

FACULDADE DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE DO PORTO

e

BIAL – PORTELA & COMPANHIA – S. A.

Departamento de Investigação e Desenvolvimento

**Desenvolvimento de um modelo experimental de inibição de COMT,
com microdiálise em ratos Wistar**

António Leonel Reis da Silva Torrão

Licenciado em Biologia pela Universidade de Aveiro

Dissertação submetida para satisfação parcial dos
requisitos do grau de mestre

em

Engenharia Biomédica

Dissertação realizada sob a supervisão de
Professor Doutor Patrício Soares da Silva
do Instituto de Farmacologia e Terapêutica
da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Porto, Setembro de 2007

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 equivalents. *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.

AGRADECIMENTOS

É um prazer agradecer a ajuda e apoio de todos os que estiveram envolvidos no progresso deste projecto. Agradeço ao Professor Patrício Soares da Silva, orientador desta dissertação por todo o apoio, interesse e entusiasmo prestados durante a realização deste trabalho. Ao presidente do concelho de administração de BIAL – Portela & Companhia S. A., Dr. Luís Portela por me disponibilizar as instalações e o tempo necessários à realização deste trabalho. Ao Professor Amílcar Falcão pela realização dos cálculos dos parâmetros farmacocinéticos, que constituem uma parte importante deste trabalho. Gostaria de exprimir o meu sincero agradecimento aos meus colegas, no Laboratório de Investigação Farmacológica dos Laboratórios BIAL, em especial à Dra. Rita Machado, à Doutora Maria João Bonifácio e ao Doutor Nuno Palma pelo apoio, interesse, disponibilidade e colaboração que demonstraram em diversas etapas deste trabalho. À D. Lurdes Ferreira pelo cuidado e zelo que teve com os animais utilizados neste estudo.

Agradeço aos meus grandes amigos Alexandre Teixeira, Nuno Laranjo, Pedro Castelo Branco e Ricardo Neves que, apesar de estarem longe, proporcionaram sempre pequenos e essenciais momentos de descontração, hipóteses levantadas, discutidas e, às vezes, esquecidas.

A toda a minha família e, em especial, à minha avó que, pela grande cumplicidade e amizade, exerceu um papel fundamental na minha formação como ser humano.

Finalmente, gostaria de agradecer à minha mulher pela paciência, compreensão e presença contínua, e ao meu filho que, pela tenra idade, não pôde ajudar-me nem apoiar-me e, em muitos momentos, não permitiu que o trabalho avançasse, mas que merece o meu agradecimento pelo ensino de gestão do tempo. Sem vocês teria sido bem menos gratificante!

ÍNDICE

ABREVIATURAS	8
CAPÍTULO I	
INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS	9
1 Microdiálise	10
2 Considerações importantes na amostragem por microdiálise	12
2.1 Tipo de analitos	12
2.2 Tipo de colheita e a análise	12
2.3 Rigor na concentração do analito	13
2.4 Cirurgia, perturbações e resposta dos tecidos	14
3 Recuperação das sondas de microdiálise	15
3.1 Recuperação <i>in vitro</i>	15
3.2 Recuperação <i>in vivo</i>	16
3.2.1 Fluxo líquido zero	17
3.2.2 Retrodiálise	17
4 Microdiálise aplicada ao sangue e a outros tecidos	18
5 Inibidores de COMT e a doença de Parkinson	19
6 Objectivos	22
6.1 Objectivo geral	22
6.2 Objectivos específicos	22
CAPÍTULO II	
MATERIAL E MÉTODOS	23
1 Reagentes	24
2 Equipamento de laboratório	25
3 Software	25
4 Animais	26
5 Cirurgias	27
5.1 Implante da sonda de microdiálise na veia jugular	27
5.2 Cateterização da veia jugular	32
6 Estudos de recuperação das sondas de microdialise	34
6.1 Recuperação <i>in vitro</i>	34
6.1.1 Técnica de ganho	34
6.1.1.1 Influência do fluxo de perfusão	34
6.1.1.2 Influência da concentração dos analitos	34
6.1.2 Técnica de perda	35

6.2 Recuperação <i>in vivo</i>	35
7 Estudo de integridade das sondas de microdiálise	36
8 Concentração livre <i>versus</i> concentração total	36
9 Inibição de COMT – farmacocinética de L-DOPA e de 3OMD	37
10 Metodologia analítica para quantificação de L-DOPA e de 3OMD	40
10.1 Processamento de amostras	40
10.1.1 Plasma	40
10.1.2 Dialisado	40
10.2 Validação da metodologia analítica	40
10.2.1 Curvas padrão e controlos de qualidade	41
10.2.2 Selectividade	42
10.2.3 <i>Carryover</i>	42
10.2.4 Precisão e exactidão	42
10.2.5 Limites de quantificação e linearidade	43
10.2.6 Diluição	44
10.2.7 Recuperação	44
10.2.8 Estabilidade	45
10.3 Cromatografia e detecção	45
11 Análise farmacocinética	46
12 Análise estatística	47
CAPÍTULO III	
RESULTADOS	48
1 Validação da metodologia analítica para quantificação de L-DOPA e de 3OMD	49
1.1 Plasma	49
1.1.1 Selectividade	50
1.1.2 <i>Carryover</i>	50
1.1.3 Precisão e exactidão	50
1.1.3.1 Intra-lote	51
1.1.3.2 Inter-lote	52
1.1.3.3 Limites de quantificação e linearidade	53
1.1.4 Diluição	55
1.1.5 Recuperação	56
1.1.6 Estabilidade	57
1.2 Dialisado	59
1.2.1 Selectividade	60
1.2.2 <i>Carryover</i>	60
1.2.3 Precisão e exactidão	60

