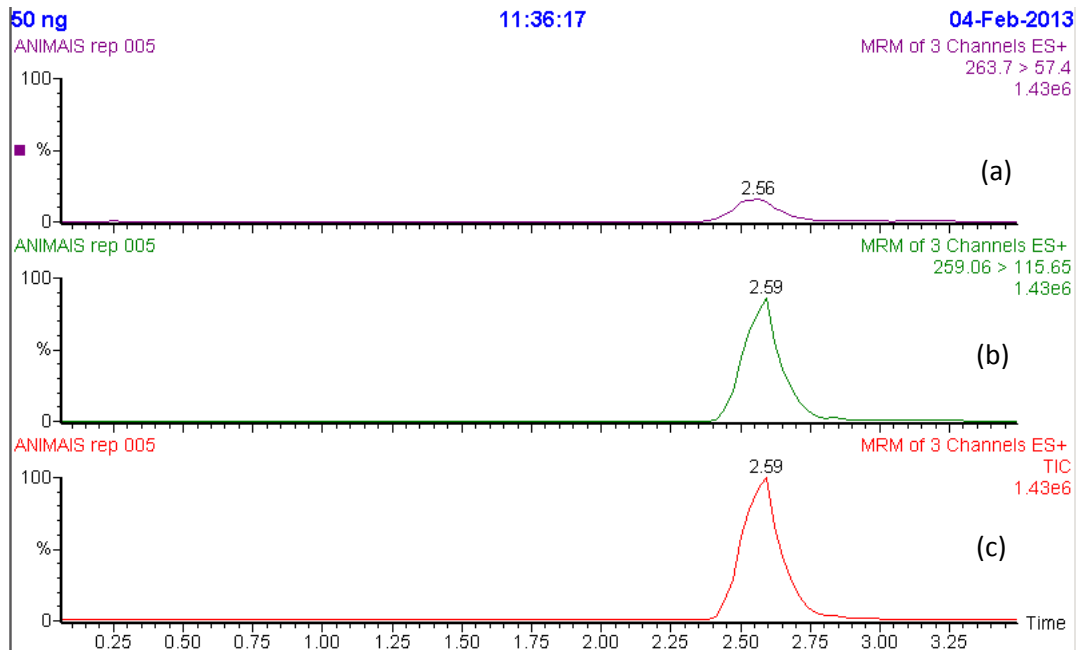
O tempo de retenção tanto do tramadol quanto do padrão interno foi de aproximadamente 2,6 min. O critério de aceitação da especificidade foi de não surgir picos de nenhum contaminante no mesmo tempo de retenção para o mesmo peso molecular dos analitos, sendo que nas análises do tramadol e do PI, a presença do fármaco filho, resultado da fragmentação da molécula do tramadol aumentou a especificidade atingida quando utilizamos a espectrofotometria de massas.



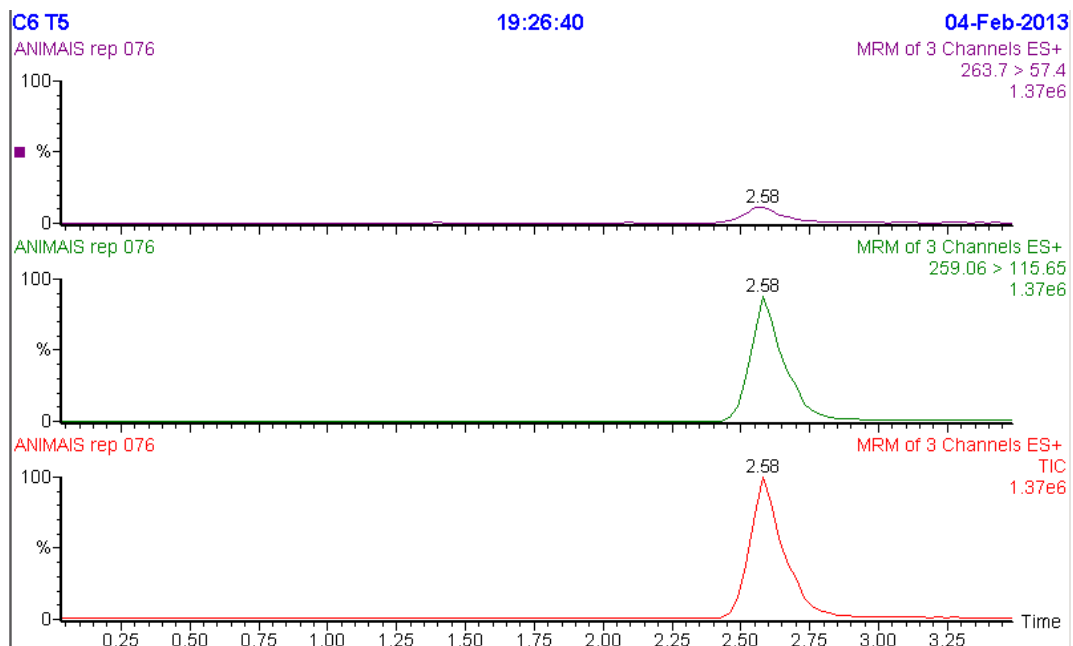
**Figura 15.** Cromatogramas para (a) tramadol (263,7 →57,4) e (b) propranolol (PI 259,06→115,65) e para a soma dos dois (c) em soro duplo branco.



**Figura 16.** Cromatogramas obtidos por LC-MS para (a) tramadol (263,7 →57,4) e (b) propranolol (PI 259,06→115,65) e para a soma dos dois (c) em soro branco com PI.



**Figura 17.** Cromatogramas obtidos por LC-MS para (a) tramadol (263,7 →57,4) e (b) propranolol (PI 259,06→115,65) e para a soma dos dois (c) em soro com 50 mg de tramadol (ponto da curva) com PI.



**Figura 18.** Cromatogramas obtidos por LC-MS para (a) tramadol (263,7 →57,4) e (b) propranolol (PI 259,06→115,65) e para a soma dos dois (c) em amostra de soro de cão do experimento no tempo de 4 horas após a aplicação do tramadol com PI.

A partir dos valores médios obtidos das três injeções de cada um dos pontos de análise com as concentrações de 1000, 500, 250, 100, 50, 25, 10, 5 e 1 ng/mL, foi construída a reta de calibração, com controles de qualidade (CQ) 800, 200 e 3 ng/mL.

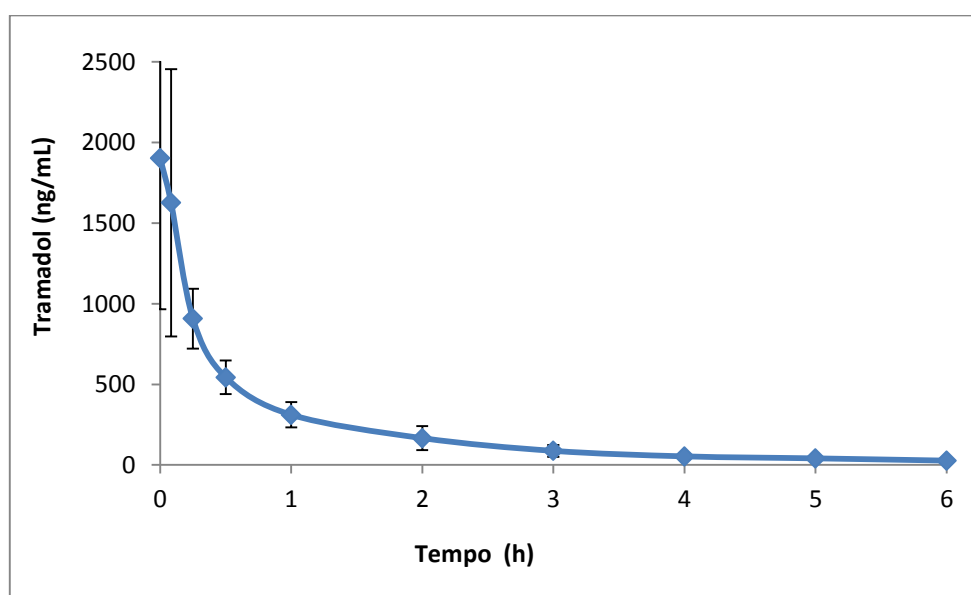
Os resultados obtidos demonstram que o método cromatográfico desenvolvido apresenta um bom limite de detecção para o tramadol, tendo-se atingido uma boa linearidade. Estes resultados permitiram concluir que o método estava apto para ser aplicado para análise das amostras de soro dos cães do experimento.

### 4.3 AVALIAÇÃO FARMACOCINÉTICA DO TRAMADOL

O tramadol foi avaliado quanto a sua farmacocinética utilizando-se uma administração oral em uma dose única de 100 mg, na apresentação de liberação prolongada. Primeiramente foram realizadas as análises por LC-MS de todas as amostras dos 20 cães Collies do experimento. Posteriormente, foi administrado tramadol na dose de 3 mg/kg, IV, em 4 cães e feita a análise farmacocinética utilizando a mesma metodologia. O grupo IV foi realizado para o cálculo de biodisponibilidade do grupo oral. Os dados analíticos da farmacocinética IV serão apresentados primeiramente para possibilitar as análises do grupo oral.

#### 4.3.1 Farmacocinética do tramadol após administração intravenosa

O perfil sérico do tramadol após administração intravenosa na dose de 3 mg/kg é apresentado na Figura 19. As concentrações plasmáticas médias encontram-se no Anexo C.



**Figura 19.** Perfil da concentração plasmática média ( $\pm$  DP) do tramadol após administração intravenosa de 3 mg/kg em 4 cães Collie.

A Tabela 11 demonstra os parâmetros farmacocinéticos médios obtidos por abordagem não compartimental para administração IV.

**Tabela 11-** Parâmetros farmacocinéticos médios de 4 cães Collies após administração de uma dose de 3 mg/kg de tramadol IV.

<b>Parâmetros Farmacocinéticos</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>
$\lambda$ (h <sup>-1</sup> )	0,40	0,13
$t_{1/2}$ (h)	1,89	0,67
ASC <sub>0-∞</sub> (ng*h/mL)	1141,82	314,86
Cl (L/h/kg)	2,78	0,73
MRT <sub>iv</sub> (h)	1,99	0,82
Vd (L/kg)	5,46	2,29

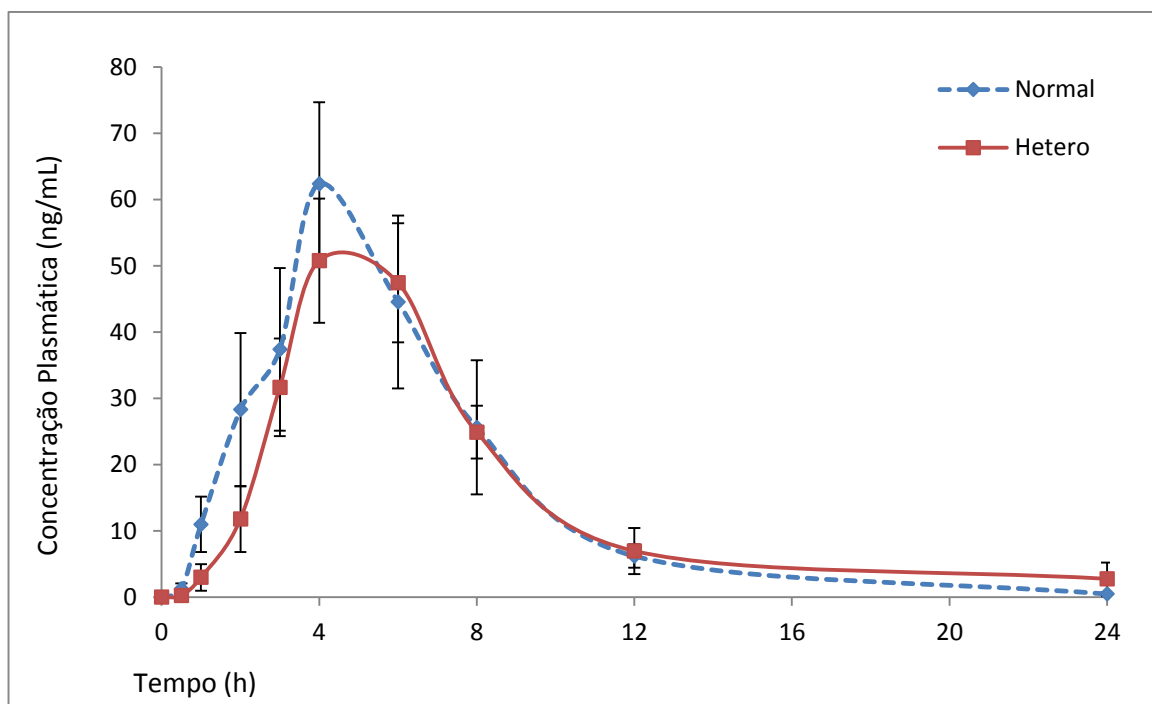
DP= desvio padrão

#### 4.3.2 Farmacocinética do tramadol após administração oral de comprimidos de liberação prolongada

Os cães foram divididos em dois grupos, cães normais (MDR1+/+) e heterozigotos (MDR1+/-), conforme o genótipo para o MDR1. Dos vinte cães do estudo, seis não possuíam mutação para o MDR1 (MDR1+/+) e 14 eram heterozigotos para a mutação (MDR1+/-). Nenhum dos cães do experimento apresentou dois alelos mutantes.

Dos vinte cães do estudo, três apresentaram concentrações plasmáticas de tramadol muito baixas (< 6 ng/kg), sendo detectadas apenas no t<sub>máx</sub>, estes cães não foram analisados estatisticamente com o grupo. Foram analisados estatisticamente 6 cães do grupo normal e 11 do grupo heterozigoto.

A concentração plasmática máxima (C<sub>máx</sub>) (média ±DP) foi de 63,12 ± 33,35 ng/mL para o grupo normal e 58,00 ± 27,29 ng/mL para o grupo heterozigoto. Não houve diferença estatística entre os grupos. Os valores de concentração plasmática médios de tramadol dos dois grupos ao longo dos 10 tempos de observação estão representados na Figura 20 e listados no Anexo D.



**Figura 20.** Média  $\pm$  DP das concentrações plasmáticas de tramadol em 6 cães da raça Collie sem a mutação MDR1 nt230 (del4) e 11 cães heterozigotos, após administração de  $4,16 \text{ mg/kg} \pm 0,67 \text{ mg/kg}$  (média  $\pm$  DP) de tramadol oral de liberação prolongada (SR).

Os dados do perfil farmacocinético são demonstrados na Tabela 11, utilizando média e desvio padrão. O tempo de concentração máxima ( $T_{\text{máx}}$ ) (média  $\pm$  DP) foi de  $4 \pm 1,2 \text{ h}$  e  $4,7 \pm 1 \text{ h}$  para os normais e heterozigotos respectivamente.

Na análise não compartimental do perfil farmacocinético do tramadol, obteve-se dados de constante de velocidade de eliminação ( $\lambda$ ), tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ), e  $ASC_{0-\infty}$  para os dois grupos (Tabela 12). Não houve diferença estatística significativa entre os grupos.

A biodisponibilidade média do tramadol foi de 21,94% para o grupo normal e 23,31% para o grupo heterozigoto. O tempo de meia vida de eliminação ( $t_{1/2}$ ) (média  $\pm$  DP) foi de  $2,85 \pm 1,61 \text{ h}$  para os normais e  $2,81 \pm 1,46 \text{ h}$  para os heterozigotos. Não havendo diferença estatística significativa entre os grupos.

**Tabela 12-** Parâmetros farmacocinéticos para 6 cães Collies sem a mutação e 11 Collies heterozigotos para a mutação MDR1 nt230 (del 4) após uma dose de  $4,16 \pm 0,67$  mg/kg (média  $\pm$  DP) de cloridrato de tramadol de liberação prolongada administrado por via oral.

Parâmetros Farmacocinéticos	Grupo Normal (MDR1 +/-)		Grupo Heterozigoto (MDR1 +/-)	
	Média	DP	Média	DP
$C_{m\acute{a}x}$ (ng/mL)	<b>63,12</b>	33,35	<b>58,00</b>	27,29
$t_{m\acute{a}x}$ (h)	<b>4</b>	1,26	<b>4,72</b>	1
$\lambda$ ( $h^{-1}$ )	<b>0,31</b>	0,10	<b>0,30</b>	0,12
$t_{1/2}$ (h)	<b>2,68</b>	1,61	<b>2,81</b>	1,46
ASC <sub>0-∞</sub> (ng.h/mL)	<b>362,08</b>	191,54	<b>325,14</b>	158,24
Cl (L/h)	<b>86,33</b>	61,33	<b>100,33</b>	87,34
MRT <sub>ns</sub> (h)	<b>6,36</b>	2,18	<b>6,78</b>	1,77
F (%)	<b>21,94</b>		<b>23,31</b>	

DP= desvio padrão



## 5 DISCUSSÃO

As etapas de desenvolvimento e validação de um método analítico para a quantificação de tramadol em amostras plasmáticas de cães são desafios. É necessária especificidade na análise a partir de soro, uma matriz extremamente diversificada, além de sensibilidade com baixos limites de quantificação para poder mensurar quantidades ínfimas do fármaco no sangue. Diversos artigos descrevem métodos para a quantificação de tramadol em fluidos biológicos. Alguns métodos utilizam a cromatografia gasosa para a separação do tramadol no plasma (McMILLAN et al., 2008). Porém o método de separação mais amplamente utilizado é a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Vários tipos de detectores podem ser acoplados no HPLC para análise do tramadol. Estudos com detectores UV utilizam uma faixa de absorvância entre 200- 400 nm para a detecção do tramadol (GAN et al., 2002; KÜÇÜK et al., 2005; KÜÇÜK e KADIOGLU, 2005; SOUSA et al., 2008). Alguns autores utilizam CLAE com detecção por fluorescência, com ondas de excitação e emissão de 200nm e 301nm, respectivamente (ROUINI et al., 2006; VETTORATO et al., 2010), 202nm de excitação e 296nm de emissão (KUKANICH e PAPICH, 2004), ou ainda 275 nm e 308nm de excitação e emissão (KANAAM et al., 2009). Entretanto, neste trabalho optou-se pela detecção com espectrofotômetro de massas, por apresentar melhor seletividade e sensibilidade para o tramadol. Estudos utilizando espectrofotômetro de massas apresentaram um limite de detecção menor que os demais métodos, sendo mais sensível que os demais (SACCOMANNI et al., 2010; SHILO et al., 2007; VLASE et al., 2008). Os métodos de detecção do tramadol utilizados foram embasados em trabalho publicado por Patel et al. (2009), onde os pesquisadores conseguiram uma ótima sensibilidade para o método comparado estudos prévios. Da mesma maneira, os resultados obtidos no presente estudo para a quantificação do tramadol por espectrometria de massas foram precisos, exatos e lineares, com um bom limite inferior de quantificação do fármaco, sendo este de 1 ng/mL. O acoplamento de um detector de massas a um sistema de separação cromatográfica como o HPLC permitiu a resolução dos problemas de identificação e quantificação do tramadol.

As análises cromatográficas dos soros caninos foram desenvolvidas para a identificação e quantificação do tramadol, não sendo analisado nenhum metabólito. O mecanismo de ação analgésica do tramadol na espécie humana, assim como várias outras espécies animais têm sido relacionadas à ação tanto do tramadol, e de seu metabólito ativo M1, sendo dependente das concentrações plasmáticas de ambos componentes. Contudo, as concentrações plasmáticas do

M1 são descritas como sendo menos de 25% da concentração da droga mãe, sendo a ação analgésica primária é relacionada à presença do próprio tramadol (MALONNE et al., 2003; PAYNE et al., 2002). Estudos em cães demonstraram que o efeito nociceptivo da administração de tramadol independe das concentrações plasmáticas de M1, sugerindo que o próprio tramadol seja responsável pelo efeito analgésico em cães (GIORGI et al., 2009c; KUKANICH e PAPICH, 2011).

O presente estudo avaliou a farmacocinética do tramadol oral, na apresentação de comprimidos de liberação prolongada (SR) em 20 cães Collie saudáveis. O tramadol SR, em uma dose média de 4,16 mg/kg, foi bem tolerado pelos cães. O único efeito adverso observado foi uma leve sedação na maioria dos animais do estudo após duas a seis horas da administração do fármaco, coincidindo com as concentrações máximas plasmáticas de tramadol encontradas nas análises cromatográficas. O tramadol é um fármaco amplamente utilizado em cães, assim como na espécie humana. Vários estudos realizados em cães demonstram que o tramadol desencadeia mínimos efeitos colaterais, administrado tanto pela via oral quanto injetável (GIORGI et al., 2009a; KUKANICH e PAPICH, 2004; McMILLAN et al., 2008). Até mesmo estudos utilizando doses elevadas da medicação pela via oral, 9,9 mg/kg, indicaram ausência de efeitos colaterais comuns de outros opioides em doses elevadas, tais como náusea, vômitos, depressão cardiorrespiratória, sedação intensa ou agitação (KUKANICH e PAPICH, 2011). O efeito colateral de sedação leve é esperado, estudos utilizando tramadol injetável (IV e IM) demonstraram que o grau de sedação é dose dependente e que decaem rapidamente após duas horas da administração parenteral, não sendo mais observada após quatro horas da administração (McMILLAN et al., 2008).

