

Resumo

Este trabalho teve como objectivo desenvolver um modelo experimental para avaliação de inibição de COMT (catecol-O-metiltransferase) em ratos Wistar, utilizando microdiálise num leito vascular periférico como técnica de amostragem. As sondas de microdiálise foram inseridas na veia jugular de ratos (N=5), que foram sujeitos a 3 dias de ensaio, durante os quais os níveis de L-DOPA (L-3,4-dihidroxifenilalanina) e de 3OMD (3-O-metil-L-dopa) foram monitorizados (22 colheitas diárias). A quantificação de L-DOPA e 3OMD foi efectuada recorrendo à técnica de HPLC-ED (cromatografia líquida de alta pressão acoplada a detecção electroquímica). A inibição de COMT foi avaliada através de análise farmacocinética dos perfis de concentração de L-DOPA e de 3OMD livres em circulação sanguínea *versus* tempo. As doses 12 mg/kg L-DOPA e 3 mg/kg benserazida foram administradas por via oral diariamente, em simultâneo com veículo controlo (dia 1 e dia 3) ou 3 mg/kg de um inibidor de COMT (dia 2). A administração de nebicapone ou de entacapone resultou na diminuição de actividade de COMT, constatada pelo aumento da exposição sistémica de L-DOPA e pela redução dos níveis de 3OMD. Os efeitos do nebicapone e do entacapone, avaliados a partir dos níveis de 3OMD, indicam que há semelhanças entre a dose 3 mg/kg em ratos e a dose 200 mg no Homem. Contudo, os níveis de L-DOPA indicam que a eficiência dos referidos tratamentos é diferente entre ratos e humanos.

A aplicabilidade da técnica de microdiálise num leito vascular periférico para a avaliação de farmacocinética de L-DOPA e 3OMD foi comprovada através de estudos de recuperação das sondas. A recuperação das sondas de microdiálise mostrou-se independente da concentração de L-DOPA e de 3OMD (entre 200 e 4000 ng/mL), e independente do método de determinação *in vitro* (perda ou ganho). O desempenho das sondas *in vivo* foi idêntico ao *in vitro*. A recuperação *in vivo* foi elaborada através de retrodiálise dos referidos analitos, tendo-se obtido os valores 23.98 ± 5.61 % para L-DOPA e 27.08 ± 5.41 % para 3OMD (média \pm DP). A integridade das sondas durante o procedimento experimental foi evidenciada

pelos valores de recuperação obtidos que se apresentaram semelhantes antes e após um procedimento experimental *in vivo*.

Em conclusão, pode constatar-se que o modelo desenvolvido neste trabalho permite avaliar a eficácia de inibidores de COMT em estudos pré-clínicos. A microdiálise num leito vascular periférico permite que os estudos de farmacocinética de L-DOPA e de 3OMD em circulação sanguínea sejam realizados num curto período de tempo, minimizando os recursos materiais e humanos, e reduzindo a utilização de animais. Este modelo de farmacocinética é uma ferramenta de grande importância para a avaliação de inibidores de COMT em desenvolvimento, que poderão vir a ser incluídos em futuras terapêuticas da doença de Parkinson.

Abstract

The aim of this work was to develop a Wistar rat experimental model for evaluation of COMT (catechol-O-methyltransferase) inhibition, using *in vivo* microdialysis sampling. Microdialysis probes were inserted into the jugular vein of rats (N=5), which were L-DOPA (L-3,4-dihydroxyphenylalanine) and 3OMD (3-O-methyl-L-dopa) monitored over 3 experimental days (22 samples per day). L-DOPA and 3OMD quantification was performed using HPLC-ED (high pressure liquid chromatography coupled with electrochemical detection) technique. Evaluation of the COMT inhibition was based on blood circulating L-DOPA and 3OMD concentration-time profiles pharmacokinetic analysis, following daily oral administration of 12 mg/kg L-DOPA and 3 mg/kg benserazide concomitantly with control (day 1 and 3) or COMT inhibitor (day 2). Nebicapone and Entacapone administrations were found to inhibit COMT activity, by reducing the formation of 3OMD and extending of systemic exposure to L-DOPA. Nebicapone and entacapone effects, based on the levels of 3OMD levels suggested a similarity between 3 mg/kg in rats and 200 mg in humans. However, L-DOPA levels indicate that the efficiency of the treatments is different between rats and humans.

The applicability of microdialysis for L-DOPA and 3OMD pharmacokinetics evaluation was shown by recovery studies of the probes. Probe recoveries were independent of the L-DOPA and 3OMD concentrations (between 200 and 4000 ng/mL), and were not dependent of the *in vitro* recovery determination method (recovery or release). The *in vivo* and *in vitro* performances of the probes were equivalent. *In vivo* probe recoveries were determined by retrodialysis, and the values obtained were 23.98 ± 5.61 % for L-DOPA and 27.08 ± 5.41 % for 3OMD (average \pm SD). The integrity of the probes in the experimental procedure was shown by the obtained recovery values which were similar before and after an *in vivo* experimental procedure.

In conclusion, we can certify that the method developed in this work allow us to evaluate the efficacy of the COMT inhibitors in pre-clinical studies. Microdialysis permits that L-DOPA and 3OMD pharmacokinetic studies can be done in small periods of time, minimizing material and human resources, and reducing the usage of animals. This pharmacokinetic model is an important tool for the judgment of COMT inhibitors under development, which can be included in future therapeutically solutions for Parkinson's disease.