1.2.3.1 Intra-lote	61
1.2.3.2 Inter-lote	62
1.2.3.3 Limites de quantificação e linearidade	63
1.2.4 Diluição	65
1.2.5 Estabilidade	66
2 Estudos de recuperação das sondas de microdiálise	68
2.1 Recuperação <i>in vitro</i>	68
2.1.1 Influência do fluxo de perfusão	68
2.1.2 Influência da concentração dos analitos	70
2.1.3 Técnica de perda <i>versus</i> técnica de ganho	71
2.2 Recuperação <i>in vivo</i>	72
2.3 Integridade das sondas de microdiálise	73
2.4 Concentração livre <i>versus</i> concentração total	74
4 Inibição de COMT e farmacocinética de L-DOPA e de 3OMD	77
4.1 Nebicapone	78
4.1.1 L-DOPA	78
4.1.2 3OMD	80
4.2 Entacapone	83
4.2.1 L-DOPA	83
4.2.2 3OMD	85
4.3 Nebicapone <i>versus</i> Entacapone	87
4.3.1 L-DOPA	87
4.3.2 3OMD	89
CAPÍTULO IV	
DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	90
CAPÍTULO V	
REFERÊNCIAS	97

ABREVIATURAS

λz – constante de velocidade de eliminação (análise não-compartimental)

3OMD – 3-*O*-metil-L-dopa

a – ordenada na origem

AADC – descarboxilase dos L-amino-ácidos aromáticos

AUC – área sob a curva das concentrações ao longo do tempo

AUC_{0-∞} – área sob a curva das concentrações desde o tempo zero até ao infinito

AUC_{0-t} – área sob a curva das concentrações desde o tempo zero até ao tempo *t*

C_{max} – valor máximo de concentração de um analito

COMT – catecol-*O*-metiltransferase

CV – coeficiente de variação

ECF – fluído extracelular

FELASA – *Federation of European Laboratory Animal Science Associations*

HPLC – cromatografia líquida de alta pressão

HPLC-ED – cromatografia líquida de alta pressão acoplada a detecção electroquímica

L-DOPA – L-3,4-dihidroxifenilalanina

LLOQ – limite mínimo de quantificação

m – declive

MD – microdiálise

N – tamanho da amostra

NA – não aplicável

NC – não calculado

PCA – ácido perclórico

PVP – polivinilpirrolidona

R – coeficiente de correlação

ER – erro relativo

TA – temperatura ambiente

SAM – s-adenosil-L-metionina

DP – desvio padrão

EPM – erro padrão da média

t_{1/2} – tempo de semi-vida

t_{max} – tempo a que ocorre o valor máximo de concentração de um analito

ULOQ – limite máximo de quantificação

CAPÍTULO I
INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS

1 Microdiálise

A microdiálise (MD) é uma técnica de amostragem *in vivo* adequada para medir e monitorizar as concentrações livres de fármacos e substâncias endógenas em fluidos biológicos.

A técnica consiste em mimetizar a função de um capilar sanguíneo, em que uma sonda de diálise é implantada no referido tecido e perfundida com um líquido fisiológico. Um gradiente de concentração é criado entre o fluido extracelular (ECF) e o interior da sonda de MD, levando à difusão das substâncias de interesse do ECF para a sonda de MD, obtendo-se o dialisado. O princípio de funcionamento de uma sonda de MD está representado no esquema da figura 1. O dialisado é analisado quimicamente e reflecte, ao longo do tempo, a composição do ECF (De la Penã e col., 2000).

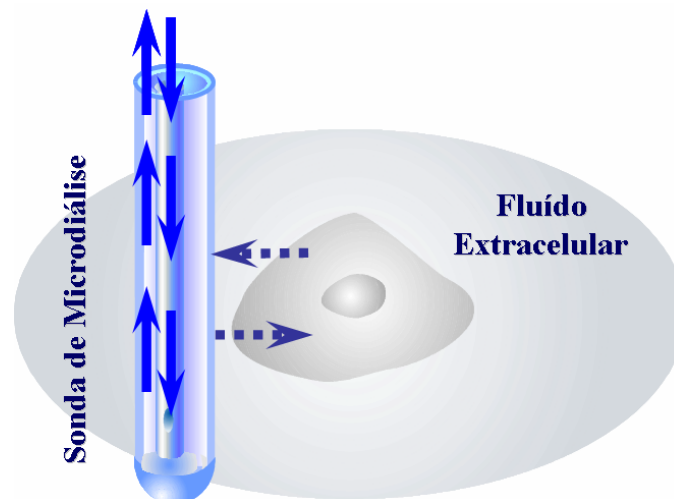


Figura 1: Funcionamento de uma sonda de MD. Fonte: adaptado da referência (CMA/Microdialysis, 2003).