A prevenção e tratamento da dor são valiosas ferramentas extremamente necessárias para a manutenção da integridade física e psicológica dos pacientes. A dor compromete diversas funções e pode levar a incapacidade ou óbito do paciente (ROWLINGSON e MURPHY, 2000). O emprego de técnicas analgésicas diminui o estresse e conseqüentemente as respostas neuroendócrinas em pacientes com dor aguda, prevenindo o fenômeno de neuroplasticidade, responsável pela dor crônica e intensa (LIVINGSTON e CHAMBERS, 2000). O cloridrato de tramadol é um analgésico amplamente utilizado na medicina veterinária, sendo um dos mais prescritos. O número de prescrições de tramadol na alta do paciente após procedimento cirúrgico supera outros analgésicos, sendo a apresentação oral de escolha. O primeiro estudo farmacocinético do tramadol oral em cães foi realizado por Kukanich e Papich (2004), neste, a biodisponibilidade do fármaco foi semelhante ao encontrado em humanos, cerca de 70%, tendo

uma concentração plasmática máxima ( $C_{m\acute{a}x}$ ) média de 1040 ng/mL em uma dose administrada de cerca de 11 mg/kg. Giorgi et al. (2009a), administrando uma dose oral de 4 mg/kg, teve um  $C_{m\acute{a}x}$ . de 314,62 ng/mL, sendo concentração máxima plasmática proporcional a dose quando comparada ao estudo prévio. Apesar de a dose máxima ter sido proporcional nos dois estudos citados, a ASC calculada a partir das concentrações médias nos variados tempos, demonstrou uma biodisponibilidade de apenas 30% do cloridrato de tramadol em cápsulas de liberação imediata. Kukanich e Papich (2011) realizaram um novo estudo utilizando administração oral de tramadol de liberação imediata, na dose média de 9,9 mg/kg em 6 cães Greyhounds, sendo a detecção realizada com espectrofotômetro de massas (MS), o que permitiria uma detecção mais apurada e sensível. Neste estudo constatou-se um  $C_{m\acute{a}x}$  e ASC mais baixo, 215,7 ng/mL e 592 h.ng/mL, respectivamente, em comparação ao estudo anterior do mesmo grupo em Beagles, semelhante a valores publicados por Giorgi et al., 2009a.

Observou-se certa variabilidade individual da absorção do tramadol oral, após a administração de 100 mg de tramadol de liberação prolongada, três cães do estudo não tiveram absorção detectável de tramadol, e a variação de concentração plasmática máxima detectada dos demais indivíduos foi de 13,38 ng/mL a 118,19 ng/mL, com uma média de 56,59 ng/mL. Esses dados corroboram com as discussões publicadas por outros grupos de estudo, nos quais também se percebe uma ampla variação de absorção de tramadol oral entre os cães (GIORGI et al., 2009a; GIORGI et al., 2009b; KUKANICH e PAPICH, 2011). Essa variação de absorção oral também ocorre na espécie humana (PEDERSEN et al., 2006). Existe apenas um estudo piloto da administração oral de cloridrato de tramadol de liberação prolongada em cães realizado por Giorgi et al. (2009b). Este estudo foi realizado em 6 cães sem raça definida com peso corporal semelhante. O cloridrato de tramadol na apresentação de comprimidos de liberação prolongada foi detectado em apenas três cães do experimento, tendo uma baixa biodisponibilidade, cerca de 10%, após administração em cães. Em uma administração de cerca de 4 mg/kg, a  $C_{m\acute{a}x}$  média atingida foi de 40 ng/mL, tendo uma elevada variação entre os animais. A biodisponibilidade média no presente estudo foi de 22,4%, sendo superior ao experimento supracitado.

A taxa de absorção de um fármaco administrado em uma preparação sólida, como comprimido, depende de sua dissolução nos líquidos gastrintestinais (GI). Com isto desenvolveu-se preparações farmacêuticas de liberação controlada, ampliada, continuada e prolongada, que produzem absorção lenta e uniforme de um fármaco ao longo de 8 ou mais

horas. A principal vantagem é a diminuição da frequência de administração do fármaco, em comparação com as preparações de liberação imediata, além da diminuição da ocorrência ou intensidade de efeitos indesejados do fármaco (HOFFMAN, 1998). No Brasil, a apresentação do cloridrato de tramadol de liberação prolongada é na forma de comprimidos revestidos, diferenciando-se da apresentação de liberação imediata que é na forma de cápsulas. O cloridrato de tramadol de liberação prolongada é encontrado nas farmácias humanas na forma de comprimidos de 50 ou 100 mg. Os produtos comerciais encontrados são: Sensitram® 50 e 100mg, Sinedol ®100 mg, Tramadon® 100 mg e Tramal retard ® 100 mg (DEF, 2011/12).

O  $T_{máx}$  do tramadol IR em humanos é de cerca de 2 h, sendo o  $t_{1/2}$  de 6 h (LIKAR et al., 2006; MALONNE et al., 2003). Em cães, o tramadol oral tem uma absorção rápida, apresentando um  $T_{máx}$  na apresentação de liberação rápida (IR) entre 1h (KUKANICH e PAPICH, 2004) e 1,5h (GIORGI et al., 2009a). O tramadol de liberação prolongada em cães deste estudo evidenciou um  $T_{máx}$  de  $4,47 \pm 1,12$  h, sendo que no estudo de Giorgi et al.(2009b) utilizando a mesma apresentação do fármaco, teve um  $T_{máx}$  de 3 horas.

O  $t_{1/2}$  na espécie humana é de 6 h (LIKAR et al., 2006; MALONNE et al., 2003). Em cães, existem relatos de um  $t_{1/2}$  de 1,1h (KUKANICH e PAPICH, 2011) a 2,2h (GIORGI et al., 2009a). A eliminação mais rápida do tramadol em cães também foi observada neste estudo, sendo o tempo de meia vida de eliminação ( $t_{1/2}$ ) médio de 2,68 e 2,81h, para os cães sem e com a mutação no gene MDR1.

Os efeitos analgésicos do tramadol nas diversas apresentações têm se mostrado bastante satisfatórios para a espécie humana, sendo amplamente utilizado na analgesia pós-cirúrgica e também em pacientes oncológicos (DUTHIE, 1998; SUDHEER et al., 2007). O início da ação analgésica do tramadol oral de liberação imediata (IR) no homem ocorre dentro de 30 minutos; seus efeitos analgésicos duram de 4 a 6 horas. O início de ação do bioequivalente na formulação de liberação sustentada (SR) ocorre dentro de 5 horas, sendo a duração do efeito analgésico de 12 horas (LIKAR et al., 2006; MALONNE et al., 2003). Existem poucos estudos na ação analgésica do tramadol em cães. Estudo em cães com tramadol IV, na dose de 2 mg/kg, demonstrou resultados analgésicos satisfatórios no pós cirúrgico de OVH, sendo semelhante a analgesia realizada com morfina, na dose de 0,2 mg/kg (MASTROCINQUE e FANTONI, 2003). Vettorato et al. (2010) relataram uma analgesia efetiva durante as primeiras 8 horas de avaliação após cirurgia ortopédica de TPLO em cães, utilizando tramadol 2mg/kg IV, com baixos escores de dor nos animais avaliados.

Existe apenas um estudo do efeito antinociceptivo do tramadol oral em cães associados a um estudo farmacocinético. Kukanich e Papich (2011) demonstraram a partir de teste de von Frey modificado que o efeito analgésico do tramadol oral (IR) em uma dose média de 10 mg/kg, perdurou por até 6 horas. Nenhum estudo da ação nociceptiva foi realizado até o presente momento com o tramadol de liberação prolongada (SR) em cães. Devido ao fato dos cães eliminarem o tramadol mais rapidamente, comparado às demais espécies, estudos específicos do efeito analgésico do tramadol de liberação prolongada poderiam elucidar uma nova alternativa analgésica para a espécie, com uma menor frequência de administração do fármaco.

A Organização Mundial da Saúde indica a via oral como a via de administração preferida de medicamentos, devido à segurança, não invasividade, custo, praticidade e efetividade (REISFIND e WILSON, 2007). Porém, a administração oral pode conferir uma importante variação entre espécies diferentes e até entre indivíduos da mesma espécie, sendo importantes estudos espécie específicos das diferentes apresentações dos fármacos. Os veterinários têm tradicionalmente preferido utilizar a via de administração parenteral, vias intramuscular, intravenosa e subcutânea são usadas. Esta abordagem está mais associado com a garantia da dose e do tempo em comparação com a conveniência, mas potencialmente maior variabilidade, de administração oral, o que é geralmente preferido na medicina humana. Além disso, a administração oral de medicamentos em alimentos ou a água pode ser associada com taxas muito variáveis de absorção. No entanto, a administração oral de fármacos analgésicos tornou-se comum nas espécies animais de companhia, como cães, gatos e cavalos (LIVINGSTON, 2010). A variabilidade individual na absorção do tramadol não ocorre de maneira significativa quando a administração é pela via intramuscular (IM). O tramadol é rapidamente e quase completamente absorvido após administração IM, sendo sua biodisponibilidade sistêmica equivalente à administração IV, sendo a via IM uma boa alternativa à IV em cães (GIORGI et al., 2010).

A variabilidade individual na absorção de fármacos pode estar correlacionada à expressão intestinal da P-gp. A P-gp desempenha um importante papel na absorção, distribuição, metabolismo e excreção de fármacos substratos da mesma (MEALEY, 2004). A inibição farmacológica da função da P-gp testada em camundongos, homem e cães, demonstrou uma melhora da biodisponibilidade oral de fármacos substratos desta proteína (MEALEY, 2004; KUKANICH 2005). Pesquisas compararam a biodisponibilidade pela via oral de substratos da P-gp em camundongos *knockout* para o MDR1 (-/-). Os resultados demonstraram

uma maior absorção nos ratos com a mutação, dentre os fármacos testados estão alguns opioides, tais como morfina e metadona (SCHINKEL et al., 1997). Cães da raça Collie possuem sensibilidade à ivermectina, sendo contraindicado o uso desta medicação nesta raça. Foi demonstrado por Mealey et al. (2001) que a sensibilidade à ivermectina ocorre devido a uma mutação no gene MDR1, animais homozigotos (MDR1<sup>-/-</sup>) não expressam a P-gp e heterozigotos expressam em uma quantidade mais baixa que indivíduos normais. A sensibilidade dos cães Collie foi relatada para outros fármacos, tais como milbemicina, selamectina, moxidectina, lorapamida (MEALEY, 2004), vincristina (KRUGMAN et al., 2011), digoxina, mexiletina (HENIK et al., 2006).

Os dados do presente estudo indicam que não houve variação nos parâmetros farmacocinéticos do tramadol oral de liberação prolongada nos cães Collie heterozigotos para a mutação MDR1 nt230(del4), quando comparados aos Collies sem a mutação (*wild type*), sugerindo que o tramadol não seja substrato da P-gp. A C<sub>máx</sub> e AUC do grupo normal foi de 63,12 ng/mL e 340,15 ng.h/mL, respectivamente, comparado a 58,00 ng/mL e 315,11 ng.h/mL para os animais do grupo heterozigoto.

Um estudo clínico teve resultados contrários, Slanar et al. (2007) realizaram um estudo do tramadol administrado oral na apresentação de liberação prolongada em 21 pessoas com diferentes genótipos para a CYP2D6, sendo 7 metabolizadores rápidos (EM), 7 heterozigotos metabolizadores rápidos (EM) e 7 metabolizadores lentos (PM). Foi demonstrado que não houve variação dos parâmetros cinéticos do tramadol entre os grupos. Porém, observou-se uma variação no C<sub>máx</sub> e ASC<sub>0-24</sub> nos indivíduos do grupo de metabolizadores lentos (PM) que apresentavam homozigose para o polimorfismo para o gene MDR1 C3435T quando comparados a indivíduos heterozigotos e wild-type. A partir deste resultado os autores propuseram que o tramadol seria um substrato para a P-gp. Os resultados contrários deste estudo se devem provavelmente ao pequeno número de indivíduos com o polimorfismo (n=2), não sendo os dados representativos.

A utilização de um modelo *in vitro* com cultura celular Caco 2 é bastante útil para a determinação da permeabilidade dos fármacos através de membranas do trato gastrointestinal (TGI) para prever sua biodisponibilidade. As células Caco-2 são extraídas de adenocarcinoma de cólon humano. Durante sua cultura em filtros permeáveis e porosos, elas se diferenciam espontaneamente em enterócitos, formando uma membrana composta de células em monocamada aderidas por junções e apresentam como vantagem a rápida multiplicação celular

(SOUZA et al., 2007). Kanaan et al. (2009) realizaram um experimento investigando o envolvimento da P-gp no transporte transepitelial de tramadol e *O*-desmetiltramadol (M1) em cultura celular da linhagem Caco 2 (clones TC7). Os autores concluem neste estudo que o tramadol e seu metabólito ativo M1 não são substratos da P-gp, estando em concordância com os resultados do presente estudo. O modelo de cultura celular Caco 2 é recomendado pela FDA para identificação de substratos da P-gp. Neste estudo utilizaram os inibidores da P-gp ciclosporina A (não específico) e GF120918 (inibidor específico). Segundo estes pesquisadores, os resultados demonstraram um aumento do efluxo quando utilizado ambos os inibidores. Este efeito paradoxal dos inibidores da P-gp sugere o envolvimento de outras proteínas transportadoras de efluxo, tais como proteínas trocadoras de cátions orgânicos/H<sup>+</sup>. Porém, estudos específicos para as outras bombas de efluxo ainda não foram realizados para comprovar a hipótese do envolvimento destes transportadores na limitação da absorção gastrointestinal do tramadol.

## CONCLUSÕES

O método utilizado no presente estudo para a detecção e quantificação do tramadol em soro de cães por LC-MS é sensível e específico, com alta precisão e exatidão, com um ótimo limite de detecção e quantificação (1 ng/mL), tendo também a vantagem do reduzido tempo de análise.

A administração de dose única de 100mg de tramadol oral de liberação prolongada resulta em níveis séricos quantificáveis em concentrações analgésicas, sendo uma possível alternativa terapêutica na analgesia de cães. Estudos complementares farmacocinéticos combinados aos efeitos antinociceptivos são necessários para estabelecer um critério de dose e frequência de administração.

O tramadol oral de liberação prolongada não tem características farmacocinéticas para administração única diária, conforme preconizado para a espécie humana. Estudos farmacocinéticos e farmacodinâmicos são necessários para se estabelecer a dose e frequência de administração do tramadol SR em cães.

Não existe variação na absorção gastrointestinal ou na eliminação do tramadol administrado por via oral em cães portadores heterozigotos da mutação MDR1 nt230(del4), quando comparado a cães sem a mutação, sendo improvável que o tramadol seja substrato da P-gp. Levando em consideração características farmacocinéticas, não existiriam restrições de uso do tramadol em cães portadores da mutação MDR1 nt230 (del4) nas doses e via utilizadas no presente estudo.



---

---

## REFERÊNCIAS

- ANVISA. **Portaria n.º 344, de 12 de maio de 1998.** Disponível em <[http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/344\\_98.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/344_98.htm)> Acesso em 02 de janeiro de 2013.
- ALLER, S.G.; YU, J.; WARD, A.; WENG, Y.; CHITTABOINA, S.; ZHUO, R.; HARRELL, P.M.; TRINH, Y.T.; ZHANG, Q.; URBATSCH, I.L.; CHANG, G. Structure of P-Glycoprotein Reveals a Molecular Basis for Poly-Specific Drug Binding. *Science*, v.323, p.1718-1722, 2009.
- ALMEIDA, F.P.P.C.P. *Determinação de Tramadol e Amitriptilina em Saliva por LC-MS, Sua Aplicação em Amostras de Condutores no Âmbito de um Projecto de Investigação Europeu.* 2009. 192p. Dissertação de Candidatura ao Grau de Mestre em Medicina Legal e Ciências Forenses, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2009.
- BAARS, C. LEEB, T.; VON KLOPMANN, T.; TIPOLD, A.; POTSCHKA, H. Allele-specific polymerase chain reaction diagnostic test for the functional MDR1 polymorphism in dogs. *The Veterinary Journal*, v.177, p.394-397, 2008.
- BASBAUM, A.I.; FIELDS, H.L. Endogenous pain control systems: Brainstem Spinal Pathways and Endorphin Circuitry. *Annual Review Neuroscience*, v.7, p.309-338, 1984.
- BAUER, L.A. *Applied Clinical Pharmacokinetics.* 2ed. New York: McGraw Hill, 2008.
- BERRIDGE, V.; EDWARDS, G. *Opium and the people.* Allan Lane: London, 1981.
- BISSONNETTE, S.; PARADIS, M.; DANEAU, I.; SILVERSIDES, D.W. The ABCB1-1Δ mutation is not responsible for subchronic neurotoxicity seen in dogs of non-collie breeds following macrocyclic lactone treatment for generalized demodicosis. *Veterinary Dermatology*, v. 20, n. 1, p.60-66, 2009.
- BOUGOIN, S.; LOMET, D.; KERBOEUF, D.; LE VERNE, Y.; MALPAUX, B; THIERY, J.C. Evidence that the choroids plexus in female sheep express P-glycoprotein. *Neuro Endocrinology Letters*, v.29, n.4, p.438-442, 2008.
- BRASIL. **Resolução RDC n.899, de 29 de maio de 2003.** Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. (A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o regulamento técnico para medicamentos genéricos). <<http://www.interfarma.org.br/site2/images/Site%20Interfarma/Informacoesdosetor/RE/Registro/2003/RE%20899-03-guia%20validacao.pdf>> Acesso em 14 de abril de 2013.
- BRESOLIN, T. *Expressão dos genes Receptor Pregnano X (PXR), Citocromo P4503A (CYP3A) e Resistência a Multidrogas 1 (MDR1) em fígado de peixe-zebra (Danio rerio).* Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

- BRINKMANN, U.; EICHELBAUM, M. Polymorphisms in the ABC drug transporter gene *MDR1*. *The Pharmacogenomics Journal*, v.1, p. 59-64, 2001.
- CALLEN, D.F.; BAKER, D.F.; SIMMERS, R.N.; SESHADRI, R.; RONINSON, I.B. Localization of the human multiple drug resistance gene, *MDR1*, to 7q21.1. *Human Genetics*. v.77, p.142-144, 1987.
- CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis: viewpoint and discussion. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, v.689, n.3, p.269-272, 1997.
- CHEN, B.; FANG, J.; ZHANG, W.; JIN, Z.; YU, Z.; CAI, W. Detection of C1236T, G2677T/A, and C3435T Polymorphism of *MDR1* by Amplification Refractory Mutation System PCR. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, v.23, p.110-116, 2009.
- CHEN, L.; LI, Y.; YU, H.; ZHANG, L.; HOU, T. Computational models for predicting substrates or inhibitors of P-glycoprotein. *Drug Discovery Today*, v.17, n.7/8, 2012.
- CHEN C.J.; CHIN J.E.; UEDA K.; CLARK D.P.; PASTAN I.; GOTTESMAN, M.M.; RONINSON, I.B. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell*, v. 47, p. 381-389, 1986.
- CHOUVY, P.A. Opium: a Drug in Motion Through Time and Space. In: \_\_\_\_\_ *Opium- Uncovering the Politics of the Poppy*. Cambridge:Harvard University Press, p. 1-12, 2010.
- COLLART L, LUTHY C, DAYER P. Partial inhibition of tramadol antinociceptive effect by naloxone in man. *British Journal of Clinical Pharmacology*, v.35, p.73, 1993.
- COUTURE, L.; NASH, J.A.; TURGEON, J. The ATP-Binding Cassette Transporters and Their Implication in Drug Disposition: A Special Look at the Heart. *Pharmacological Reviews*. v.58, n.2, p.244-258, 2006.
- DAILY MED*, <<http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed /drugInfo.cfm?id=3788>, 2007> Acesso em 10 de dezembro de 2012.
- DANO, K. Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.323, p.466-483, 1973.
- DEAN, M.; HAMON, Y.; CHIMINI, G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Journal of Lipid Research*. v. 42, p. 1007-1017, 2001.
- DEF 2011/12 – *Dicionário de Especialidades Farmacêuticas*. EPUC – Editora de Publicações Científicas Ltda. Disponível em: <<http://www.def.com.br>> Acesso em: 03 jan. 2012.
- DIÁRIO NACIONAL* – DOU – ANVISA, <<http://www.radaroficial.com.br/d/163148>> Acesso em 10 de fevereiro de 2013.
- DIAS, F. E. F.; AOKI, S. M.; MESQUITA, L.G.; NUNES, C.M.; GARCIA, J. F. Detecção de *Leptospira pomona* em sêmen bovino por eletroforese capilar fluorescente. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, São Paulo, v. 43, n. 3, p. 394-399, 2006.

DOIGE, C. A.; AMES, G. F.L. ATP-Dependent Transport Systems in Bacteria and Humans: Relevance to Cystic Fibrosis and Multidrug Resistance. *Annual Review of Microbiology*, v.47, p.291-319, 1993.

**DRUG BANK**, <<http://www.drugbank.ca/drugs/DB00193>, 2012> Acesso em 5 de dezembro de 2012.

DUNN, I.S.; BLATTNER, F.R. Charon-36 to 40 multi enzyme, high-capacity, recombination deficient replacement vectors with polylinkers and polystuffers. *Nucleic Acids Research*, v. 15, p. 2677-2698, 1987.

DUTHIE, D.J.R. Remifentanil and Tramadol. *British Journal of Anesthesia*. v.81, p.51-57, 1998.

**ECDD**. Expert Committee on Drug Dependence. 34 th ECDD 2006/4.5.

EVANS, W.E.; JOHNSON, J.A. Pharmacogenomics: The inherited basis for interindividual differences in drug response. *Annual Review of Genomics Human Genetics*, v.2, p. 9-39, 2001.

**FARMACOPEIA BRASILEIRA**. 5.ed. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, v.2, 2010.

**FDA**. Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation. May 2001. Disponível em <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>> Acesso em 10 de outubro de 2012.

FECHT, S.; WÖHLKE, A.; HAMANN, H.; DISTL, O. Analysis of the Canine *mdr1-1Δ* Mutation in the Dog Breed Elo. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, v. 54, p.401–405, 2007.

FIELDS, H.L.; HEINRICHER, M.M.; MASON, P. Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits. *Annual Review of Neuroscience*, v. 14, p.219-245, 1991.

FLOR, P.B.; YAZBEK, K.V.B.; IDA, K.K.I.; FANTONI, D.T. Tramadol plus metamizole combined or not with anti-inflammatory drugs is clinically effective for moderate to severe chronic pain treatment in cancer patients. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, 2013. doi:10.1111/vaa.12023

FOJO, A.T., UEDA, K.; SLAMON, D.J.; POPLACK, D.G.; GOTTESMAN, M. M.; PASTAN, I. Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues(cancer chemotherapy/doxorubicin/vinblastine) *Proceeding of the National Academy of Science of United States of America*, v. 84, p. 265-269, 1987.

FROMM, M.F. Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers. *TRENDS in Pharmacological Sciences*. v.25, n.8, p.423-429, 2004.

GAN, S.H.; ISMAIL, R.; WAN ADNAN, W.A; WAN, Z. Method development and validation of a high-performance liquid chromatographic method for tramadol in human plasma using liquid–liquid extraction. *Journal of Chromatography B*, v.772, p.123-129, 2002.