A MD é um processo de difusão controlada e o transporte dos compostos é conseguido graças ao gradiente de concentração entre o ECF e o fluido no lúmen da sonda. Os compostos difundem-se para dentro (recuperação) ou para fora (libertação) do lúmen da sonda.

A amostragem por MD é conseguida pelo implante de uma sonda (que consiste numa membrana de diálise) num órgão ou num fluido biológico de interesse. Uma solução, chamada de perfusado, é bombeada lentamente através da sonda. O perfusado é uma solução aquosa com uma composição iónica e um pH o mais similar possível à matriz da amostra circundante. Se o dialisado for idêntico à matriz da amostra, não haverá troca de iões ou água através da membrana

de diálise.

A farmacocinética refere-se à criação de modelos e à descrição matemática do processo cinético de disponibilização dos fármacos a todo o organismo: absorção, distribuição, biotransformação (Klaassen e Watkins III, 2001). Neste tipo de estudos, a utilização da MD, minimiza muitos dos problemas associados aos métodos convencionais de amostragem que medem as concentrações totais de um fármaco. A MD (i) permite determinar a concentração da fracção livre de um fármaco, fracção esta de grande importância, já que é a responsável pela acção terapêutica, (ii) é considerada uma técnica "limpa" de amostragem *in vivo*, uma vez que permite a colheita do ECF com a exclusão das macromoléculas (Weiss e Lunte, 2000), (iii) possibilita o monitorização simultânea, em mais do que um tecido ou órgão, com o mínimo de lesão tecidual, (iv) e permite a avaliação simultânea de várias substâncias no mesmo local ou em diferentes locais do organismo do mesmo animal (Johansen e col., 1997). Assim, a técnica de MD que era inicialmente utilizada em neurociências para a quantificação de neurotransmissores no sistema nervoso central, rapidamente viu a sua utilização ampliada a estudos farmacocinéticos, monitorizando concentrações de fármacos noutros órgãos e tecidos, entre os quais, os tecidos muscular e adiposo, o fígado, os pulmões, os rins, o tracto gastrointestinal e o sangue (Benveniste e Hüttemeier, 1990).

2 Considerações importantes na amostragem por microdiálise

Segundo De la Peña e col. (2000), a MD não tem limitações quanto ao número de amostras que podem ser obtidas, uma vez que não há perda do fluido corporal, ao contrário das técnicas convencionais que envolvem a colheita de fluidos e que limitam o número de amostras especialmente em pequenos animais (Weiss e Lunte, 2000).

A amostragem por MD quando aplicada à farmacocinética e ao metabolismo apresenta, como qualquer técnica, algumas limitações e considerações importantes a serem avaliadas previamente à sua aplicação.

2.1 Tipo de analitos

A maioria das membranas de MD é permeável a compostos hidrofílicos de baixo peso molecular, fazendo destes compostos os candidatos ideais para os estudos de MD. Os analitos que são muito hidrofóbicos, que se encontram ligados a proteínas ou com pesos moleculares elevados que estão perto do limite *cut-off* da membrana de diálise, não são no entanto apropriados para esta técnica (Davies, 1999).

2.2 Tipo de colheita e a análise

Nos estudos de MD, o compromisso entre o fluxo de perfusão, a recuperação do analito e a resolução temporal tem que ser cuidadosamente considerado. Uma vez que a recuperação relativa do analito está inversamente correlacionada com o fluxo de perfusão (Elmqvist e Sawchuk, 1997), é desejável que a perfusão ocorra a fluxos muito baixos (0.1-1 $\mu\text{L}/\text{min}$) para que se obtenham concentrações elevadas do analito nas amostras. A estes fluxos, o método analítico tem que ser capaz de acomodar pequenos volumes de amostra, para que possibilite uma adequada resolução temporal. Embora o pequeno volume de amostra associado aos estudos de MD crie novos desafios analíticos, o aumento da resolução temporal é uma distinta vantagem em relação aos métodos clássicos de colheita nos estudos *in vivo*.

A complexidade das amostras biológicas faz com que o seu processamento e análise requeiram técnicas de análise avançadas.

A cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) é uma técnica cromatográfica de separação em que os componentes de uma amostra podem ser separados, pela passagem de um solvente (onde a amostra é diluída) – fase móvel – através de uma coluna cromatográfica. Assim, a separação dos referidos componentes acontece devido às suas interações com a fase móvel e a

fase estacionária (contida na coluna cromatográfica). O mecanismo pelo qual se produz a separação cromatográfica depende da fase móvel e, principalmente da fase estacionária: partição entre ambas as fases, adsorção com a fase estacionária, troca iónica, etc. Um componente da amostra permanece mais ou menos tempo retido na coluna cromatográfica, em função da sua interacção com ambas as fases, sendo a sua separação determinada pelo chamado tempo de retenção (Skoog e col., 1996).