GEBHART, G.F. Descending modulation of pain. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v.27, p.729-737, 2004.

**GENBANK**, National Center for Biotechnology Information – NCBI, <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>> Acesso em 20 de outubro de 2012.

GERGOV, M. et al. Simultaneous screening and quantification of 25 opioid drugs in post-mortem blood and urine by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Forensic Science International*, v.186, p. 36-43, 2009.

GEYER, J.; DORING, B.; GODOY, J.R.; LEIDOLF, R.; MORITZ, A.; PETZINGER, E. Frequency of the nt230 (del4) MDR1 mutation in Collies and related dog breeds in Germany. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, v. 28, 545–551, 2005a.

GEYER, J.; DÖRING, B.; GODOY, J.R.; MORITZ, A.; PETZINGER, E. Development of a PCR-based diagnostic test detecting a nt230(del4) MDR1 mutation in dogs: verification in a moxidectin-sensitive Australian Shepherd. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, v.28, p.95–99, 2005b:

GIBALDI, M.; PERRIER, D. *Pharmacokinetics*. 2 ed. New York: Informa Helthcare, 2007.

GIORGI, M. ; DEL CARLO, S.; SACCOMANNI, G.; LEBKOWSKA-WIERUSZEWSKA, B.; KOWALSKI, C.J. Pharmacokinetic and urine profile of tramadol and its major metabolites following oral immediate release capsules administration in dogs. *Veterinary Research Communications*, v.33, p.875-885, 2009a.

GIORGI, M.; SACCOMANNI, G.; LEBKOWSKA-WIERUSZEWSKA, L.; KOWALSKI, C. Pharmacocinetic evaluation of tramadol and its major metabolites after single oral sustained tablet administration in the dog: a pilot study. *The Veterinary Journal*. v. 180, p.253-255, 2009b.

GIORGI, M.; DEL CARLO, S.; SACCOMANNI, G.; LEBKOWSKA-WIERUSZEWSKA, B.; TURINI, V.; KOWALSKI, C.J. Biopharmaceutical profile of tramadol in the dog. *Veterinary Research Communications*, v.33, (suppl 1), p.189-192, 2009c.

GIORGI, M.; DEL-CARLO, S.; LEBKOWSKA-WIERUSZEWSKA, B.; KOWALSKI, C.J.; SACCOMANNI, G. Pharmacokinetics of tramadol and metabolites after injective administrations in dogs. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, v. 13, n.4, p.639-644, 2010.

GONZALEZ, T.P. *Polimorfismos Moleculares do Gene MDR1/ABCB1 em Pacientes com Lupus Eritematoso Sistêmico*. Dissertação (Mestrado). Programa de pós-graduação em genética e biologia molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2006.

GOTTESMAN, M.M.; PASTAN, I. Resistance to multiple chemotherapeutic agents in human cancer cells. *TIPS*. v.91, p. 54-58, 1988.

GRAMER, I.; LEIDOLF R.; DÖRING, B., KLINTZSCH, S.; KRÄMER, E.M.; YALCIN, E.; PETZINGER E.; GEYER, J. Breed distribution of the nt230(del4) MDR1 mutation in dogs. *The Veterinary Journal* (2010), doi:10.1016/j.tvjl.2010.06.012

GROS, F.; CROOP, J.; HOUSMANT, D. Mammalian multidrug resistance gene: complete cDNA sequence indicates strong homology to bacterial transport proteins. *Cell*, v. 47, p. 371-380, 1986.

**GRÜNENTHAL**. Company Core Product Profile – Tramadol. March, 2008. <www.grunenthal.com> Acesso em 20 de dezembro de 2012.

GUEDES, A.G.P.; NATALINI, C.C.; ALVES, S.D.L; OLIVEIRA, S.T. Tramadol via epidural em cães submetidos à substituição do ligamento cruzado cranial. *Ciência Rural*, v.32, n.2, p.345-46, 2002.

GUIMARÃES, L.S.P; HIRATAKA, V.N. Uso do Modelo de Equações de Estimativas Generalizadas na análise de dados longitudinais. *Revista HCPA*. v. 32, n.4, p.503-511, 2012.

GUPTA, S.; GOLLAPUDI, S. P-Glycoprotein (*MDR 1* Gene Product) in cells of the immune system: its possible physiologic role and alteration in aging and human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) infection. *Journal of Clinical Immunology*. v. 13, n. 5, p.289-301, 1993.

GUTMANN, D.A.P. et al. Understanding polyspecificity of multidrug ABC transporters: closing in on the gaps in ABCB1. *Trends in Biochemical Sciences*. v.35, n.1, p.36-42, 2009.

HANSEN, B.D. Assessment of Pain in Dogs: Veterinary Clinical Studies. *ILAR Journal*. v.44, n.3, p.197-205, 2003.

HARITOVA, A.M. ABC Transporters in the Eyes of Dogs and Implications in Drug Therapy. *Current Eye Research*, v.38, n.2, p.271-277, 2013.

HENIK, R.A.; KELLUM, H.B.; BENTJEN, S.A.; MEALEY, K.L. Digoxin and mexiletine sensitivity in a Collie with the MDR1 mutation. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.20, n.2, p.415-417, 2006.

HOFFMAN, A. Pharmacodynamic aspects of sustained release preparations. *Advanced Drug Delivery Reviews*. v.33, p.185-199, 1998.

HOPPER, K.; ALDRICH, J.; HASKINS, S.C. Ivermectin toxicity in 17 collies. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. v.16, p.89-94, 2002.

HOWLETT, T.A.; REES, L.H. Endogenous opioid peptides and hypothalamo pituitary function. *Annual Review of Physiology*, v.48, p.527-536, 1986.

HUGNET, C.; BENTJEN, S. A.; MEALEY K. L., 2004. Frequency of the mutant MDR1 allele associated with multidrug sensitivity in a sample of collies from France. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, v.27, n.4, p. 227–229, 2004.

HUNTER, J.; HIRST, B. H. Intestinal secretion of drugs- The role of P-glycoprotein and related drug efflux systems in limiting oral drug absorption. *Advanced Drug Delivery Reviews*. v. 25, p. 129-57, 1997.

IEIRI, I.; TAKANE, H.; OTSUBO, K. The MDR1 (ABCB1) Gene Polymorphism and its Clinical Implications. *Clinical Pharmacokinetics*. v. 43, n.9, p.553- p.576, 2004.

JARDIM, I.C.S.F.; COLLINS, C.H.; GUIMARÃES, L.F.L. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. In: COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. *Fundamentos de Cromatografia*. Campinas: Editora Unicamp, p.273-398, 2006.

JOHNSON, J.R.; KUSKOWSKI, M. A.; GAJEWSKI, A.; SAHM, D.F.; KARLOWSKY, J.A. Virulence Characteristics and Phylogenetic Background of Multidrug-Resistant and Antimicrobial-Susceptible Clinical Isolates of *Escherichia coli* from across the United States, 2000–2001. *The Journal of Infection Diseases*. v.190, p. 1739-1744, 2004.

JULIANO, R.L.; LING, V. A Surface Glycoprotein Modulating Drug in Chinese Hamster Ovary Cell Mutants Permeability. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.455, p.152-162, 1976.

KANAAN, M.; DAALI, Y.; DAYER, P.; DESMEULES, J. Uptake/Efflux Transport of Tramadol Enantiomers and *O*-Desmethyl-Tramadol: Focus on *P*-Glycoprotein. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, v.105, p.199-206, 2009.

KAWABATA, A.; MOMOI, Y.; INOUE-MURAYAMA, M.; IWASAKI, T. Canine *mdr1* gene mutation in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, v.67, n.11, p.1103-1107, 2005.

KRUGMAN, L.; BRYAN, J.N.; MEALEY, K.L.; CHEN, A. Vincristine-induced central neurotoxicity in a collie homozygous for the ABCB1  $\Delta$  mutation. *Journal of Small Animal Practice*, v.53, n.3, p.185-187, 2011.

KÜÇÜK, A.; KADIOGLU, Y. Determination of tramadol hydrochloride in ampoule dosage forms by using UV spectrophotometric and HPLC-DAD methods in methanol and water media. *Il Farmaco*. v 60, p.163-169, 2005.

KÜÇÜK, A.; KADIOGLU, A.; ÇELEBI, F. Investigation of the pharmacokinetics and determination of tramadol in rabbit plasma by a high-performance liquid chromatography–diode array detector method using liquid–liquid extraction. *Journal of Chromatography B*, v.816, p. 203–208, 2005.

KUDZI,W.; DODOO, A.; MILLS, J.J. Genetic polymorphisms in MDR1, CYP3A4 and CYP3A5 genes in a Ghanaian population: a plausible explanation for altered metabolism of ivermectin in humans? *BMC Medical Genetics*. 2010. doi:10.1186/1471-2350-11-111

KUKANICH, B.; LASCELLES, B.D.X.; AMAN, A. M.; MEALEY, K. L.; PAPICH M. G. The effects of inhibiting cytochrome P450 3A, P-glycoprotein, and gastric acid secretion on their oral bioavailability of methadone in dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, v.28, p.461-466, 2005.

KUKANICH B.; PAPICH, M.G. Pharmacokinetics of Tramadol and the Metabolite *O*-desmethyltramadol in Dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, v.27, p.239–246, 2004.

KUKANICH B.; PAPICH, M.G. Pharmacokinetics and antinociceptive effects of oral tramadol hydrochloride administration in Greyhounds. *American Journal of Veterinary Research*, v. 72, n. 2, p.256 – 262, 2011.



- LaCROIX-FRALISH, M.L.; MOGIL, J.S. Progress in Genetic Studies of Pain and Analgesia. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v. 49, p.97-121, 2009.
- LEPPERT, W. Tramadol as an analgesic for mild to moderate cancer pain. *Pharmacological Reports*, v.61, p. 978-992, 2009.
- LIKAR, R.; WITTELS, M.; MOLNAR, M.; KAGER, I.; ZIERVOGEL, G.; SITTL, R. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Properties of Tramadol IR and SR in Elderly Patients: A Prospective, Age-Group-Controlled Study. *Clinical Therapeutics*, v.28, n.12, p. 2022-2039, 2006
- LINARDI, R.L.; NATALINI, C.C. Influência do gene de resistência múltipla (MDR1) e da P-glicoproteína na farmacocinética e farmacodinâmica de drogas terapêuticas. *Ciência Rural*, v.36, n.1, p.336-41, 2006.
- LINTZ W et al. Biotransformation of tramadol in man and animal. *Arzneimittel-Forschun*, v.31, p.1932–1943, 1981.
- LIVINGSTON, A.; CHAMBERS, P. The Physiology of Pain. In: FLECKNELL, P.A.; WATTERMAN-PEARSON, A. *Pain Management in Animals*, London: W.B.Saunders, p. 9-20, 2000.
- LIVINGSTON, A. Pain and Analgesia in Domestic Animals. In: CUNNINGHAM et al. *Comparative and Veterinary Pharmacology, Handbook of Experimental Pharmacology*. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010. doi: 10.1007/978-3-642-10324-7\_7.
- LU, A.Y.H.; MA, Q. Pharmacogenomics and individualized medicine. In: ZHANG, D.; SURAPANENI, S. *ADME – Enabling Technologies in Drug Design and Development*. New Jersey: John Wiley & Sons, p.95-107, 2012.
- MALANA, M.A.; ZOHRA, R. The release behavior and kinetic evaluation of tramadol HCl from chemically cross linked Ter polymeric hydrogels. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.21, n.10, p. 2013.
- MALONNE, H.; SONET, B.; STREEL, B.; LEBRUN, S.; DE NIET, S.; SERENO, A.; VANDERBIST, F. Pharmacokinetic evaluation of a new oral sustained release dosage form of tramadol. *British Journal of Clinical Pharmacology*. v.57, n.3, p.270-278, 2003.
- MARTIN, W.R. Pharmacology of opioids. *Pharmacological Reviews*. v.35, n.4, p. 285-323, 1984.
- MARTINS, R.T. ALMEIDA, D.B.; MONTEIRO, F.M.R.; KOWACS, P.A.; RAMINA,R. Receptores opioides até o contexto atual. *Revista Dor*, v. 13, n.1, p.75-79, 2012.
- MASTROCINQUE, S.; FANTONI, D.T. A comparison of preoperative tramadol and morphine for the control of early postoperative pain in canine ovariohysterectomy. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, v.30, p.220-228, 2003.

- MATHEWS, K.A. Pain assessment and general approach to management. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. v.30, n.4, p.729-755, 2000.
- McMILLAN, C.J.; LIVINGSTON, A.; CLARK, C.R.; DOWLING, P.M.; TAYLOR, S.M.; DUKE, T.; TERLINDEN, R. Pharmacokinetics of intravenous tramadol in dogs. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, v.72, p.325-331, 2008
- MEALEY, K.L.; BENTJEN, S.A.; GAY, J.M.; CANTOR, G.H. Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the *mdr1* gene. *Pharmacogenetics*. v.11, n.8, p.727-733, 2001.
- MEALEY, K. L.; NORTHRUP, N.C.; BENTJEN, S.A.: Increased toxicity of P-glycoprotein-substrate chemotherapeutic agents in a dog with the MDR1 deletion mutation associated with ivermectin sensitivity. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.223, p.1453–1455, 2003
- MEALEY, K.L. Therapeutic Implications of the MDR-1 Gene. *Journal of Veterinary Pharmacology & Therapeutics*, v.27, p.257-264, 2004.
- MEALEY, K. L.; GAY, J. M; MARTIN, L. G.; WAITING, D.K. Comparison of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in MDR1-1D and MDR1 wildtype dogs. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, v.17, p.61–66, 2007.
- METZGER, I.F.; SOUZA-COSTA, D.C.; TANUS-SANTOS, J.E. Farmacogenética: princípios, aplicações e perspectivas. *Medicina, Ribeirão Preto*, v.39, n.4, p.515-521, 2006.
- MOLLEREAU, C; MOULEDOUS, L. Tissue distribution of the opioid receptor-like (ORL1) receptor. *Peptides*, v.21, n.7, p.907-917, 2000.
- MORONI, A.C. et al. Efeitos da ciclosporina a sobre a função renal de cães da raça Golden Retriever normais ou afetados pela distrofia muscular. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 45, n. 5, p. 371-78, 2008.
- NEFF, M.W.; ROBERTSON, K.R.; WONG, A.K.; SAFRA, N. ; BROMAN, K.W.; SLATKIN, M.; MEALEY, K.L.; PEDERSEN, N.C. Breed distribution and history of canine *mdr1-1Δ*, a pharmacogenetic mutation that marks the emergence of breeds from the collie lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 101, n. 32, p.11725-11730, 2004.
- PATEL, B. N.; SHARMA, N.; SANYAL, M.; SHRIVASTAV, P.S. An accurate, rapid and sensitive determination of tramadol and its active metabolite *O*-desmethyltramadol in human plasma by LC–MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.49, p.354-366, 2009.
- PAUL, A. J.; TRANQUILLI, W.J.; SEWARD, R.L. Clinical observations in Collies given ivermectin orally. *American Journal of Veterinary Research*, v.48, p.684-685, 1987.
- PAYNE, K. A.; ROELOFSE, J. A.; SHIPTON, E. A. Pharmacokinetics of Oral Tramadol Drops for Postoperative Pain Relief in Children Aged 4 to 7 Years- A Pilot Study. *Anesthesia Progress*, v.49, p.109-112, 2002.



PEDERSEN, R.S.; DAMKIER, P.; BROSEN, K et al. Enantioselective pharmacokinetics of tramadol in CYP2D6 extensive and poor metabolizers. *European Journal of Clinical Pharmacology*, v.62, p.513-521, 2006.

POULIOT, J.F.; L'HEUREUX, F.; LIU, Z.; PRICHARD, R.K.; GEORGES, E. Reversal of P-Glycoprotein-Associated Multidrug Resistance by Ivermectin. *Biochemical Pharmacology*, v. 53, p. 17-25, 1997.

PRESTON, J.M. Adverse reactions to unapproved applications. *Veterinary Record*, v.112, n.12, p.286, 1983.

PROSDOCIMI, F. *Racionalizando a utilização do algoritmo PHRED para a análise de 111 sequências de DNA. 2006*. Tese (Doutorado em Bioinformática), Programa de Pós-Graduação em Bioinformática, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2006.

PULLIAM, J.D.; SEWARD, R.L.; HENRY, R. T.; STEINBERG, S.A. Investigating ivermectin toxicity in Collies. *Veterinary Medicine*, v.80, p. 36-40, 1985:

QUETGLAS, E.G., et al. Pharmacokinetics of tramadol enantiomers and their respective phase I metabolites in relation to CYP2D6 phenotype. *Pharmacological Research*, v.55, p.122-30, 2007.

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 Analgesic. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v.260, n.1, p. 275-285, 1992.

RAFFA, R.B.; FRIDERICHS, E.; REIMANN, W., SHANK, R. P., CODD, E. E.; VAUGHT; JACOBY, H.; SELVE, N. Complementary and Synergistic Antinociceptive Interaction between the Enantiomers of Tramadol. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v.267, n.1, p. 331-340, 1993.

REGATEIRO, F. *Manual de Genética Médica*. Coimbra: Imprensa da Universidade de Coimbra, 2003.

REISFIELD, G.M.; WILSON, G.R. Rational use of sublingual opioids in palliative medicine. *Journal of Palliative Medicine*, v.10, n.2, p.465-474, 2007.

ROBEY, R.W.; ZHAN, Z.; PIEKARZ, R.L., KAYASTHA, G.L.; FOJO, T.; BATES, S.E. Increased MDR1 expression in normal and malignant peripheral blood mononuclear cells obtained from patients receiving depsipeptide (FR901228, FK228, NSC630176). *Clinical Cancer Research*, v.12, n.5, p. 1547-1555, 2006.

RONINSON, I.B.; CHIN, J.E.; CHOI, K.; GROS, P.; HOUSMAN, D.E.; FOJO A., SHEN, D.W.; GOTTESMAN, M.M; PASTAN, I. Isolation of human mdr DNA sequences amplified in multidrug-resistant KB carcinoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.83, p.4538-4542, 1986.

- ROUINI, M. R.; ARDAKANI, Y.H.; SOLTANI, F.; ABOUL-ENEIN, H.Y., FOROUMADI, A. Development and validation of a rapid HPLC method for simultaneous determination of tramadol, and its two main metabolites in human plasma. *Journal of Chromatography B*, v.830, p.207-211, 2006.
- ROULET, A.; PUEL, O.; GESTA, S.; LEPAGE, J.F.; DRAG, M; SOLL, M.; ALVINERIE, M.; PINEAU, T. MDR1-deficient genotype in Collie dogs hypersensitive to the P-glycoprotein substrate ivermectin. *European Journal of Pharmacology*. v.460, p.85-91, 2003.
- ROWLINGSON, J.C.; MURPHY, T.M. Chronic pain. In: MILLER, R.D. *Anesthesia*. 5 ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000. p.2351-79.
- SACCOMANNI, G.; DEL CARLO, S.; GIORGI, M.; MANERA, C.; SABA, A.; MACCHIA, M. Determination of tramadol and metabolites by HPLC-FL and HPLC-MS/MS in urine of dogs. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* v.53, p. 194-199, 2010.
- SAITO, T.; ZHANG Z.J.; TSUZUKI, H.; OHTSUBO, T.; YAMADA, T.; YAMAMOTO, T.; SAITO, H. Expression of P-glycoprotein in inner ear capillary endothelial cells of the guinea pig with special reference to blood-inner ear barrier. *Brain Research*, v.767, p. 388-392, 1997.
- SAMPAOLESI, M.; BLOT, S.; D'ANTONA, G.; GRANGER, N.; TONLORENZI, R.; INNOCENZI, A.; MOGNOL, P.; THIBAUD, J.L.; GALVEZ, B.G.; BARTHÉLÉMY, I.; PERANI, L.; MANTERO, S.; GUTTINGER, M.; PANSARASA, O.; RINALDI, C.; ANGELIS, M.G.C.; TORRENTE, Y.; BORDIGNON, C.; BOTTINELLI, R.; COSSU, G. Mesoangioblast stem cells ameliorate -Muscle function in dystrophic dogs. *Nature*, v.444, n.30, p.574-579, 2006.
- SAWYNOK, J. Topical and peripherally acting analgesics. *Pharmacology Reviews*, v.55, p.1-20, 2003.
- SCHINKEL, A.H. The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins. *Seminars in Cancer Biology*, v.8, p.161-170, 1997.
- SCHINKEL, A.H.; SMIT, J.J.; VAN TELLINGEN, O.; BEIJNEN, J.H.; WAGENAAR, E.; VAN DEEMTER, L.; MOL, C.A.; VAN DER VALK, M.A.; ROBANUS-MAANDAG, E.C.; RIELE, H.P. et al. Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell*, v.77, n. 4, p.491-502, 1994.
- SCHINKEL, A.H.; MAYER, U.; WAGENAAR, E.; MOL, C.A.A.M.; DEEMTER, L.V.; SMIT, J. J. M.; VAN DER VALK, M.A.; VOORDOUW, A.C.; SPITS, H.; TELLINGEN, O.V.; ZIJLMANS, J.M.J.M.; FIBBE, W.E.; BORST, P. Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking *mdr1*-type (drug-transporting) P-glycoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 94, p. 4028-4033, 1997.
- SCHUG, S.A. The role of tramadol in current treatment strategies for musculoskeletal pain. *Therapeutics and Clinical Risk Management*.v.3, n.5, p.717-723, 2007.
- SEWARD, R.L. Reactions in dogs given ivermectin. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 183, n. 5, p.493, 1983.

SHARGEL, L.; WU-PONG, S.; YU, A.B.C. *Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics*. 5 ed. New York: McGraw Hill Professional, 2005.

SHASTRY, B.S. Pharmacogenetics and the concept of individualized medicine. *The Pharmacogenomics Journal*. v.6, n.1, p.16-21, 2006.

SHILO, Y.; BRITZIM, M.; EYTAN, B.; LIFSHITZ, T.; SOBACK, S.; STEINMAN, A. Pharmacokinetics of tramadol in horses after intravenous, intramuscular and oral administration. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, v.31, p.60-65, 2007.

SIARHEYEVA, A.; LOPEZ, J.J.; GLAUBITZ, C. Localization of multidrug transporter substrates within model membranes. *Biochemistry*, v.45, p. 6203-6211, 2006.

SLANAŘ, O.; NOBILIS, M.; KVĚTINA, J.; MATOUŠKOVÁ, O.; IDLE, J.; PERLÍK, F. Pharmacokinetics of Tramadol is Affected by MDR1 Polymorphism C3435T. *European Journal of Clinical Pharmacology*, v.63, p.419-421, 2007.

SOUSA, A.B.; SANTOS, A.C.D.; FLORIO, J.C.; SPINOSA, H.S. Pharmacokinetics of tramadol administered by intravenous and intramuscular routes to female dogs submitted to ovariohysterectomy. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.45, n.3, p.239-247, 2008.

SOUZA, J.; FREITAS, Z.M.F.; STORPIRTIS, S. Modelos *in vitro* para determinação da absorção de fármacos e previsão da relação dissolução/absorção. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas – Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.43, n.4, out./dez., 2007.

SUDHEER, P.S.; LOGAN, S.W.; TERBLANCHE, C.; ATELEANU, B.; HALL, J.E. Comparison of the analgesic efficacy and respiratory effects of morphine, tramadol and codeine after craniotomy. *Anaesthesia*, v.62, p.555-560, 2007.

TAKAHARU, I.; NAOMICHI, T.; KODAI, K.; TOMOHITO, I.; JUN, T.; KENJIROU, M.; MOHAMMED, A. U.; HIROKI, I.; KAZUTO, Y. Cardiovascular effects of tramadol in dogs anesthetized with sevoflurane. *Journal of Veterinary Medicine and Sciences*, v.73, n.12, p.1603-1609, 2011.

TANABE, M.; IEIRI, I.; NAGATA, N.; INOUE, K.; ITO, S.; KANAMORI, Y.; TAKAHASHI, M.; KURATA, Y.; KIGAWA, J.; HIGUCHI, S.; TERAOKA, N.; OTSUBO, K. Expression of P-glycoprotein in Human Placenta: Relation to Genetic Polymorphism of the Multidrug Resistance (MDR)-1 Gene. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. v. 297, n.3, p. 1137-1143, 2001.

THIEBAUT, F.; TSURUO, T.; HAMADA, H.; GOTTESMAN, M.M.; PASTAN, I.; WILLINGHAM, M.C. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein. In normal human tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.84, p. 7735-7738, 1987.

TRANQUILLI, W. J.; PAUL, A.J.; SEWARD, R.L. Ivermectin plasma concentrations in Collies sensitive to ivermectin-induced toxicosis. *American Journal of Veterinary Research*, v. 50, p.769-770, 1989.

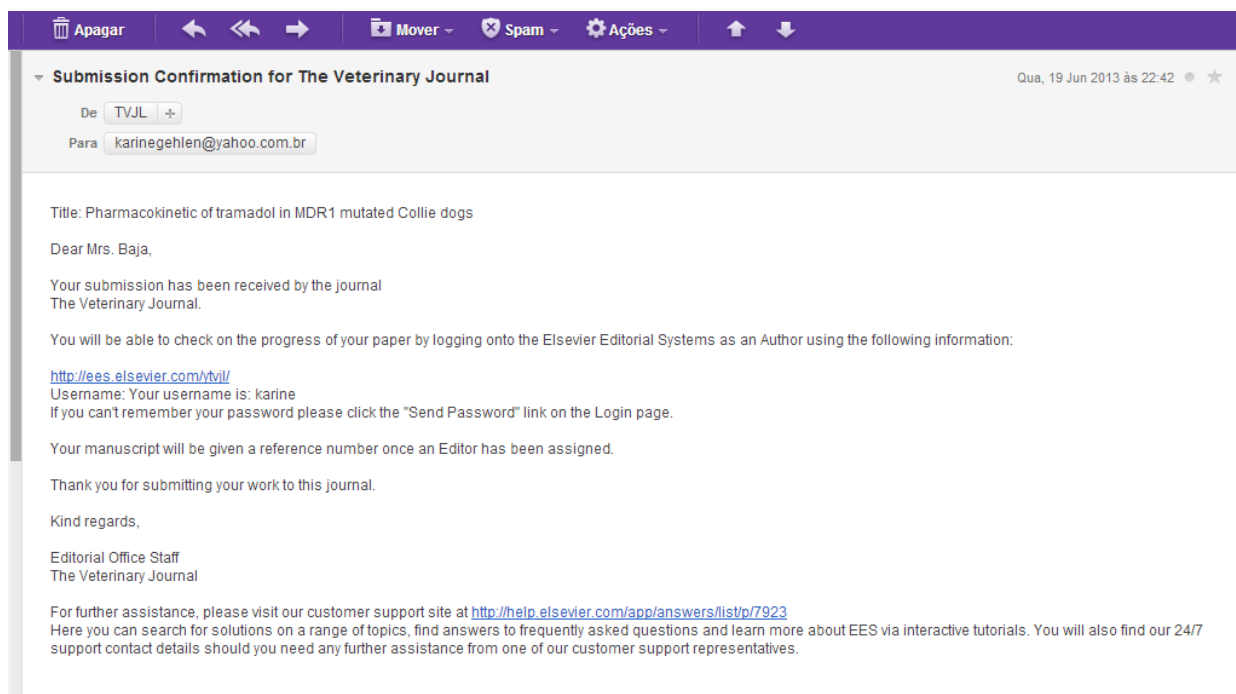
- TURRIZIANI, O.; GIANOTTI, N.; FALASCA, F.; BONI, A.; VESTRI, A.R.; ZOCCOLI, A.; LAZZARIN, A.; ANTONELLI, G. Expression levels of MDR1, MRP1, MRP4, and MRP5 in peripheral blood mononuclear cells from HIV infected patients failing antiretroviral therapy. *Journal of Medical Virology*, v.80, p.766–771, 2008.
- UEDA, K.; CARDARELLI C.; GOTTESMAN, M.M.; PASTAN, I. Expression of a full-length Cdna for the human “MDR1” gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.84, p. 3004-3008, May 1987.
- VAN DER HADEN, S.; CHIERS, K.; DUCATELLE, R. Tissue distribution of p-glycoprotein in cats. *Anatomia Histologia Embryologia*, v. 38, n.6, p.455-460, 2009.
- VETTORATO, E.; ZONCA, A.; ISOLA, M. VILLA, R.; GALLO, M.; RAVASIO, G.; BECCAGLIA, M.; MONTESISSA, C.; CAGNARDI, P. Pharmacokinetics and efficacy of intravenous and extradural tramadol in dogs. *The Veterinary Journal*, v.183, p.310-315, 2010.
- VLASE, L.; LEUCUTA, S.; IMRE, S. Determination of tramadol and *O*-desmethyltramadol in human plasma by high-performance liquid chromatography with mass spectrometry detection. *Talanta*, v.75, p.1104-1109, 2008.
- WALDHOER, M.; BARTLETT, S.E.; WHISTLER, J.L. Opioid Receptor. *Annual Review of Biochemistry*, v.73, p.953-990, 2004.
- WEBSTER, C.R.L. *Farmacologia Clínica em Medicina Veterinária*. São Paulo: Roca, 2005.
- YAKSH, T.L.; WALLACE, M.S. Opioides, analgesia e tratamento da dor. In: BRUNTON, L.L. et al. *As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman*. 12 ed. Porto Alegre: AMGH, p.481-525, 2012.
- YAS-NATAN, E.; SHAMIR, M.; KLEINBART, S.; AROCH, I. Doramectin toxicity in a collie. *Veterinary Record*, v.153, p.718–720, 2003

---

# APÊNDICE

---

APÊNDICE – Confirmação da submissão do artigo “Pharmacokinetic of tramadol in MDR1 mutated Collie dogs” à revista *The Veterinary Journal* e artigo enviado para publicação. A revista possui fator de impacto 2,424.



The screenshot shows an email interface with a purple header bar containing icons for 'Apagar', navigation arrows, 'Mover', 'Spam', 'Ações', and up/down arrows. The email subject is 'Submission Confirmation for The Veterinary Journal' and the date is 'Qua, 19 Jun 2013 às 22:42'. The sender is 'TVJL' and the recipient is 'karinegehlen@yahoo.com.br'. The body of the email contains the following text:

Title: Pharmacokinetic of tramadol in MDR1 mutated Collie dogs

Dear Mrs. Baja,

Your submission has been received by the journal  
The Veterinary Journal.

You will be able to check on the progress of your paper by logging onto the Elsevier Editorial Systems as an Author using the following information:

<http://ees.elsevier.com/vtj/>  
Username: Your username is: karine  
If you can't remember your password please click the "Send Password" link on the Login page.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Editorial Office Staff  
The Veterinary Journal

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>  
Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

- 1 Pharmacokinetic of tramadol in MDR1 mutated Collie dogs  
2  
3 Karine Gehlen Baja<sup>a,b \*</sup>, Teresa Dalla Costa<sup>c</sup>, Bruna Torres<sup>c</sup>, Vanderlei Biolchi<sup>d</sup>, Ilma Simoni  
4 Brum da Silva<sup>d</sup>, Claudio Correa Natalini<sup>e</sup>.  
5  
6 <sup>a</sup> Institute of Basic Health Sciences, Department of Physiology, Universidade Federal do Rio  
7 Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.  
8  
9 <sup>b</sup> Department of Small Animal Medicine and Surgery, Faculty of Veterinary Medicine,  
10 Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas, Brazil  
11  
12 <sup>c</sup> Centro Bioanalítico de Medicamentos, Faculty of Pharmacy, Universidade Federal do Rio  
13 Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil  
14  
15 <sup>d</sup> Laboratory of Molecular Biology and Endocrine Tumor, Department of Physiology, Institute  
16 of Basic Health Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.  
17  
18 <sup>e</sup> Department of Pharmacology, Institute of Basic Health Sciences, Universidade Federal do Rio  
19 Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.  
20  
21 \* Corresponding author. Tel.: 55 51 91028402  
22 E-mail address: [karinegehlen@yahoo.com.br](mailto:karinegehlen@yahoo.com.br) (K.G. Baja)  
23

## 24 ABSTRACT

25 P-glycoprotein (P-gp) is a drug efflux pump, which mediate multidrug resistance and limit the  
26 efficacy of many drugs. A mutation in the canine multidrug resistance gene, *MDR1 nt230*  
27 (*del4*), has previously been associated with drug sensitivities in breeds from the collie lineage.  
28 Dogs carrying mutant allele show increased sensitivity of many drugs. This study evaluated  
29 serum tramadol concentration following a single oral administration of sustained release (SR)  
30 100 mg tablets to 20 Collie dogs which were previously MDR1 genotyping by a PCR-based  
31 method with subsequent automatic sequencing for detection of this nt230(del4) MDR1  
32 mutation, using a small amount of genomic DNA from blood cells. The purpose of this study  
33 was to evaluate tramadol as P-gp substrate using Collie dogs as an animal model. Six  
34 homozygous wild type and fourteen heterozygous mutated MDR1 genotyped was identify,  
35 there was no homozygous mutated dog. Serum concentrations of tramadol were analysed by  
36 high performance liquid chromatography (HPLC) with mass spectrometry (MS). Tramadol was  
37 well tolerated in all 20 Collies. The median maximum plasma concentration, time to maximum  
38 plasma concentration and area under the curve for MDR1 wild type dogs were 73,2 ng/mL, 4h  
39 and 412,66 ng.h/mL respectively; and 56,41 ng/mL, 4 h and 315,11 ng.h/mL to heterozygous  
40 MDR1 nt230(del4) mutated dogs. The findings suggest that tramadol is not a P-gp substrate.  
41 Besides, tramadol SR formulation does not have characteristics to be an effective analgesic  
42 administrated once a day. More studies must be established to predicted therapeutic dose and  
43 frequency of tramadol SR in dogs.

44

45 *Keywords:* *MDR1*; P-glycoprotein; sustained release; LC-MS; MDR1nt230 (del4)

46



## 47 INTRODUCTION

48

49 Pain is a fundamental experience characterized by an unpleasant physical perception  
50 and corresponding emotional state, that it signals actual or potential tissue damage, which  
51 evokes withdrawal and/or recuperative behaviors (LaCroix-Fralish and Mogil, 2009). An  
52 effective control of pain helps the healing process and improved the general well-being of any  
53 animal or person (Hansen, 2003; Mathews, 2000). Many of the human available analgesics are  
54 considered effective for painful conditions in dogs; however, their uses are limited by the  
55 unwanted side effects, particularly in chronic use (McMillan et al., 2008).

56 Tramadol, (1RS, 2RS)-2-[(dimethylamino)-methyl]-1-(3-methoxyphenyl)-  
57 cyclohexanol is a centrally acting synthetic opioid first synthesized in 1962 by Grünenthal in  
58 an attempt to reduce common opioid adverse effects such as respiratory depression. It is  
59 marketed as a racemic mixture of its *cis* structure, in the form of a salt, tramadol hydrochloride,  
60 readily soluble in water and ethanol, and has a pKa of 9.41 (ECDD, 2006). Tramadol produces  
61 effective clinical analgesia by a dual interactive mechanism of action: it is a non-selective pure  
62 agonist at  $\mu$ ,  $\delta$  and  $\kappa$  opioid receptors with a higher affinity for the  $\mu$  receptor; and inhibits  
63 neuronal re-uptake of serotonin and norepinephrine and enhances presynaptic release of  
64 serotonin (Raffa et al., 1992).

65 Hepatic metabolism of tramadol in humans is by the CYP2D6 isoenzyme and produces  
66 the *O*-desmethyltramadol active metabolite, known as M1 (Kukanich and Papich, 2011). This  
67 metabolite has 2 to 4 times the analgesic potency of the parent compound and 4 to 200 times  
68 greater affinity for the  $\mu$  opioid receptor (Raffa et al., 1992). This metabolite also exists as a  
69 racemic mixture of two enantiomer, having  $\mu$  opioid and adrenergic receptors activity  
70 (McMillan, 2008).

71 Tramadol is used widely in human, the absence of cardiorespiratory relevant effect, the  
72 low abuse potential and little effect on gastrointestinal motility of this drug increases its  
73 prescription to relieve mild to moderate pain, recommended even for children (Bressolle et al.,  
74 2009). Two separate studies in dogs shown evidence of effective analgesia using 2 mg/kg  
75 intravenous (IV) for the control of post-operative pain following ovariohysterectomy and tibial  
76 plateau leveling osteotomy (TPLO) (Mastrocinque and Fantoni, 2003; Vettorato et al., 2010).

77 Drug transporters are recognized to be very relevant to drug disposition and response  
78 (Ieiri et al., 2004). P-glycoprotein (P-gp) is the most important transport protein, being  
79 identified in several mammalian species (mice, rats, bovines, monkeys, rodents, guinea pigs,  
80 sheep, cats and humans) (Saito et al., 1997; Van der Haden, 2009). P-gp is an ATP-dependent  
81 efflux transporter, which was first described in 1976 in a Chinese hamster ovary tissue culture  
82 cells colchicine resistance (CH<sup>R</sup>) (Juliano and Ling, 1976), associated with an acquired cross-  
83 resistance to multiple cytotoxic anticancer agents (Fojo et al., 1987). Studies proved that P-gp  
84 is also expressed in many normal tissues, including canalicular surface of hepatocytes, the  
85 apical surface of proximal tubular cells in kidneys, the brush border surface of the intestine,  
86 pancreas, on the apical membranes of cells facing an excretory compartment, it was also  
87 identify in adrenal glands (Thiebaut et al., 1987), endothelial cells at blood–brain barrier, lungs,  
88 prostate (Fojo et al., 1987), heart (Couture et al., 2006), blood-testis, blood-ovarian, placenta  
89 (Kudzi et al, 2010), blood mononuclear cells (Robey et al, 2006), ocular conjunctiva and cornea  
90 (Haritova, 2013), always being involved in protecting cells from toxic agents.

91 P-gp, encoded by the multidrug resistance gene (MDR1/ABCB1), has unusually broad poly-  
92 specificity, recognizing different compound types, most P-gp substrates are hydrophobic (Aller  
93 et al., 2009).

94 A canine mutation in MDR1 gene causes drug sensitivity with neurotoxic signs in  
95 several dog breeds from the Collie lineage. This phenomenon is also called ivermectin

96 sensitivity because it was first described for the drug ivermectin in Collies in 1983 (Preston,  
97 1983; Seward, 1983). Ivermectin causes neurologic toxicity in some Collies, at doses that are a  
98 fraction of the dose required to cause toxicity in other dogs. Mealey et al. (2001) identified a 4-  
99 bp gene deletion in the fourth exon in the canine MDR1 gene and was referred to as MDR1-  
100 1Δ, ABCB1-1Δ, or MDR1 nt230(del4). This mutation was discovered correlating an incident  
101 in MDR1 knockout mice that accidentally suffered ivermectin intoxication (Schinkel et al.,  
102 1994). A phylogenetic study based on reports of the breeds that showed poisoning medications  
103 and Collie bloodlines descendants concluded that MDR1 mutation have started from a common  
104 ancestor that lived in Great Britain before 1873, the genetic isolation of breeds by registry year  
105 (Neff et al.,2004).

106 Dogs carrying two MDR1 nt230(del4) mutant alleles display the ivermectin-sensitive  
107 phenotype and are susceptible to toxicity caused by other P-glycoprotein substrates as well  
108 (Mealey et al., 2004) . Dogs with homozygous MDR1 nt230(del4) do not express a functionally  
109 intact P-glycoprotein and (in addition to ivermectin) show increased sensitivity to many P-  
110 glycoprotein transported drugs (Gramer et al., 2010). The allele mutation causes a frameshift  
111 accompanied by multiple premature stop codons, presumably resulting in a severely truncated  
112 P-glycoprotein composed of 10% of the wild-type aminoacid sequence (Roulet et al., 2003).  
113 The potential transport of tramadol by P-gp was suggest in humans (Slanar et al., 2007), but not  
114 elucidated in *in vitro* Caco-2 monolayer model (Kanaan et al., 2009). The present study has the  
115 purpose of observe the tramadol pharmacokinetics profile in Collie dogs, as an animal model,  
116 to investigate tramadol as a P-gp substrate.

117

## 118 MATERIAL AND METHODS

### 119 *Animals*

120 The study involved 20 Collie dogs from private owners, adults, 9 males and 11 females,  
121 body weight between 19 and 31 kg. The dogs were healthy based on physical examination,  
122 hemogram, total plasma proteins and serum biochemistry before initiation of the study.  
123 Venous blood sample from 20 Collies were collected for genomic DNA extraction. The study  
124 was approved by the local Research and Ethics Committee on Animal Use.

125

### 126 *Genotyping*

127 Genomic DNA was isolated from anticoagulated blood using Pure Link™ Genomic  
128 DNA Mini Kit (Invitrogen). Approximately 15-30 µg/mL DNA were isolated.  
129 For amplification were used published primer sequences (Hugnet et al., 2004). The primer  
130 sequences were: forward primer 5′ - GGC TTG ATA GGT TGT ATA TGT TGG TG – 3′ and  
131 reverse primer 5′ - ATT ATA ACT GGA AAA GTT TTG TTT – 3′. These primers select an  
132 amplified fragment spanned the mutation area of the canine MDR1 gene (GenBank AF045016),  
133 generating 148 and 144 bp amplicons for the wildtype and mutant alleles, respectively. PCR  
134 reaction was performed in 25 µL using Taq DNA polymerase (Invitrogen). Firstly were pipetted  
135 *mix 1* containing 16.4 µL Milli-Q water; 2 µL of buffer; 0.6 µL MgCl<sub>2</sub> and 1 µL of DNA,  
136 resulting in a volume of 20 µL. *Mix 1* was placed in thermocycler at 94°C for 4 minutes.  
137 Meanwhile, was pipetted the *mix 2* contained 2,7 µL of Milli-Q water, 0,5 µL buffer, 0,15 µL  
138 MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µL of dNTPs, 0,5 µL of each primer at 10 µM concentration and *Taq* Polymerase  
139 0,15 µL. After *mix 1* hotstart was added *mix 2* and then placed in thermocycler programmed in  
140 the following conditions: 40 cycles of denaturation at 94° C for 40 s, annealing at 55° C for 30  
141 s and extension at 72° C for 30 s; and final extension of 72°C for 4 min. After amplification  
142 sample were frozen at – 20°C until analysis.

143 PCR products were purified using polyethylene glycol 8000M (PEG 8000) precipitation  
144 of DNA previously described by Dunn and Blattner (1987). Samples were sequenced at the

145 Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (Centro de Pesquisa Experimental, HCPA)  
146 using ABI 3500 Genetic Analyzer with 50 cm capillaries and POP7 polymer (Applied  
147 Biosystems). PCR products were labeled with 3.2 pmol of the primer 5'- GGC TTG ATA GGT  
148 TGT ATA TGT TGG TG -3' and 1 µL of BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit  
149 (Applied Biosystems) in a final volume of 10 µL. Labeling reactions were performed in a  
150 Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) thermocycler with an initial denaturing  
151 step of 96°C for 1 min followed by 35 cycles of 96°C for 15 sec, 50°C for 15 sec and 60°C for  
152 4 min. Labeled samples were purified using BigDye XTerminator Purification Kit (Applied  
153 Biosystems) and electroinjected in the automatic sequencer.

154

#### 155 *Tramadol administration*

156 All 20 Collie dogs received tramadol sustained release (SR) 100 mg tablet per dog  
157 (Tramal® Retard- Grünenthal) orally ( $4,16 \pm 0,67$  mg/kg tramadol HCl), food was withheld  
158 for 12 h before and 2 h after following dosing. The tablets were administered inserted into a  
159 piece of soft bread for an easy swallowing.

160

#### 161 *Sample collection*

162 A 20-gauge cephalic catheter was insert prior the drug administration and used for blood  
163 collection. Blood was collected into evacuated glass tubes with clot activator (BD Vacutainer®)  
164 and placed on bench 30 min until centrifugation. The samples were centrifuged for 10 min at  
165 5000 g, serum separated and stored frozen at - 20°C prior to analysis. Blood samples were  
166 collected prior to and at 30 min, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12 and 24 h after oral tramadol administration.

167

#### 168 *Serum analysis*

169 Reference standard material of tramadol was a gift from União Química (Brazil). The  
170 internal standard (IS) used was propranolol (Patel et al., 2009).