O tipo separação cromatográfica adoptado neste trabalho foi o da cromatografia de fase reversa. Neste tipo de cromatografia, a fase estacionária é apolar, enquanto que a fase móvel é polar (um solvente aquoso). Deste modo, os componentes apolares da amostra ficam retidos na coluna durante mais tempo e separam-se dos componentes mais polares que eluem mais rapidamente. Neste tipo de cromatografia, quando a composição da fase móvel não é modificada com o tempo, diz-se que a separação se realiza em condições isocráticas (Skoog e col., 1996).

Uma vez separados, torna-se necessário que os componentes de uma amostra sejam detectados. Há vários tipos de detectores, entre os quais o espectrofotómetro, o espectrómetro de massas, o espectrofluorímetro e o detector electroquímico. O registo resultante da separação dos diferentes componentes da amostra, em função do tempo, na saída da coluna cromatográfica e após a sua passagem pelo sistema de detecção, dá origem ao cromatograma (Skoog e col., 1996).

A escolha da técnica de separação e do sistema de detecção, em particular, depende das características das moléculas a analisar.

2.3 Rigor na concentração do analito

A determinação de um valor absoluto para a concentração do analito livre no ECF requer um estudo da recuperação relativa da sonda – Calibração da sonda.

A necessidade experimental determina quão rigoroso o método de calibração terá que ser. Para muitos estudos *in vivo*, não há a necessidade da determinação da concentração do analito no ECF, e é suficiente a determinação da variação da concentração do mesmo. Quando a MD é usada para monitorizar a resposta de compostos endógenos a um dado estímulo (ou formulação), os níveis anteriores e posteriores ao estímulo podem ser comparados sem necessidade de calibração da sonda.

Nos casos em que a determinação exacta da concentração do analito no ECF é necessária, é requerida uma calibração rigorosa da sonda *in vivo*. A calibração *in vitro* pode ser usada e aplicada para o cálculo das medições *in vivo*, unicamente nos casos em que a difusão do analito

no tecido de interesse é suficientemente alta, para mimetizar a situação *in vitro*. Esta situação aplica-se ao caso da monitorização de fluidos biológicos como a bÍlis ou sangue (Stenken e col., 1993). A recuperação de um analito do ECF de um tecido como o cérebro, fÍgado ou músculo, é tipicamente mais baixo do que a recuperação *in vitro*, uma vez que no tecido o analito atravessa um caminho mais tortuoso antes de se difundir pela membrana de MD.

Os estudos de validação e calibração das sondas de MD efectuados por Telting-Diaz e col. (1992) e Deleu e col. (1995) evidenciaram que a concordância entre a amostragem por MD e a colheita de sangue tem sido muito boa.

2.4 Cirurgia, perturbações e resposta dos tecidos

A implantação de sondas de MD requer grande experiência no manuseamento animal e habilidade cirúrgica. Alguns locais alvo exigem o mínimo de distúrbios nos tecidos envolventes e requerem o mínimo de tempo de recuperação do animal.

A implantação da sonda na derme ou no músculo-esquelético é menos invasiva e requer menos destreza do que a implantação no cérebro ou na veia jugular. As cirurgias mais invasivas requerem um maior tempo de recuperação, para assegurar que as medições estão a ser efectuadas num animal “saudável”.

A colocação e a presença da sonda de MD provocam uma resposta inflamatória por parte dos tecidos. A resposta inflamatória segue um mesmo padrão geral para a maioria dos tecidos, independentemente do agente invasivo ou da lesão mecânica que a provoca. Sinais como edema, pequenas hemorragias e a presença de leucócitos em redor da sonda foram verificados até ao segundo dia de implantação em tecidos cerebrais. Os macrófagos aparecem 2 a 3 dias após a inserção da sonda. As perturbações do tecido no local da sonda são geralmente consideradas mínimas (Davies, 1999).

Os estudos de MD, de longa duração, no sangue e noutros tecidos, parecem sugerir uma estabilização rápida e permanente das sondas, mantendo o mesmo comportamento ao longo do tempo. Esta estabilização observada pode ser devido à imediata deposição de proteínas na membrana, depois da inserção da sonda. Stenken (1999) demonstrou que a diferença entre as recuperações *in vitro* antes e após o implante de uma sonda na veia jugular de um rato é menor do que 5%.

3 Recuperação das sondas de microdiálise

A determinação da capacidade de recuperação da membrana da sonda de MD é uma das dificuldades encontradas nesta técnica, uma vez que é influenciada por muitos factores, entre os quais o fluxo de perfusão, a área superficial da membrana, a temperatura e as propriedades do líquido de perfusão e do fármaco sob investigação (Benveniste e Hüttemeier, 1990). O pH e a isotonicidade do líquido de perfusão devem ser considerados e devem mimetizar os líquidos intersticiais (Davies, 1999).