171 Serum concentration of tramadol ( $m/z$ , 264  $\rightarrow$ 58; qualifying ion and product ion) was  
172 quantified using high performance liquid chromatography (HPLC) with mass spectrometer  
173 (MS) detection. The liquid chromatography system from Shimadzu consisted of a LC-10AD  
174 pump with autosampler (SIL-10AD) and a degasser (DGU-14A) Chromatographic separation was  
175 performed on a Luna <sup>®</sup> C18 analytical column (150 x 4,6 mm; 5 $\mu$ m; Phenomenex) maintained  
176 at 30°C. The mobile phase consisted of acetonitrile (Merck) and water containing 0,1% formic  
177 acid (80:20(v/v)). Separation of analyte and IS was performed under isocratic condition at a  
178 flow rate of 0,4 mL/min, the injection volume was 10  $\mu$ L.

179 Detection of analytes and IS was performed on a triple quadrupole mass spectrometer,  
180 Quatro LC Micromass<sup>®</sup> operating in the positive ion mode. Quantitation was done using  
181 multiple reaction monitoring (MRM) mode to monitor protonated precursor $\rightarrow$  product ion  
182 transition of  $m/z$  263,95  $\rightarrow$ 58 for tramadol, and 260,14 $\rightarrow$  115,65 for IS. All the parameters of  
183 LC and MS were controlled by *software* MassLynx<sup>®</sup> (Waters Corporation). The detection  
184 parameters were: collision activation dissociation (CAD):15 V; cone voltage: 20V for tramadol  
185 and 30V for IS; source temperature: 120°C; desolvation temperature: 350° C.

186 Tramadol and IS were extracted from serum using liquid-liquid method (Küçük et al.,  
187 2005). Drug from extracted serum was reconstituted with 100  $\mu$ L of acetonitrile- water (50:50  
188 v/v). The lower limit of quantification (LLOQ) of tramadol was 1 ng/mL. The pharmacokinetic  
189 parameters analyzed were mean serum concentration/time profile,  $T_{max}$  and  $C_{max}$  for the  
190 different groups according MDR1 genotype.

191

192 *Statistical analysis*

193 The data of plasma concentrations of tramadol by administration time were analyzed  
194 using analysis of GEE (Generalized Estimating Equations) which is based on the methodology  
195 of the Generalized Linear Models. The Mann-Whitney *U* test was used to compare independent  
196 pharmacokinetics parameters. These data are presented as median and range (minimum and  
197 maximum). The significance level was set at 0.05.

198

## 199 RESULTS

200 *Genotyping*

201 We genotyped the MDR1 gene for the MDR1 nt230(del4) mutation in 20 Collies. The  
202 predicted 144 and 148 bp amplicons were detected. The deletion mutation associated with  
203 ivermectin sensitivity in Collie lineage dogs, with a four nucleotide deletion in 230 position  
204 (exon 4), was identified in 14 Collies (MDR1+/-), these dogs were heterozygous for the  
205 mutation, carrying one mutant allele and other wild-type allele. Sample from 6 dogs were  
206 homozygous wild type (MDR1+/+). Figure 1 shows the sequencing DNA from 1 homozygous  
207 wild type and one heterozygous mutation dog.

208

209 *Animals*

210 Tramadol SR was well tolerated after oral administration to 20 Collies, 14 MDR1 +/-  
211 and 6 MDR1+/+. No vomiting, diarrhea, excitation signs or changes on cardiac rate were  
212 detected. Slight sedation was observed in 15 dogs and moderate sedation in three dogs; between  
213 4 and 6 hours of observation. Genotyping was not correlated to these results (data not shown).

214

215 *Serum concentration of tramadol*

216 The dose of tramadol SR was  $4,16 \pm 0,67$  mg/kg (mean  $\pm$  SD), administrated as one  
217 whole 100 mg tablet per dog. Tramadol serum concentration was less than the limit of

218 quantification in three heterozygous dogs. The tramadol serum concentration was separate in  
219 two groups, homozygous wild type (MDR1<sup>+/+</sup>) (n=6) and heterozygous mutant (MDR1<sup>+/-</sup>)  
220 (n=11). The mean tramadol serum concentration per time of administration was not statistical  
221 different between groups (Figure 2).

222 As shown in Table 1 were not statistically significant differences in pharmacokinetic  
223 parameters between groups of MDR1 wild type and heterozygous MDR1 nt230(del4) (Mann-  
224 Whitney *U* test;  $\alpha=0,05$ ).

225

## 226 DISCUSSION

227 Oral administration of drugs requires absorption across the intestinal epithelium barrier.  
228 The gastrointestinal tract is the organ that digests and absorbs nutrients and water from food  
229 and drinks. At the same time, this organ is exposed to harmful exogenous substances and  
230 functions as a host defense/detoxification barrier equipped with metabolic enzymes and efflux  
231 transporters. Many substances absorption occur by passive diffusion, but also by influx  
232 transporters (Takano et al., 2006). In addition to influx transporters, ATP-dependent efflux  
233 transporters such as P-glycoprotein are also expressed on the apical membrane of intestinal  
234 epithelia in humans others mammalian animals, such as dogs (FROMM 2004). P-gp limits oral  
235 bioavailability of its substrates (Hunter and Hirst, 1997). P-gp recognizes a variety of  
236 structurally and pharmacologically unrelated neutral and positively charged hydrophobic  
237 compounds (Aller et al., 2009).

238 To study physiological roles of P-gp was generated mice genetically deficient in the  
239 MDR1 gene, MDR1 knockout mice, which provide a useful animal model to further test the  
240 pharmacological roles of the drug-transporting P-gps and to analyze the specificity and  
241 effectively of P-gp-blocking drugs. It was shown that MDR1 knock-out mice have a 90-fold  
242 increased brain penetration of ivermectin associated with a 100-fold higher sensitivity to



243 centrally neurotoxic effects after either IV or oral administration compared with mice with  
244 intact P-gp function (Schinkel et al., 1994).

245 In 2001, Mealey et al. (2001) identified a 4-bp deletion in the MDR1 gene of an  
246 ivermectin-sensitive Collie. This nt230(del4) MDR1 deletion involves a frame shift at amino  
247 acid position 75 followed by a premature stop codon at amino acid position 91. This severely  
248 truncated protein is nonfunctional and was not detectable by Western blot analysis in  
249 ivermectin-sensitive Collies (Roulet et al., 2003). The MDR1 mutation in collies appears to be  
250 widely distributed in the population (Mealey, 2004). Studies involving a large number of collies  
251 shown a very high incidence of MDR1 nt230(del4) mutation in this breed: in USA 31% were  
252 homozygous for the mutant allele and 47% were heterozygous (n=263) (Neff et al., 2004); in  
253 Germany 36% were homozygous mutant and 45% were heterozygous (n=2227) (Gramer et al.,  
254 2010). Collie breed, in addition to MDR1 knockout mouse, shows a valuable animal model to  
255 test P-gp substrates (Geyer et al, 2005a; Roulet et al., 2003). In our study in Brazilian Coolie  
256 dogs (n=20) 70% were heterozygous and 30% MDR1 wild type, no homozygous mutant was  
257 detected. In order to establish a proportion of mutations in Collies and descendant lineage, a  
258 larger number of dogs must be genotyped.

259 The presence of MDR1 mutation in herding dog breeds has broad clinical implications  
260 with respect to canine veterinary care. In addition to ivermectin, the most known substrate in  
261 veterinary area, a large number of other drugs are well-known substrates of the MDR1 efflux  
262 pump. Homozygous and heterozygous mutant dogs show neurotoxic adverse effects to usually  
263 veterinary therapeutic drugs P-gp substrates, such as vincristine, vinblastine, doxorubicin,  
264 loperamide (Mealey, 2003), moxidectin (Geyer et al., 2005b) and doramectin (Yas-Natan et al.,  
265 2003). Individualized pharmacological therapy may be worth considering for other P-gp  
266 substrate drugs as well. Veterinarians may now screen animals of affected breeds for the MDR1  
267 genotype prior to administering drugs that are substrates for P-gp.

268 Our *in vivo* data suggest that tramadol is not P-gp substrate, and could be used in MDR1  
269 mutant dogs to promote analgesia in therapeutic doses for this specie. Our experimental results  
270 are in accordance with a study using Caco-2 cell monolayer model (*in vitro*). No effect on  
271 tramadol or M1 transport was observed using P-gp inhibitors cyclosporine A (non-specific P-  
272 gp inhibitor) or GF120918 (specific P-gp inhibitor). It was used P-gp positive control  
273 rhodamine 123, which showed a polarized transport across the Caco-2 monolayers in the way  
274 of a net active secretion as well as a 80% decrease of its secretory transport and 38% increase  
275 of the absorptive one in the presence of the P-gp inhibitor cyclosporine A. This *in vitro* study  
276 has concluded that tramadol and M1 are not P-gp substrates (Kanaan et al., 2009).

277 Contradictory results, suggesting tramadol as a P-gp substrate was published recently.  
278 This study had a small clinical trial and involved selected CYP2D6 polymorphism and MDR1  
279 C3435T polymorphism (Slanar et al., 2007). The MDR1 C3435T polymorphism is a SNP  
280 which results in lower P-gp expression levels (Chen et al., 2009). A significant difference in  
281 pharmacokinetics of tramadol influence by MDR1 polymorphism was found only in  $C_{max}$   
282 parameter in CYP2D6 poor metabolizers (Slanar et al., 2007).

283 Although tramadol does not represent high plasma concentration in MDR1 mutant dogs,  
284 it is important to note that P-gp is not the only determinant of sensitivity to drugs. Other genetic  
285 factors, such as the activity of drug metabolizing enzymes, as well as environmental factors  
286 determine variations in pharmacokinetics and pharmacodynamics (Pedersen et al., 2006).

287 Several sustained release formulations have been developed to a possible once daily  
288 administration. In humans, the tramadol sustained release (SR) formulation can simplify the  
289 dosing regimen by an oral once a day administration, besides has advantages over immediate  
290 release presentation since it decreases peak plasma concentrations, thus minimizing acute side  
291 effects. In humans, the SR tramadol presents higher  $t_{1/2}$  (9,9 h) and longer lasting plasma  
292 concentrations (35 h) (Malonne et al., 2003), compared with dogs. Dogs have faster tramadol

293 elimination than humans in both SR (Giorgi et al., 2009a) and IR (Kukanich and Papich, 2004)  
294 oral formulation. In the present study SR tramadol exhibited lower  $C_{max}$ , 73,2 and 56,4 ng/mL;  
295 and longer  $T_{max}$ , 4 hours, in both groups, MDR1<sup>+/+</sup> and MDR1<sup>+/-</sup>, respectively, compared to  
296 immediate release (IR) tramadol study in dogs (Kukanich and Papich, 2011). In their study  
297 median  $C_{max}$  and  $T_{max}$  were 237,5 ng/mL and 1.1 h, respectively. A pilot study in dogs (mean  
298 dose 4,32 mg/kg) with oral tramadol SR demonstrated similar AUC (median 357 ng.h/mL) and  
299  $t_{1/2}$  (1,88 h) results compared to our study (Giorgi et al., 2009b).

300

### 301 CONCLUSIONS

302 The data of this study suggest that tramadol is not a P-gp substrate. Collie and descendent  
303 lineage can use tramadol in therapeutic doses for specie. More studies of pharmacokinetics and  
304 pharmacodynamics oral SR tramadol are needed to provide ideal dose and frequency of this  
305 formulation in dogs.

306

307 ACKNOWLEDGEMENTS

308

309 This research was financial supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e  
310 tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES),  
311 and Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE- HCPA).

312

## 313 REFERENCES

314

315 Aller, S.G.; Yu, J.; Ward, A.; Weng, Y.; Chittaboina, S.; Zhuo, R.; Harrell, P.M.; Trinh, Y.T.;  
316 Zhang, Q.; Urbatsch, I.L.; Chang, G, 2009. Structure of P-Glycoprotein Reveals a Molecular  
317 Basis for Poly-Specific Drug Binding. *Science*, 323, 1718-1722.

318

319 Bressolle, F.; Rochette, A.; Khier S.; Dadure, C.; Ouaki J.; Capdevila, X., 2009. Population  
320 pharmacokinetics of the two enantiomers of tramadol and O-demethyl tramadol after surgery  
321 in children. *British Journal of Anaesthesia*, 102, 390–399.

322

323 Chen, B.; Fang, J.; Zhang, W.; Jin, Z.; Yu, Z.; Cai, W., 2009. Detection of C1236T, G2677T/A,  
324 and C3435T Polymorphism of MDR1 by Amplification Refractory Mutation System PCR.  
325 *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 23, 110-116.

326

327 Couture,L.; Nash,J.A.; Turgeon,J., 2006. The ATP-Binding Cassette Transporters and Their  
328 Implication in Drug Disposition: a Special Look at the Heart. *Pharmacological Reviews*, 58,  
329 244-258.

330

331 Dunn, I.S.; Blattner, F.R., 1987. Charon-36 to 40 multi enzyme, high-capacity, recombination  
332 deficient replacement vectors with polylinkers and polystuffers. *Nucleic Acids Research*, 15,  
333 2677-2698.

334

335 ECDD. Expert Committee on Drug Dependence. 34 th ECDD 2006/4.5.

336

337 Fojo, A.T., Ueda, K.; Slamon, D.J.; Poplack, D.G.; Gottesman, M. M.; Pastan, I., 1987.  
338 Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues (cancer  
339 chemotherapy/doxorubicin/vinblastine) *Proceedings of the National Academy of Sciences of*  
340 *the United States of America*, 84, 265-269.

341

342 Fromm, M.F., 2004. Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers. *TRENDS in*  
343 *Pharmacological Sciences*, 25, 423-429.

344

345 Geyer, J.; Doring, B.; Godoy, J.R.; Leidolf, R.; Moritz, A.; Petzinger, E., 2005a. Frequency of  
346 the nt230 (del4) MDR1 mutation in Collies and related dog breeds in Germany. *Journal of*  
347 *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 28, 545–551.

348

349 Geyer, J.; Döring, B.; Godoy, J.R.; Moritz, A.; Petzinger, E., 2005b. Development of a PCR-  
350 based diagnostic test detecting a nt230(del4) MDR1 mutation in dogs: verification in a  
351 moxidectin-sensitive Australian Shepherd. *Journal of Veterinary Pharmacology and*  
352 *Therapeutics*, 28, 95–99.

353

354 Giorgi, M. ; Del Carlo, S.; Saccomanni, G.; Lebkowska-Wieruszewska, B.; Kowalski, C.J.,  
355 2009a. Pharmacokinetic and urine profile of tramadol and its major metabolites following oral  
356 immediate release capsules administration in dogs. *Veterinary Research Communications*, 33,  
357 875-885.

358

359 Giorgi, M.; Saccomanni, G.; Lebkowska-Wieruszewska, L.; Kowalskiet, C., 2009b.  
360 Pharmacocinetic evaluation of tramadol and its major metabolites after single oral sustained  
361 tablet administration in the dog: a pilot study. *The Veterinary Journal*, 180, 253-255.

- 362 Gramer, I.; Leidolf R.; Döring, B., Klintzsch, S.; Krämer, E.M.; Yalcin, E.; Petzinger E.; Geyer,  
363 J., 2010. Breed distribution of the nt230(del4) MDR1 mutation in dogs. *The Veterinary Journal*,  
364 doi:10.1016/j.tvjl.2010.06.012
- 365
- 366 Hansen, B.D., 2003. Assessment of Pain in Dogs: Veterinary Clinical Studies. *ILAR Journal*,  
367 44, 197-205.
- 368
- 369 Haritova, A.M., 2013. ABC Transporters in the Eyes of Dogs and Implications in Drug  
370 Therapy. *Current Eye Research*, 38, 271-277.
- 371
- 372 Hugnet, C.; Bentjen, S. A.; Mealey K. L., 2004. Frequency of the mutant MDR1 allele  
373 associated with multidrug sensitivity in a sample of collies from France. *Journal of Veterinary  
374 Pharmacology and Therapeutics*, 27, 227–229.
- 375
- 376 Hunter, J.; Hirst, B. H., 1997. Intestinal secretion of drugs- The role of P-glycoprotein and  
377 related drug efflux systems in limiting oral drug absorption. *Advanced Drug Delivery Reviews*,  
378 25, 129-57.
- 379
- 380 Ieiri, I.; Takane, H.; Otsubo, K., 2004. The MDR1 (ABCB1) Gene Polymorphism and its  
381 Clinical Implications. *Clinical Pharmacokinetics*, 43, 553-576.
- 382
- 383 Juliano, R.L.; Ling, V., 1976. A Surface Glycoprotein Modulating Drug in Chinese Hamster  
384 Ovary Cell Mutants Permeability. *Biochimica et Biophysica Acta*, 455, 152-162.
- 385
- 386 Kanaan, M.; Daali, Y.; Dayer, P.; Desmeules, J., 2009. Uptake/Efflux Transport of Tramadol  
387 Enantiomers and *O*-Desmethyl-Tramadol: Focus on *P*-Glycoprotein. *Basic & Clinical  
388 Pharmacology & Toxicology*, 105, 199-206.
- 389
- 390 Küçük, A.; Kadioglu, A.; Çelebi, F., 2005. Investigation of the pharmacokinetics and  
391 determination of tramadol in rabbit plasma by a high-performance liquid chromatography–  
392 diode array detector method using liquid–liquid extraction. *Journal of Chromatography B*, 816,  
393 203–208.
- 394
- 395 Kudzi, W.; Dodoo, A.; Mills, J.J., 2010. Genetic polymorphisms in MDR1, CYP3A4 and  
396 CYP3A5 genes in a Ghanaian population: a plausible explanation for altered metabolism of  
397 ivermectin in humans? *BMC Medical Genetics*, doi:10.1186/1471-2350-11-111.
- 398
- 399 Kukanich B.; Papich, M.G., 2004. Pharmacokinetics of Tramadol and the Metabolite *O*-  
400 desmethyltramadol in Dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 27, 239–  
401 246.
- 402
- 403 Kukanich B.; Papich, M.G., 2011. Pharmacokinetics and antinociceptive effects of oral  
404 tramadol hydrochloride administration in Greyhounds. *American Journal of Veterinary  
405 Research*, 72, 256 – 262.
- 406
- 407 LaCroix-Fralish, M.L.; Mogil, J.S., 2009. Progress in Genetic Studies of Pain and Analgesia.  
408 *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 49, 97-121.
- 409

- 410 Malonne, H.; Sonet, B.; Streel, B.; Lebrun, S.; De Niet, S.; Sereno, A.; Vanderbist, F., 2003.  
411 Pharmacokinetic evaluation of a new oral sustained release dosage form of tramadol. *British*  
412 *Journal of Clinical Pharmacology*, 57, 270-278.
- 413  
414 Mastrocinque, S.; Fantoni, D.T., 2003. A comparison of preoperative tramadol and morphine  
415 for the control of early postoperative pain in canine ovariohysterectomy. *Veterinary*  
416 *Anaesthesia and Analgesia*, 30, 220-228.
- 417  
418 Mathews, K.A., 2000. Pain assessment and general approach to management. *Veterinary*  
419 *Clinics of North America: Small Animal Practice*, 30, 729- 755.
- 420  
421 McMillan, C.J.; Livingston, A.; Clark, C.R.; Dowling, P.M.; Taylor, S.M.; Duke, T.; Terlinden,  
422 R., 2008. Pharmacokinetics of intravenous tramadol in dogs. *The Canadian Journal of*  
423 *Veterinary Research*, 72, 325-331.
- 424  
425 Mealey, K.L.; Bentjen, S.A.; Gay, J.M.; Cantor, G.H., 2001. Ivermectin sensitivity in collies is  
426 associated with a deletion mutation of the *mdr1* gene. *Pharmacogenetics*, 11, 727-733.
- 427  
428 Mealey, K.L., 2004. Therapeutic Implications of the MDR-1 Gene. *Journal of Veterinary*  
429 *Pharmacology and Therapeutics*, 27, 257-264.
- 430  
431 Neff, M.W.; Robertson, K.R.; Wong, A.K.; Safra, N. ; Broman, K.W.; Slatkin, M.;  
432 Mealey, K.L.; Pedersen, N.C., 2004. Breed distribution and history of canine *mdr1-1Δ*, a  
433 pharmacogenetic mutation that marks the emergence of breeds from the collie lineage.  
434 *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 11725-  
435 11730.
- 436  
437 Patel, B. N.; Sharma, N.; Sanyal, M.; Shrivastav, P.S., 2009. An accurate, rapid and sensitive  
438 determination of tramadol and its active metabolite *O*-desmethyltramadol in human plasma by  
439 LC–MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 49, 354-366.
- 440  
441 Pedersen, R.S.; Damkier, P.; Brosen, K., 2006. Enantioselective pharmacokinetics of tramadol  
442 in CYP2D6 extensive and poor metabolizers. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 62,  
443 513-521.
- 444  
445 Preston, J.M., 1983. Adverse reactions to unapproved applications. *Veterinary Record*, 112,  
446 286.
- 447  
448 Raffa, R.B.; Friderichs, E.; Reimann, W., Shank, R. P., Codd, E. E.; Vaught, J. L., 1992.  
449 Opioid and Nonopioid Components Independently Contribute to the Mechanism of Action of  
450 Tramadol, an ‘Atypical’ Opioid Analgesic. *The Journal of Pharmacology and Experimental*  
451 *Therapeutics*, 260, 275-285.
- 452  
453 Robey, R.W.; Zhan, Z.; Piekarz, R.L., Kayastha, G.L.; Fojo, t.; Bates, S.E., 2006. Increased  
454 MDR1 expression in normal and malignant peripheral blood mononuclear cells obtained from  
455 patients receiving desipeptide (FR901228, FK228, NSC630176). *Clinical Cancer Research*,  
456 12, 1547-1555.
- 457

- 458 Roulet, A.; Puel, O.; Gesta, S.; Lepage, J.F.; Drag, M; Soll, M.; Alvinerie, M.; Pineau, T., 2003.  
459 MDR1-deficient genotype in Collie dogs hypersensitive to the P-glycoprotein substrate  
460 ivermectin. *European Journal of Pharmacology*, 460, 85-91.  
461
- 462 Saito, T.; Zhang Z.J.; Tsuzuki, H.; Ohtsubo, T.; Yamada, T.; Yamamoto, T.; Saito, H., 1997.  
463 Expression of P-glycoprotein in inner ear capillary endothelial cells of the guinea pig with  
464 special reference to blood–inner ear barrier. *Brain Research*, 767, 388-392.  
465
- 466 Schinkel, A.H.; Smit, J.J.; Van Tellingen, O.; Beijnen, J.H.; Wagenaar, E.; Van Deemter, L.;  
467 Mol, C.A.; Van Der Valk, M.A.; Robanus-Maandag, E.C.; Riele, H.P., 1994. Disruption of the  
468 mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to  
469 increased sensitivity to drugs. *Cell*, 77, 491-502.  
470
- 471 Seward, R.L., 1983. Reactions in dogs given ivermectin. *Journal of the American Veterinary*  
472 *Medical Association*, 183, 493.  
473
- 474 Slanař, O.; Nobilis, M.; Květina, J.; Matoušková, O.; Idle, J.; Perlík, F., 2007. Pharmacokinetics  
475 of Tramadol is Affected by MDR1 Polymorphism C3435T. *European Journal of Clinical*  
476 *Pharmacology*, 63, 419-421.  
477
- 478 Takano, M.; Yumoto, R.; Murakami, T., 2006. Expression and function of efflux drug  
479 transporters in the intestine. *Pharmacology & Therapeutics*, 109, 137 – 161.  
480
- 481 Thiebaut, F.; Tsuruo, T.; Hamada, H.; Gottesman, M.M.; Pastan, I.; Willingham, M.C., 1987.  
482 Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein. In normal human  
483 tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84,  
484 7735-7738.  
485
- 486 Van Der Haden, S.; Chiers, K.; Ducatelle, R., 2009. Tissue distribution of p-glycoprotein in  
487 cats. *Anatomia Histologia Embryologia-Journal of Veterinary Medicine Series C*. 38, 455-460.  
488
- 489 Vettorato, E.; Zonca, A.; Isola, M.; Villa, R.; Gallo, M.; Ravasio, G.; Beccaglia, M.;  
490 Montesissa, C.; Cagnardi, P., 2010. Pharmacokinetics and efficacy of intravenous and  
491 extradural tramadol in dogs. *The Veterinary Journal*, 183, 310-315.  
492
- 493 Yas-Natan, E.; Shamir, M.; Kleinbart, S.; Aroch, I., 2003. Doramectin toxicity in a collie.  
494 *Veterinary Record*, 153, 718–720.



## 495 TABLE

496

497 Tabela 1. Median (range) pharmacokinetic values in groups of MDR1 homozygous wild type (MDR1+/+) (n=6)  
 498 and heterozygous carriers of MDR1 nt230(del4) mutation (MDR1+/-) (n=11) following single oral administration  
 499 of 100 mg tramadol (TR) sustained release.

500

Genotype	MDR1 +/+ Median	Max-min	MDR1 +/- Median	Max-min
<b>TR parameter</b>				
<b>C<sub>max</sub> (ng/mL)</b>	<b>73,20</b>	94,41 – 18,28	<b>56,41</b>	118,19 – 13,38
<b>T<sub>max</sub> (h)</b>	<b>4</b>	6 - 2	<b>4</b>	6 - 4
<b>AUC<sub>0-∞</sub> (ng.h/mL)</b>	<b>412,66</b>	559,80 - 118,53 –	<b>315,11</b>	676,03 - 66,17
<b>t<sub>½</sub> (h)</b>	<b>2,05</b>	5,95 - 1,82	<b>2,09</b>	5,81 – 1,44

501

## 502 FIGURE LEGENDS

503

504 Fig. 1. DNA sequence in an affected and an unaffected individual. A: DNA sequence  
505 electropherogram of an unaffected individual showing MDR1 wild type gene. B: DNA  
506 sequence electropherogram showing the heterozygous MDR1 nt230(del4) deletion of 4  
507 nucleotides, ATAG in the mutation allele, and one allele wild type. The positions of mutated 4  
508 nucleotides deletion (ATAG) are indicated in the box.

509

510 Fig. 2 Mean  $\pm$  SD serum concentration of tramadol in groups of MDR1 homozygous wild type  
511 (MDR1+/+) (n=6) and heterozygous carriers of MDR1 nt230(del4) mutation (MDR1+/-)  
512 (n=11), following single oral administration of 100 mg tramadol sustained release in Collie  
513 dogs.

514

FIGURES

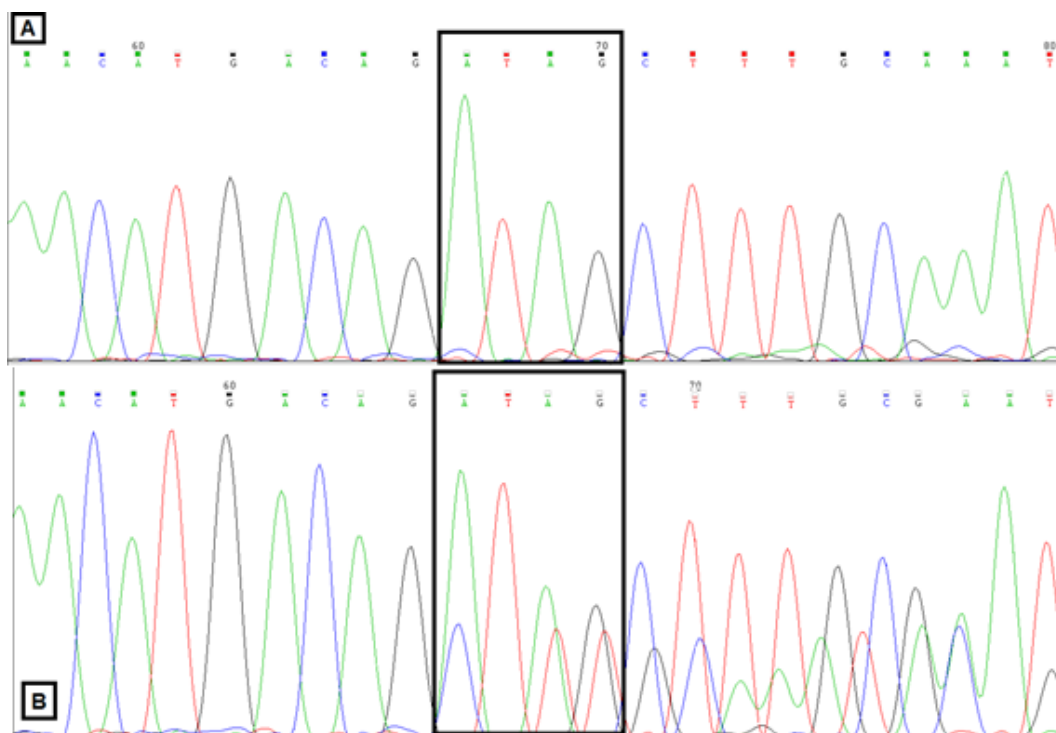


Fig 1.

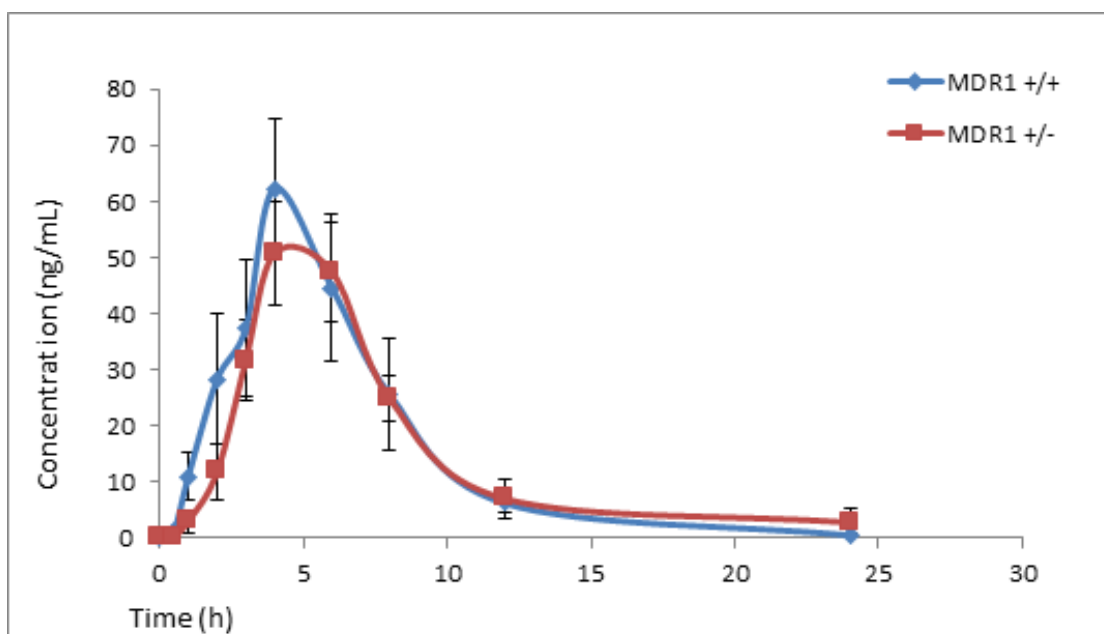


Fig. 2

---

# **ANEXOS**

---

**ANEXO A – Carta de aprovação pela Comissão Científica e pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre**



**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

A Comissão Científica e a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/HCPA) analisaram o projeto:

**Projeto:** 110140

**Data da Versão do Projeto:** 27/11/2011

**Pesquisadores:**

ILMA SIMONI BRUM DA SILVA

KARINE GEHLEN BAJA

CLAUDIO CORREA NATALINI

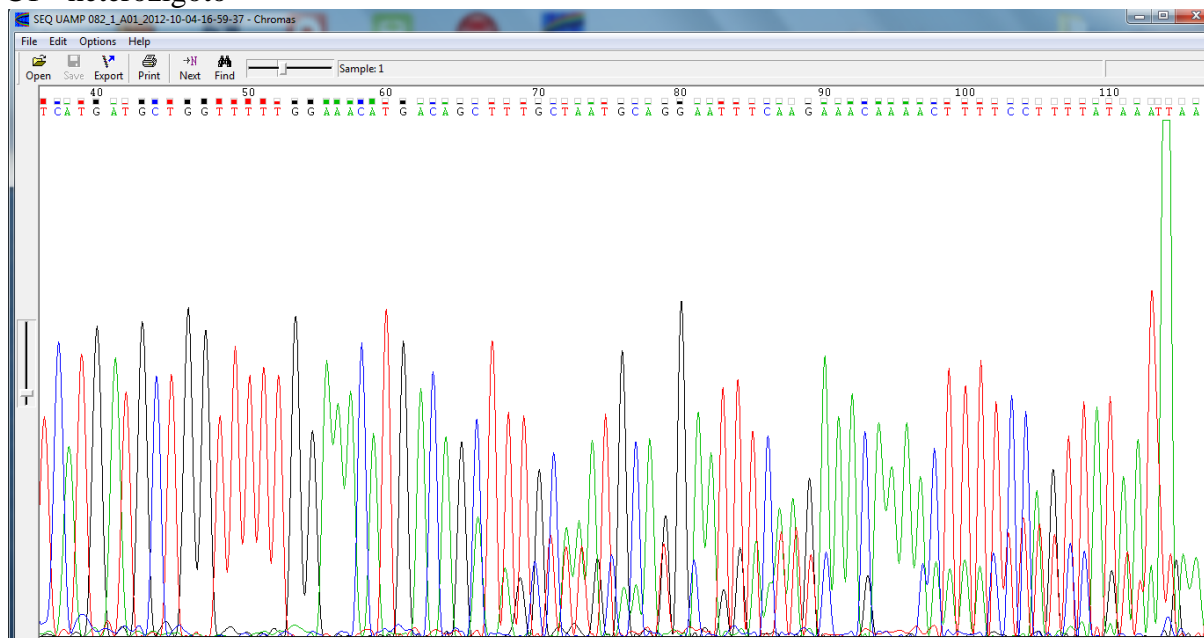
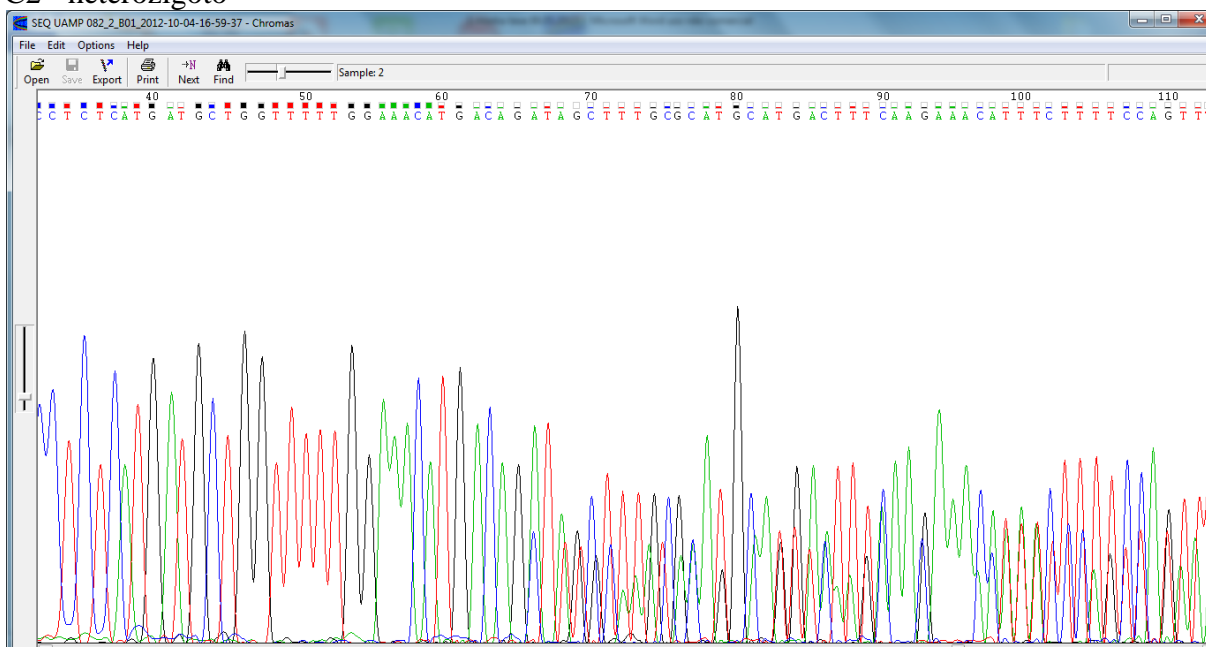
**Título:** Farmacocinética do cloridrato de tramadol administrado oralmente em cães com a mutação MDR1 nt230(del4).

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08/10/2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais.

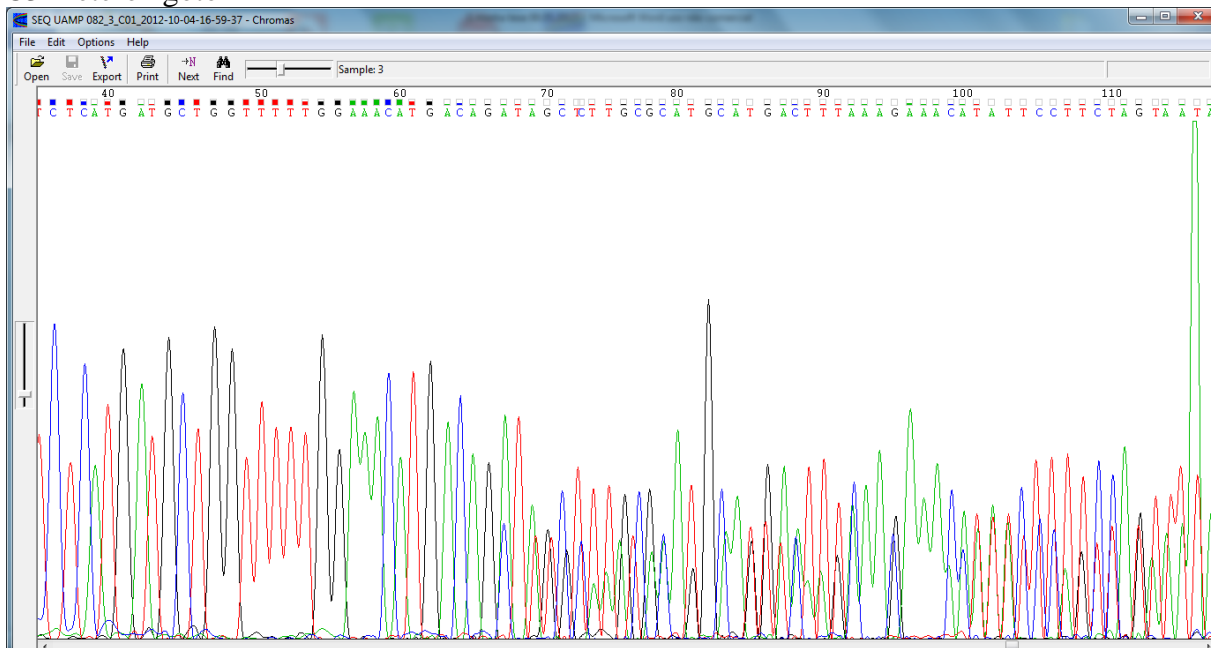
- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação de projetos onde constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEP/HCPA.

Porto Alegre, 02 de dezembro de 2011.

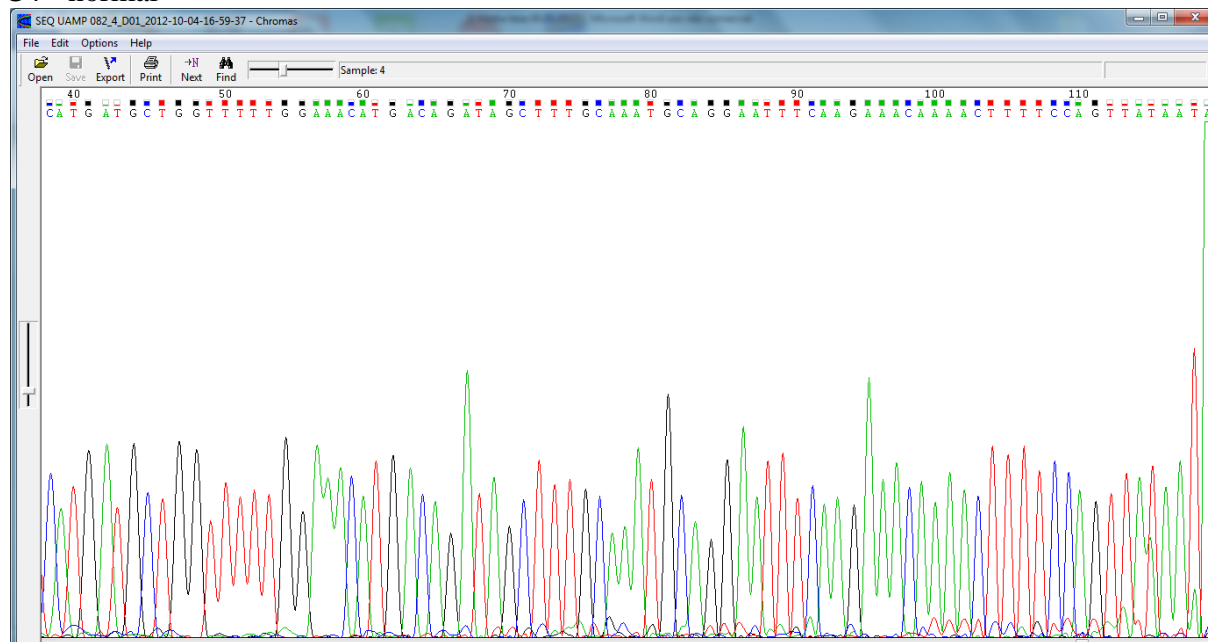
Dr. Alessandro Bersch Osvaldt  
Coordenador da CEUA/HCPA

**ANEXO B – Eletroferogramas dos sequenciamentos gênicos dos 20 cães do estudo.****C1 - heterozigoto****C2 - heterozigoto**