O fluxo de perfusão deve ser avaliado e estabelecido previamente, uma vez que fluxos muito altos podem romper as membranas de MD, enquanto fluxos muito baixos podem remover grandes quantidades do soluto de interesse do local analisado, provocando mudanças extremas nos processos fisiológicos locais (Johansen e col., 1997). O fluxo de trabalho, geralmente, varia de 1 a 5 $\mu\text{L}/\text{min}$, sendo 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ o mais comum.

A MD trabalha em condição *sink*. A condição *sink* é um estado de ausência de equilíbrio, entre as concentrações dos meios externo e interno. Esta condição obtém-se pela renovação constante do líquido perfundido através da membrana. Assim, a concentração do fármaco dialisado representa uma fracção da concentração livre no ECF. O conhecimento da recuperação relativa das sondas de MD é um pré-requisito para o cálculo das concentrações extracelulares do fármaco no tecido (De la Penã e col., 2000). A recuperação relativa é definida como a fracção da concentração do composto de interesse no dialisado e pode ser determinada *in vitro* ou *in vivo* (Benveniste e Hüttemeier, 1990).

3.1 Recuperação *in vitro*

A recuperação das sondas de MD, *in vitro*, pode ser determinada através da técnica de recuperação por ganho ou por perda.

Na técnica de recuperação por ganho, a sonda é inserida num recipiente com uma solução da substância de interesse com concentração conhecida, sob temperatura e agitação controladas. O dialisado é quantificado, determinando-se a taxa de ganho do fármaco pela sonda através da equação 1:

$$RR_{gan} = \frac{C_{dial}}{C_{in}} \quad (1)$$

onde RR_{gan} é a recuperação relativa por ganho da sonda, C_{dial} é a concentração da substância no dialisado e C_{in} é a concentração da substância no recipiente (Weiss e Lunte, 2000).

Na técnica de recuperação por perda, a sonda é inserida num recipiente com uma solução sem a substância em estudo e perfundida com uma solução da mesma substância com concentração conhecida. A taxa de recuperação por perda é calculada através da equação 2:

$$RR_{\text{per}} = \frac{C_{\text{in}} - C_{\text{dial}}}{C_{\text{in}}} \quad (2)$$

onde RR_{per} é a recuperação relativa por perda da sonda, C_{dial} é a concentração da substância no dialisado após a passagem pelo meio e C_{in} é a concentração da substância no líquido de perfusão (Weiss e Lunte, 2000).

3.2 Recuperação *in vivo*

Nos órgão ou tecidos, a tortuosidade, o transporte microvascular e a eliminação activa do fármaco através de metabolização podem alterar o transporte do mesmo do meio intersticial para a sonda de MD. Benveniste (1989) demonstrou que a recuperação relativa *in vitro* não é sempre uma estimativa fiável da recuperação *in vivo*, devido à diferença da matriz onde se encontra o fármaco. A complexidade da matriz biológica faz com que, a recuperação *in vivo* seja geralmente menor ou, no máximo, igual àquela observada *in vitro*. Esta diferença torna-se mais marcante quando o tecido ou órgão avaliado possui algum tipo de patologia que possa alterar, de modo substancial, as suas características e o aporte de substâncias para a biofase sob investigação.

A diferença entre as recuperações *in vitro* e *in vivo* das sondas faz com que haja a necessidade de se avaliar a capacidade de recuperação das mesmas, sob condições semelhantes àquelas que serão utilizadas em cada desenho experimental (Benveniste e Hüttemeier, 1990).

A recuperação das sondas *in vivo* é, normalmente, efectuada através da técnica (i) do método do fluxo líquido zero ou (ii) por retrodiálise (Elmqvist e Sawchuk, 1997).

3.2.1 Fluxo líquido zero

No método referido como método do fluxo líquido zero (*no net flux*), desenvolvido por Lönnroth e col. (1987), a recuperação da sonda *in vivo* é estimada através da perfusão do soluto de interesse em diversas concentrações, mantendo-se a concentração do ECF constante. Esta situação é obtida pela administração do fármaco sob a forma de infusão contínua, que garante concentrações constantes no plasma e nos tecidos - *steady state*. Após atingido o *steady state*, perfunde-se a sonda de MD com soluções com diferentes concentrações do fármaco de interesse. Quando o valor da concentração do perfundido for igual a do dialisado (i.e. *no net flux*), este reflecte a concentração livre do fármaco no ECF. A estimativa do fluxo líquido zero por regressão linear gera uma recta (concentração recuperada menos concentração no líquido de perfusão \times concentração no líquido de perfusão), cujo declive representa a recuperação relativa da membrana de MD.

O valor real das concentrações livres dos fármacos no ECF é obtido, usando os valores das suas concentrações nas amostras de dialisado, considerando a taxa de recuperação de cada sonda usada nas amostragens por MD.