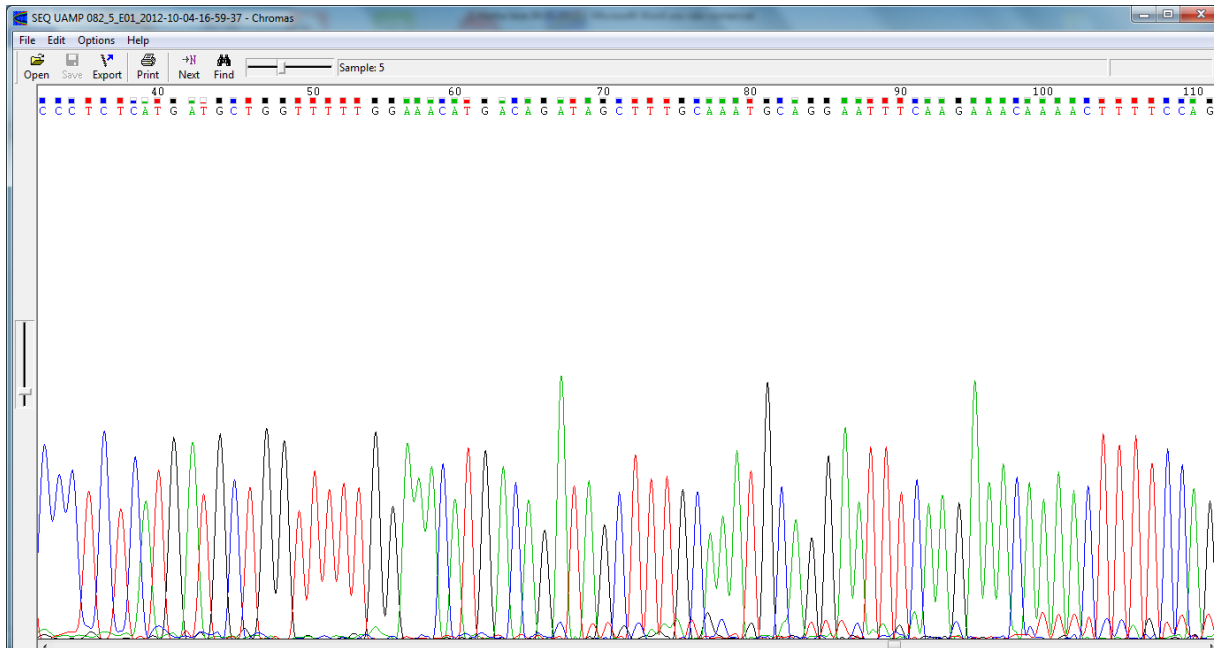
## C3- heterozigoto



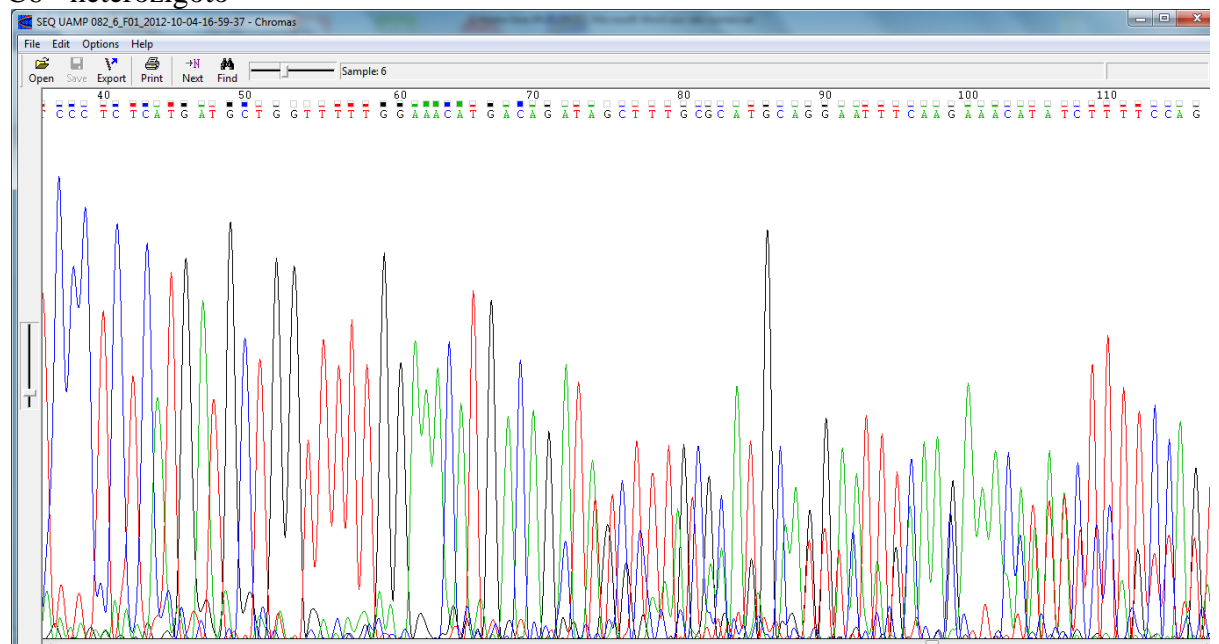
## C4 - normal



## C5 - normal

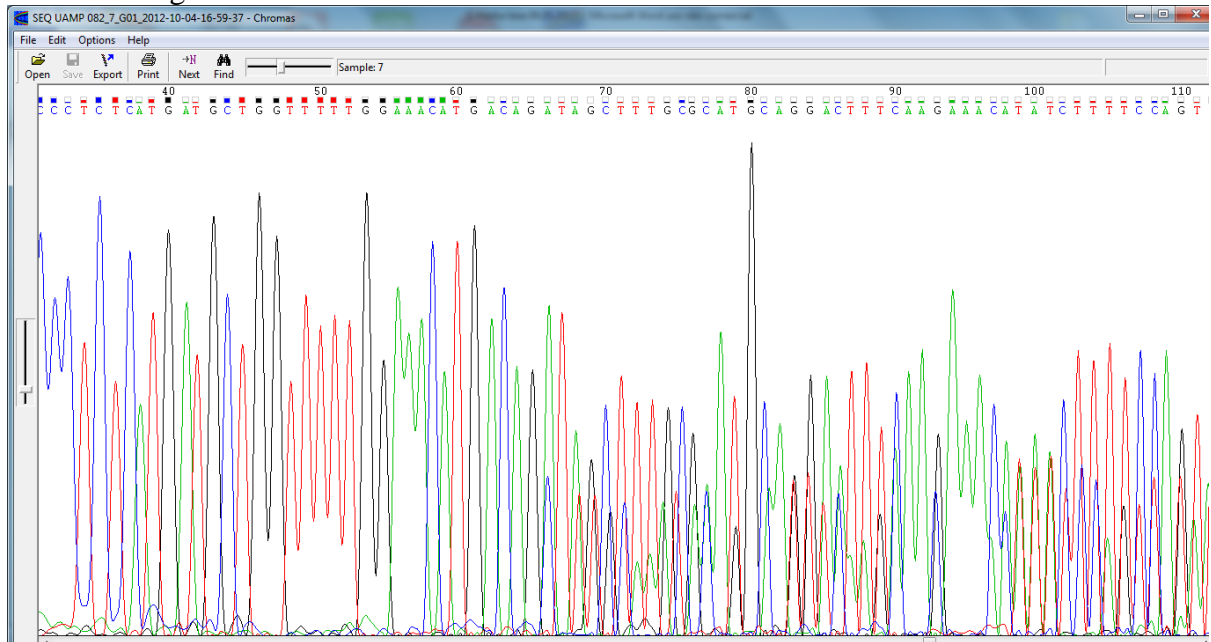


## C6 - heterozigoto

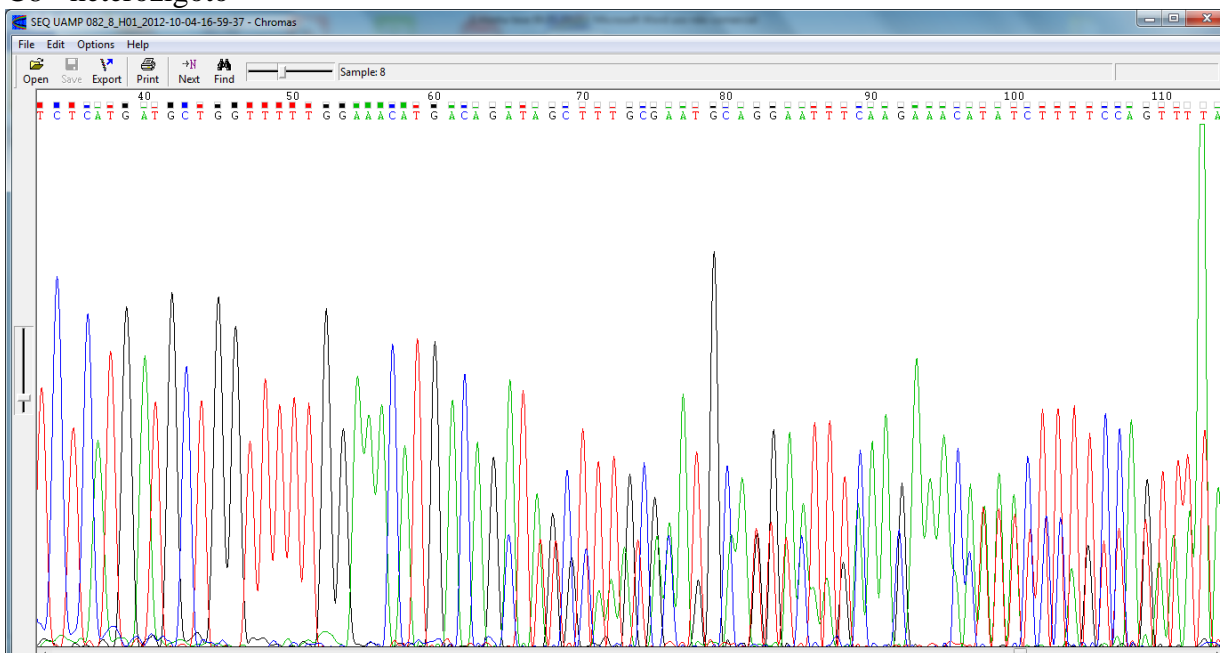




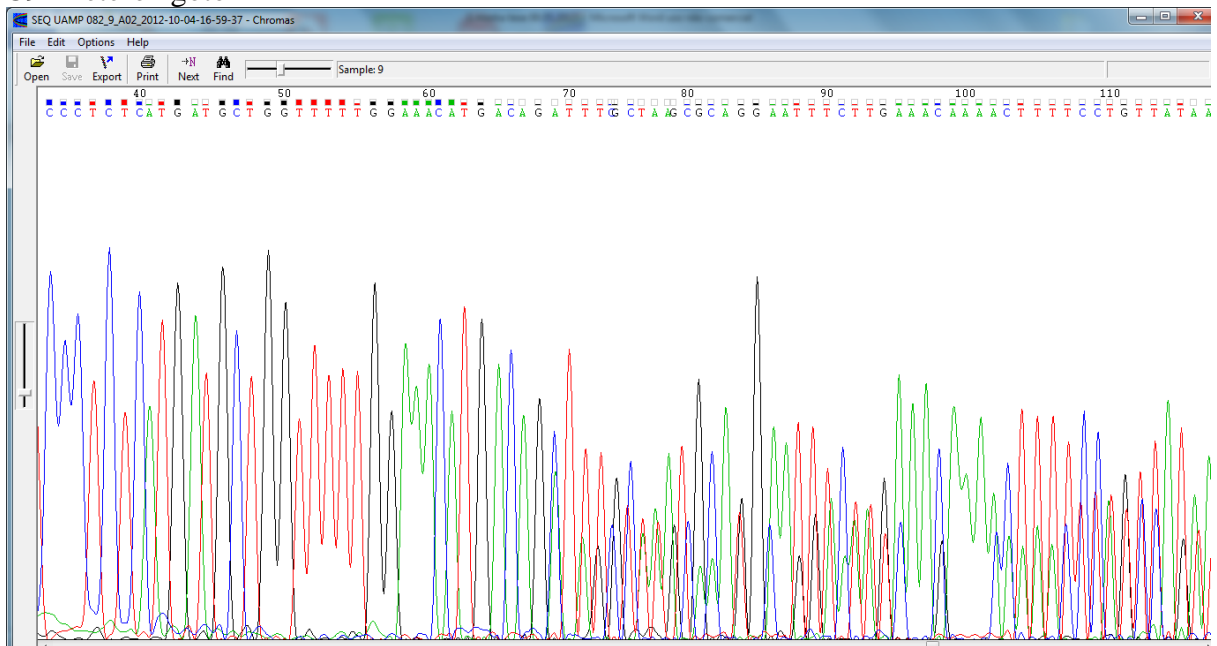
## C7 - heterozigoto



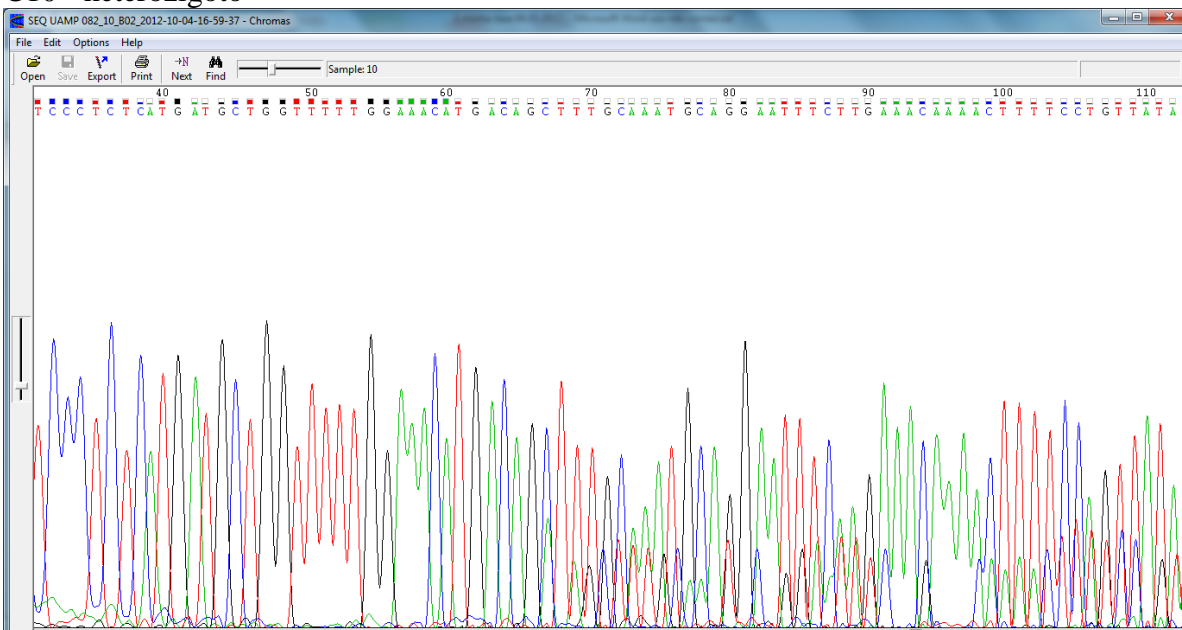
## C8 - heterozigoto



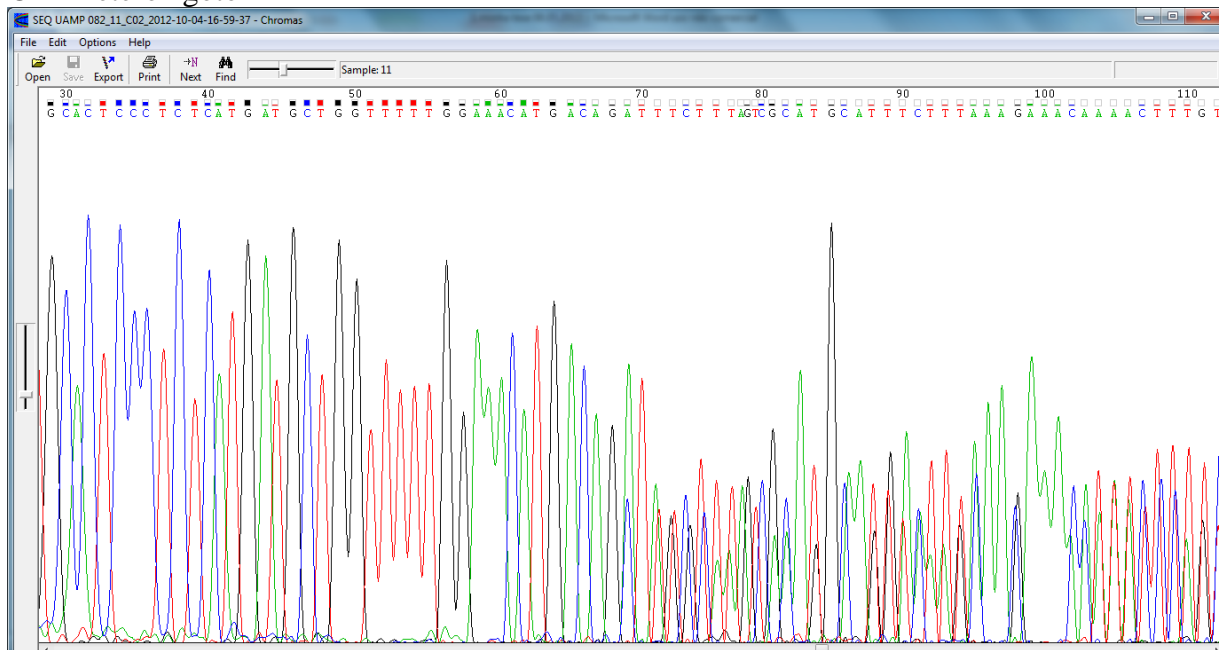
## C9 - heterozigoto



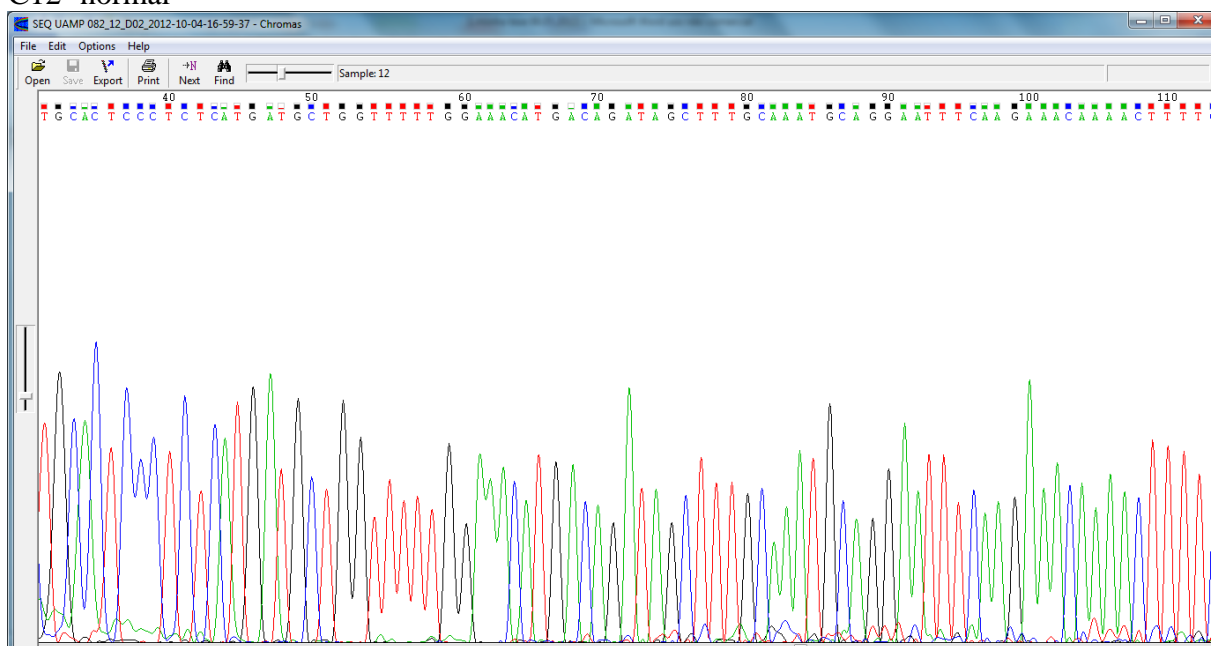
## C10 - heterozigoto



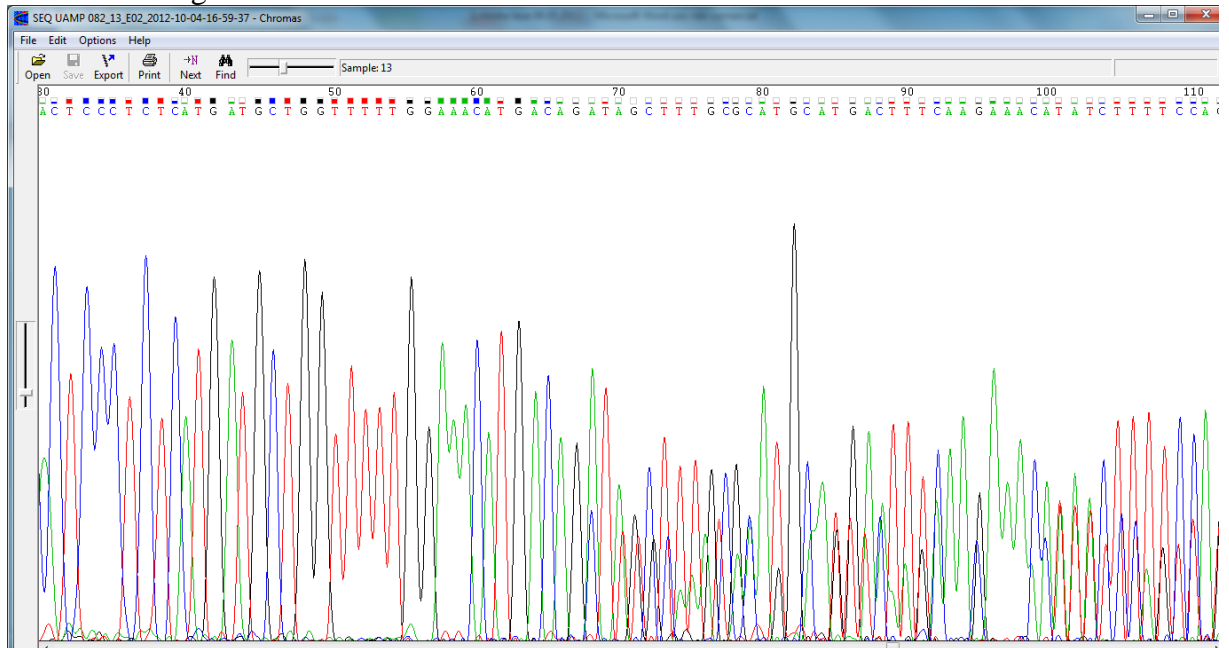
## C11- heterozigoto



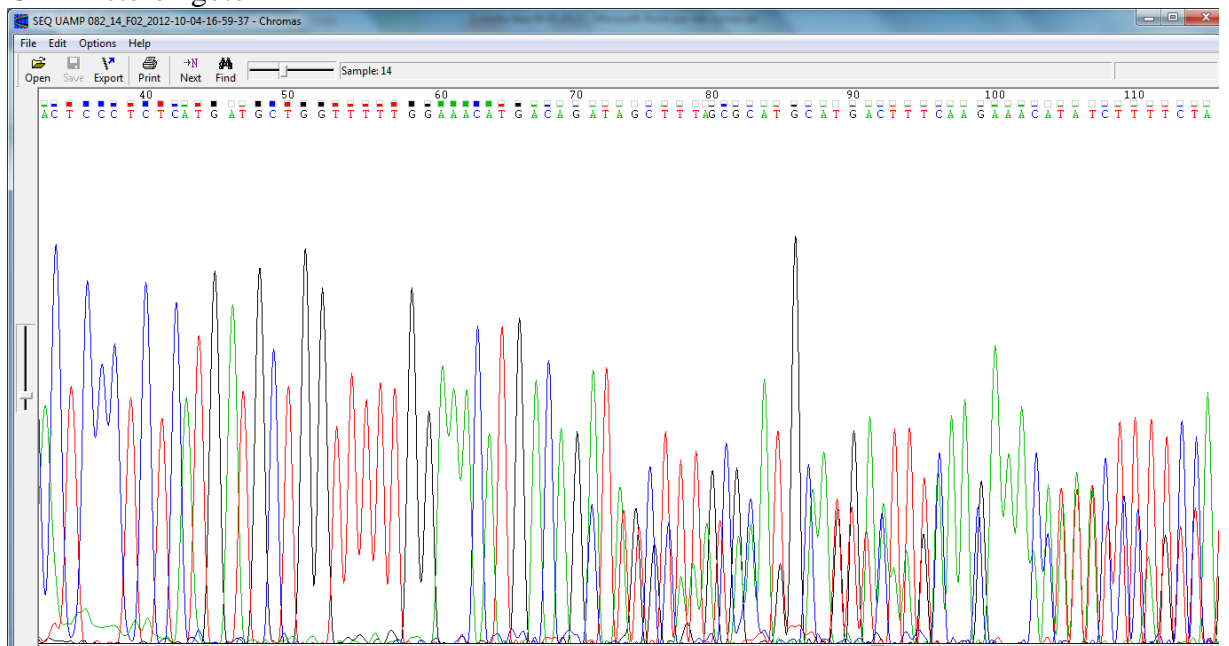
## C12- normal



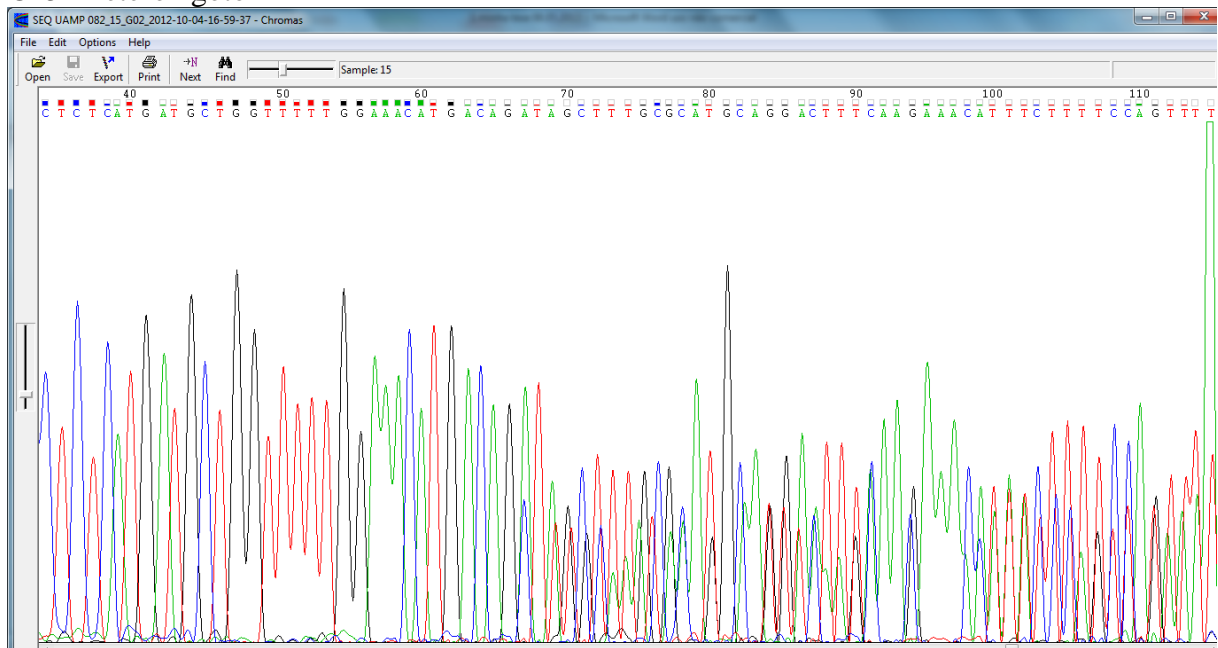
## C13 - heterozigoto



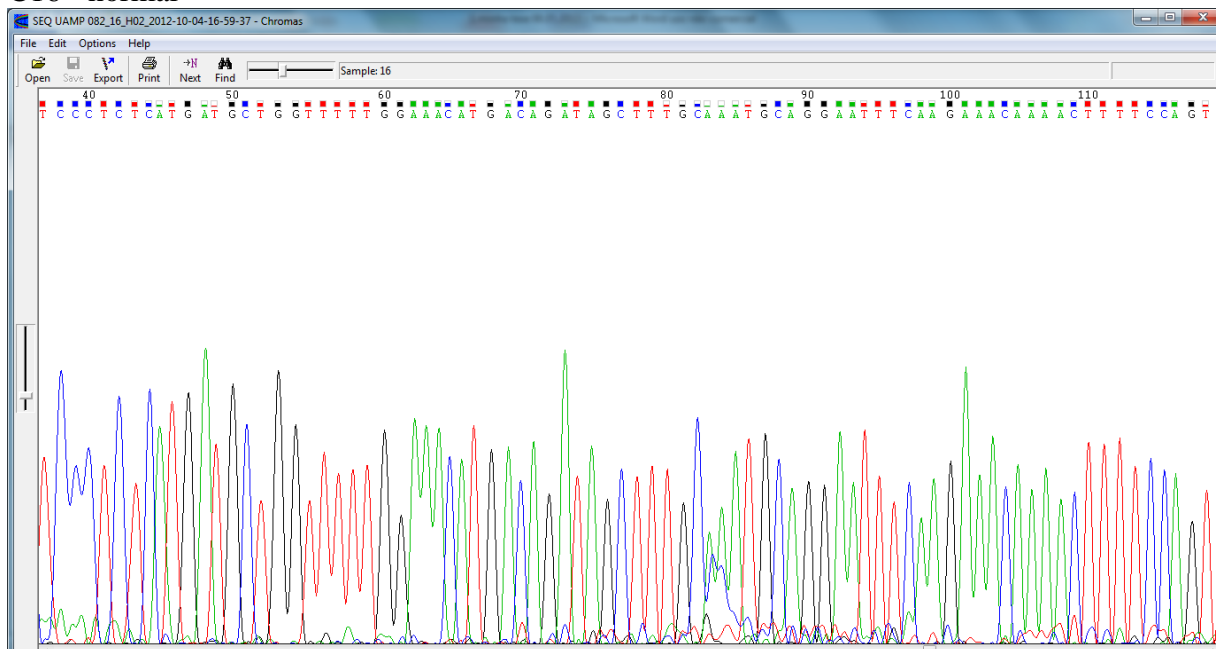
## C14 - heterozigoto



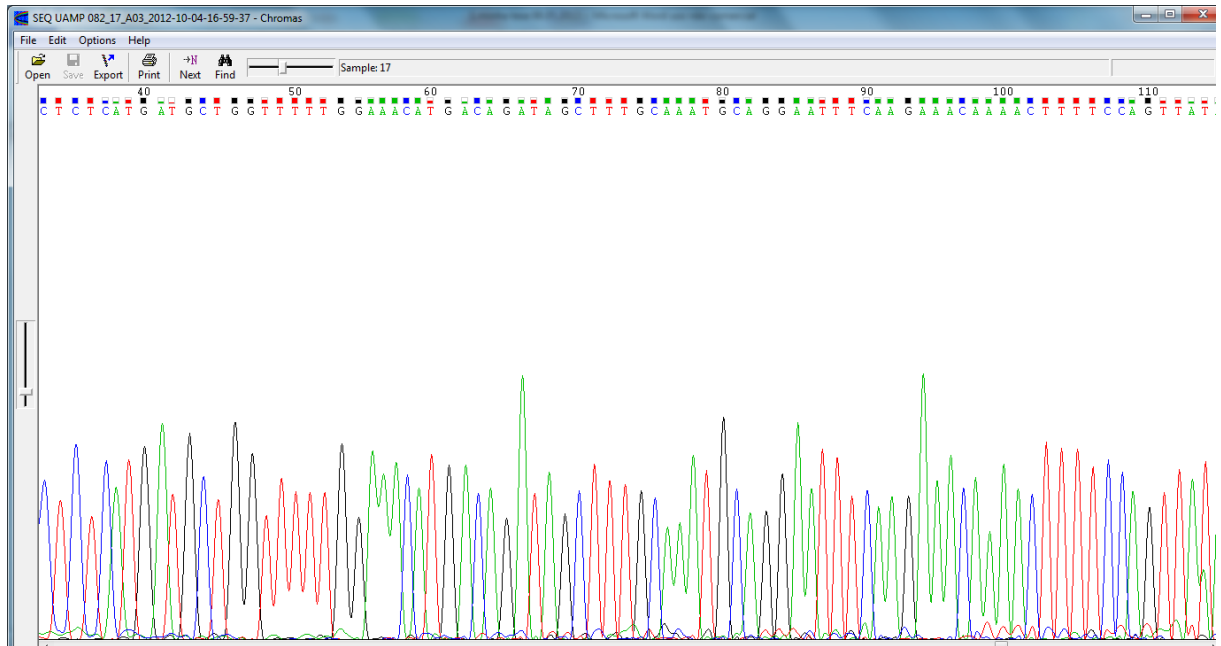
## C15 - heterozigoto



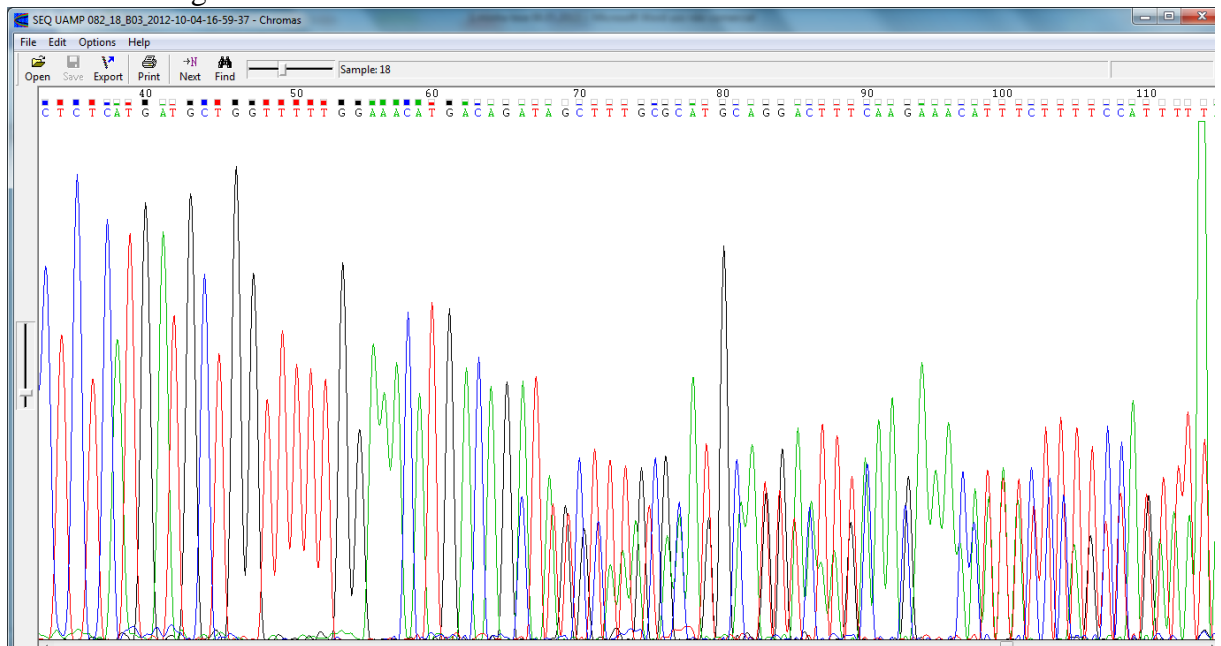
## C16 - normal



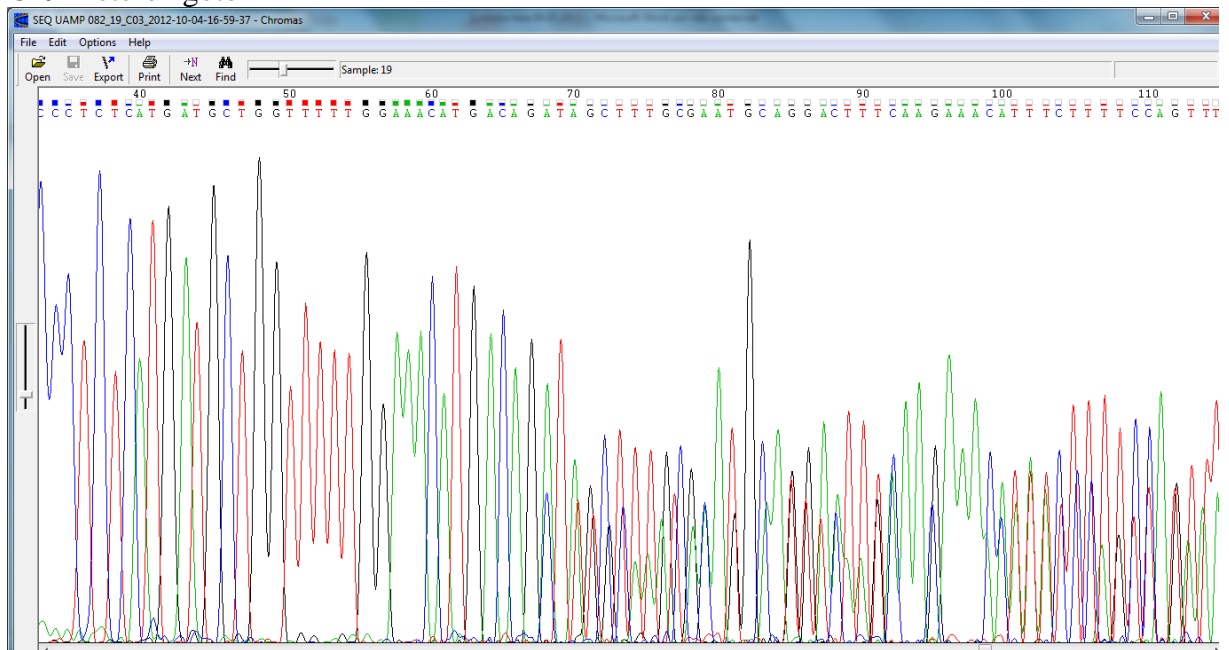
## C17 - normal



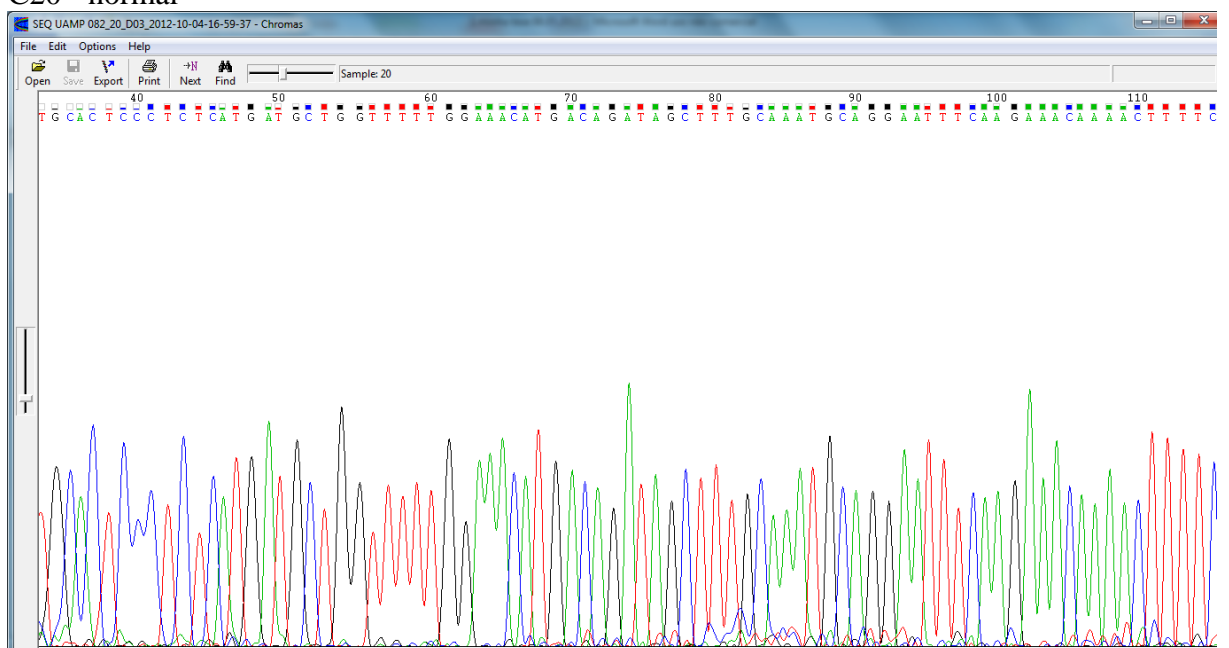
## C18 - heterozigoto



## C19- heterozigoto



## C20 - normal



**ANEXO C – Dados individuais das análises de amostras de soro coletadas após administração IV de 3 mg/kg de cloridrato de tramadol.**

Valores de concentração sérica (ng/mL) de tramadol após administração intravenosa na dose de 3 mg/kg em 4 cães.

<b>Tempo (h)</b>	<b>MÉDIA</b>	<b>DP</b>
<b>0,00</b>	1903,11	937,08
<b>0,08</b>	1626,56	829,20
<b>0,25</b>	907,61	185,20
<b>0,50</b>	543,74	104,21
<b>1,00</b>	311,29	78,65
<b>2,00</b>	166,45	74,40
<b>3,00</b>	87,40	37,09
<b>4,00</b>	53,30	18,21
<b>5,00</b>	40,95	12,63
<b>6,00</b>	26,98	17,56

DP= desvio padrão

Parâmetros farmacocinéticos calculados por abordagem não compartimental a partir de dados mensurados a partir de soro canino resultante da administração intravenosa de tramadol na dose de 3 mg/kg em 4 cães.

<b>Parâmetros PK</b>	<b>MÉDIA</b>	<b>DP</b>
<b><math>\lambda</math> (h-1) 4 ult</b>	0,40	0,13
<b>correl 4 ult</b>	0,94	0,05
<b><math>\lambda</math> (h-1)</b>	0,40	0,13
<b>t<sub>1/2</sub> (h)</b>	1,89	0,67
<b>ASC 0-t</b>	1056,90	305,70
<b>ASC extr</b>	84,92	86,20
<b>ASC 0-<math>\infty</math> (ng.h/mL)</b>	1141,82	314,86
<b>% EXTRAPOL</b>	7,33	6,54
<b>Cl (L/h/kg)</b>	2,78	0,73
<b>ASMC 0-t</b>	1493,60	471,78
<b>ASMC extr</b>	800,36	900,68
<b>ASMC 0-<math>\infty</math></b>	2293,96	1179,13
<b>MRTiv (hs)</b>	1,99	0,82