3.2.2 Retrodiálise

A retrodiálise é definida como a perda difusa de moléculas do líquido de perfusão para o ambiente envolvente da sonda, em condições *sink*. O líquido de perfusão, na técnica de retrodiálise, contém uma concentração conhecida do fármaco ou de um análogo (calibrador) e essa concentração é nula no líquido intersticial. Neste método, assume-se que a taxa de perda relativa do fármaco é idêntica à sua taxa de recuperação por ganho, durante uma MD normal. A recuperação e a perda de um soluto são funções da permeabilidade efectiva da membrana de MD, e reciprocamente, relacionadas com a resistência desta à sua difusão (Elmqvist e Sawchuk, 1997). Assim, admite-se que a difusão é bidireccional e linear (Stenken, 1999). A retrodiálise é uma versão simplificada do modelo fluxo líquido zero, sendo a recuperação determinada através da equação 2.

4 Microdiálise aplicada ao sangue e a outros tecidos

Na generalidade dos estudos de farmacocinética, a concentração dos fármacos nos tecidos é estimada a partir da concentração dos mesmos no plasma. Alternativamente, os níveis absolutos dos fármacos nos tecidos podem ser obtidos pela análise dos referidos tecidos, colhidos após sacrifício de um ou mais animais, a cada tempo de um estudo farmacocinético.

A MD tem sido aplicada em estudos de farmacocinética de levodopa (L-DOPA) e de 3-*O*-metil-L-dopa (3OMD). Esta técnica tem sido usada, nos tecidos e no sangue, em simultâneo com os métodos de clássicos de colheita. O estudo elaborado, em cães anestesiados, por Deleu e col. (1994) é um exemplo em que a MD foi usada para monitorizar a L-DOPA e a 3OMD, no plasma e no músculo-esquelético, simultaneamente. Noutro estudo de farmacocinética de L-DOPA, Sarre e col. (1995) compararam os resultados obtidos por colheitas seriadas de sangue, com os obtidos por MD. Neste estudo verificou-se uma igualdade entre os dois conjuntos de dados. Num terceiro estudo, Deleu e col. (1995), usaram a MD no sangue e no músculo-esquelético de cães, para determinar o efeito do pré-tratamento com carbidopa e entacapone, na farmacocinética de L-DOPA. Zhang e col. (2003), mais recentemente, também usaram a técnica de MD para estudar a concentração de L-DOPA no plasma e no ECF do estriado de macaco.

Além de L-DOPA e de 3OMD, a MD é utilizada para a determinação de múltiplas substâncias endógenas, como o glicerol e o lactato (De la Penã e col., 2000), substâncias exógenas como antibióticos (Dalla Costa e col., 1998; Joukhadar e col., 2001; Tegeder e col., 2002; Bellmann e col., 2004).

A MD é uma técnica cada vez mais procurada e usada nas ciências biomédicas pela sua grande aplicabilidade, versatilidade e eficiência nestas áreas de estudo.

5 Inibidores de COMT e a doença de Parkinson

A doença de Parkinson é uma doença neurodegenerativa relacionada com a idade e que afecta aproximadamente 1% das pessoas com mais de 60 anos de idade. Esta doença é caracterizada pela degeneração selectiva dos neurónios que produzem dopamina, particularmente na via nigroestriatal que se projecta para os núcleos caudado e putamen, afectando o controlo motor. Apesar de, na última década, ter havido a introdução de novos fármacos para o tratamento da doença de Parkinson, a terapia mais eficaz continua a ser a administração de L-DOPA, o precursor imediato de dopamina (Olanow e col., 2001). Para prevenir a metabolização periférica de L-DOPA em dopamina pela enzima descarboxilase dos L-amino-ácidos aromáticos (AADC), a L-DOPA é normalmente administrada combinada com benserazida ou carbidopa (inibidores de AADC). No entanto, nestas condições, a L-DOPA é convertida em 3OMD pela enzima catecol-*O*-metiltransferase (COMT) e somente 1/10 da dose administrada consegue atingir o cérebro (Nutt e Fellman, 1984).

Na doença de Parkinson, a utilização de inibidores de COMT faz parte de algumas terapêuticas mais usadas, sendo os referidos compostos combinados com L-DOPA/benserazida ou L-DOPA/carbidopa. As principais razões para este tipo de terapêutica são (i) aumentar a disponibilidade de L-DOPA no cérebro, inibindo a *O*-metilação periférica de L-DOPA, (ii) promover o transporte de L-DOPA através da barreira hemato-encefálica, uma vez que a 3OMD compete com a L-DOPA no transporte para o cérebro (Gomes e Soares-da-Silva, 1999) e (iii) reduzir flutuações dos níveis de L-DOPA no plasma e no cérebro, evitando a exposição a concentrações, alternadamente, altas e baixas de dopamina nos receptores cerebrais de dopamina (Olanow e col., 2001).

A COMT, inicialmente descrita por Axelrod e Tomchick (1958), cataliza a transferência de um grupo metilo da *s*-adenosil-L-metionina (SAM) para um grupo hidroxilo de um substrato catecólico, na presença de magnésio. Os produtos da reacção são catecois *O*-metilados e *s*-adenosil-homocisteína (Guldberg e Marsden, 1975). Os substratos da COMT compreendem uma grande variedade de derivados catecólicos endógenos e exógenos, nomeadamente, as catecolaminas, os seus metabolitos hidroxilados, catecolestrogénios, ácido ascórbico e fármacos (Guldberg e Marsden, 1975; Männistö e col., 1992; Zhu e col., 2000). O papel fisiológico mais importante da reacção de *O*-metilação é a inactivação de grupos catecólicos tóxicos ou biologicamente activos e que tem particular relevância nos doentes de Parkinson, devido à metilação de L-DOPA em 3OMD, (Sharpless e McCann, 1971; Männistö e Kaakkola, 1990).

A procura e o desenvolvimento de inibidores de COMT começaram no final da década de 50, após a primeira purificação e caracterização da enzima (Axelrod e Tomchick, 1958). Desde então, foram descritas várias classes de inibidores de COMT, que podem ser agrupados por “gerações”, de acordo com aos seus diferentes mecanismos de acção e por terem surgido em alturas diferentes.

Na primeira “geração” de compostos inibidores de COMT, estes continham grupos catecol e eram substratos tipicamente competitivos. A quercetina, o catecol, o ácido gálico, a tropolona e o ácido ascórbico são alguns exemplos da “primeira geração” de compostos inibidores da COMT (Guldberg e Marsden, 1975).

Nos finais dos anos 80, o interesse pela COMT como alvo terapêutico ganhou mais adeptos com a descoberta da segunda “geração” de compostos inibidores daquela enzima – inibidores de COMT nitrocatecólicos. Os compostos mais conhecidos desta geração são o nitecapone, o entacapone, o nebicapone e o tolcapone (Bäckström e col., 1989; Borgulya e col., 1989; Learmonth e col., 2002). Os inibidores de COMT da segunda geração, embora tendo-se mostrando substratos pobres para a enzima, apresentam um comportamento competitivo em relação aos substratos catecólicos e um comportamento não competitivo relativamente à SAM (Schultz e Nissinen, 1989). Estes novos inibidores mostraram maior selectividade para a COMT do que para as outras enzimas envolvidas no metabolismo das catecolaminas, como a tirosina-hidrolase, dopamina- β -hidroxilase, AADC ou monoaminoxidase (Schultz e Nissinen, 1989).

Os inibidores de COMT desenvolvidos clinicamente, até hoje, são o tolcapone e o entacapone. O tolcapone foi retirado do mercado europeu, devido à sua hepatotoxicidade. Nenhum caso de disfunção hepática tem sido atribuído ao entacapone, mas a sua eficácia, como adjunto de L-DOPA, é geralmente considerada menor do que a do tolcapone (Lambert e Waters, 2000; Factor e col., 2001). Outra diferença entre o tolcapone e o entacapone é que o primeiro atravessa a barreira hemato-encefálica e inibe a COMT, tanto na periferia como no cérebro, enquanto que o entacapone é um inibidor selectivo da COMT periférica (Männistö, 1994).

O nebicapone é um inibidor recente da COMT actualmente em desenvolvimento, nos laboratórios BIAL (Portela & C^a, S. A.). Alguns estudos em animais de laboratório têm demonstrado que o nebicapone é muito mais potente a inibir a COMT na periferia do que no cérebro (Learmonth e col., 2002; Bonifacio e col., 2003). Em homogeneizados de fígado de ratos administrados com nebicapone, tolcapone ou entacapone, a potência do nebicapone foi equivalente à do tocapone na inibição da COMT, tendo sido esta inibição mais intensa e mais

prolongada do que com o entacapone (Learmonth e col., 2002). Em t_{max} , a inibição de COMT do fígado pelo nebicapone foi semelhante à do tolcapone, mas o nebicapone foi claramente menos potente a inibir a COMT cerebral (Learmonth e col., 2002).

Tem sido demonstrado que os inibidores de COMT alteram o metabolismo de L-DOPA e potenciam, com eficácia, a acção de L-DOPA administrada em conjunto com um inibidor de AADC. De facto, os níveis de 3OMD são significativamente reduzidos e a biodisponibilidade de L-DOPA no plasma é aumentada, quando são administrados o entacapone (Nissinen e col., 1992), o tolcapone (Zurcher e col., 1990a; Zurcher e col., 1990b; Borgulya e col., 1991) ou o nebicapone (Parada e col., 2001; Parada e Soares-da-Silva, 2003; Soares-da-Silva e col., 2003).

6. Objectivos

6.1 Objectivo geral

Desenvolvimento de um modelo experimental de inibição de COMT para a avaliação do perfil farmacocinético de L-DOPA e de 3OMD, em ratos Wistar em livre movimento, através de MD implantada na veia jugular.