<b>Vd (L/kg)</b>	5,46	2,29



**ANEXO D - Valores médios de concentração sérica (ng/mL) de tramadol após administração oral cloridrato de tramadol de liberação prolongada. . Grupo 1 = animais homocigotos não mutantes (n=6); Grupo 2= animais heterocigotos para a mutação MDR1 nt230(del4) (n=11).em animais sem a mutação .**

Tempo (h)	GRUPO 1 NORMAL (MDR1+/+)		GRUPO 2 HETER. (MDR1+/-)	
	MÉDIA	DP	MÉDIA	DP
0,00	0	0	0	0
0,5	1,27	1,99	0,52	0,92
1	11	10,22	3,42	6,58
2	28,31	28,30	12,02	16,34
3	36,89	30,64	31,22	24,85
4	61,79	29,88	49,39	32,72
6	44,45	31,85	44,77	26,94
8	24,04	22,12	23,34	11,09
12	6,01	3,98	4,41	3,85
24	0,16	0,37	0,56	0,98

**ANEXO E - Parâmetros farmacocinéticos médios calculados por abordagem não compartimental a partir de dados mensurados a partir de soro canino resultante da administração oral de cloridrato de tramadol de liberação prolongada. Grupo 1 = animais homozigotos não mutantes (n=6); Grupo 2= animais heterozigotos para a mutação MDR1 nt230(del4) (n=11).**

ESTATÍSTICA										
GRUPO	N							Percentis		
	Valid		Média	Erro padrão	Desvio padrão	Mínimo	Máximo	25	50	75
$\lambda$ (h <sup>-1</sup> )	1,0	6	0,3075	0,04041	0,09898	0,12	0,38	0,2544	0,3390	0,3716
	2,0	11	0,3013	0,03746	0,12424	0,12	0,48	0,1990	0,3307	0,4054
t <sub>1/2</sub> (h)	1,0	6	2,6779	0,65962	1,61574	1,82	5,95	1,8654	2,0552	3,2185
	2,0	11	2,8159	0,44237	1,46719	1,44	5,81	1,7094	2,0957	3,4818
ASC <sub>0-∞</sub> (ng.h/mL)	1,0	6	362,0872	78,19836	191,54607	118,53	559,80	147,9787	412,6659	523,2470
	2,0	11	325,1455	47,71247	158,24435	66,17	676,03	234,1279	315,1100	397,3437
Cl (L/h)	1,0	6	86,3363	25,04002	61,33527	39,21	185,16	42,0108	55,8063	150,6093
	2,0	11	100,3343	26,33683	87,34937	34,48	352,28	58,6696	73,9805	99,5695
ASMC <sub>0-∞</sub>	1,0	6	2297,1266	627,90559	1538,04831	752,40	4588,87	990,2605	1878,4511	3858,4987
	2,0	11	2202,3125	332,89681	1104,09380	414,19	4259,95	1120,0393	2460,5368	2908,4603
Tmax	1,0	6	4,0000	0,51640	1,26491	2,00	6,00	3,5000	4,0000	4,5000
	2,0	11	4,7273	0,30424	1,00905	4,00	6,00	4,0000	4,0000	6,0000
Cmax	1,0	6	63,1283	13,61519	33,35026	18,28	94,41	23,9200	73,2000	94,0125
	2,0	11	58,0073	8,22870	27,29150	13,38	118,19	46,1000	56,4100	71,4400
F	1,0	6	0,2195							
	2,0	11	0,2331							
MRTns	1,0	6	6,3633	,89152	2,18377	4,12	9,02	4,6071	5,6428	8,9901
	2,0	11	6,7848	,53415	1,77158	4,78	10,48	5,6051	6,2591	7,4979