6.2 Objectivos específicos

- Adaptar e validar a metodologia analítica por cromatografia líquida de alta pressão acoplada a detecção electroquímica (HPLC-ED), para quantificação de L-DOPA e de 3OMD em amostras biológicas (plasma e dialisado);
 - Estudar os níveis de recuperação das sondas de MD, para os analitos de interesse;
 - Avaliar o desempenho da técnica de MD;
 - Desenvolver o protocolo de inibição de COMT em ratos Wistar em livre movimento e testar a metodologia proposta;
 - Estabelecer o tempo efectivo de diálise de L-DOPA e de 3OMD no modelo experimental desenvolvido;
- Determinar as concentrações de L-DOPA e de 3OMD, livres no sangue, após administração oral do inibidor de COMT ou veículo controlo, através de MD em ratos Wistar, quando estes são tratados com L-DOPA conjuntamente com um inibidor de AADC, e comparar os parâmetros farmacocinéticos obtidos nas duas situações.

CAPÍTULO II
MATERIAL E MÉTODOS

1 Reagentes

Os reagentes e as soluções utilizadas em todos os procedimentos experimentais foram de pureza analítica. A água utilizada foi obtida a partir de um sistema de água ultra pura da MilliQ (Millipore[®]).

Os reagentes utilizados e os respectivos fornecedores estão apresentados a seguir:

- Acetato de Sódio trihidratado (Sigma[®]);
- Ácido Cítrico monohidratado (Sigma[®]);
- Ácido Etilenodiaminotetracético (Sigma[®]);
- Ácido Perclórico 70-72% (Merck[®]);
- Carboximetilcelulose (Sigma[®]);
- Cloreto de Cálcio (Sigma[®]);
- Cloreto de Potássio (Sigma[®]);
- Cloreto de Sódio (Sigma[®]);
- Dibutilamina (Merck[®]);
- Heparina Sódica 5000 UI/mL (B. Braun);
- Levodopa: L-3,4-dihidroxi-fenilalanina (Sigma[®]);
- Metabissulfito de Sódio (Sigma[®]);
- Metanol (Merck[®]);
- Octilssulfato de Sódio (Sigma[®]);
- Pentobarbital (Sigma[®]);
- Polivinilpirrolidona (Sigma[®]);
- 3-*O*-metil-L-dopa: 3-metoxi-L-tirosina (Sigma[®]).

2 Equipamento de laboratório

O equipamento de laboratório utilizado está apresentado a seguir:

- Agitador de tubos Stuart;
- Balanças: Kern 870-15, Mettler Toledo AT20;
- Banho de agitação GFL[®] 1083;
- Centrifuga refrigerada Sigma 1-15 K;
- Pipetas automáticas Gilson: P10, P20, P100, P200, P1000, P5000;
- Potenciômetro WTW pH 3000;
- Termômetro digital Hanna Instruments Checktemp 2;
- Ultra-som;
- Material cirúrgico: Agulhas (25G e 19G) Microlance[™]; Lâminas Surgeon[®] e Cabo bisturi Omega; Tesouras de cirurgia Medicon; Tesouras e pinças de dissecação Roboz; Pinças hemostáticas Medicon; Porta-agulhas Roboz; Linhas de sutura Sutures Limited; Microscópio Nikon SMZ-2T;
- Sistema de HPLC-ED composto por: Bomba Gilson[™] 307; Injector automático Gilson[™] 231 XL; Detector electroquímico Gilson[™] 142; Coluna cromatográfica PerkinElmer[™] Spheri-5 RP-18 5 μ m, 250 x 4.6 mm; Regulador de temperatura Gilson[™] 832; Suportes termostatizados Gilson[™] 31; Interface controladora de sistema Gilson[™] 506 C; Software Gilson Unipoint[™] (versão 3.01);
- Sistema de Microdiálise composto por: Bomba micro-injectora CMA/100; Seringas Hamilton; Controlador de temperatura CMA/150; Colector de amostras CMA/170; Suporte CMA/130; Sistema para animais em movimento livre CMA/120; Sondas para microdiálise CMA/20 BAS (CMA/Microdialysis AB) com membrana de policarbonato com 4 mm de comprimento e porosidade de 20 kDa.

3 Software

Os softwares utilizados estão apresentados a seguir:

- Microsoft[®] Office Excel 2003;
- GraphPad Prism 4.00 (GraphPad Software, Inc.);
- Statistica (versão 7.0, StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA);
- WinNonlin[®] (versão 5.0.1, Pharsight Corporation, Mountain View, Califórnia, USA).

4 Animais

Os procedimentos experimentais realizados em animais foram conduzidos em ratos Wistar machos, com pesos entre 250 e 300 g, obtidos na Harlan Interfauna Ibérica, S. L., Espanha.

Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Investigação Farmacológica, do Departamento de Investigação e Desenvolvimento, dos Laboratórios BIAL – Portela e C^a S. A., com temperatura (22 ± 2 °C) e humidade relativa (60 ± 10 %) controladas, com ciclo circadiano de luminosidade de 12/12 horas (08:00 – 20:00), em gaiolas T5 (≈ 600 cm²/animal).

Os animais tiveram livre acesso (*ad libitum*) a água e alimentação (ração certificada Harlan Teklab Global Diet ®).

No término das experiências, os animais foram eutanasiados por injeção letal de pentobarbital (180 mg/kg) e o material biológico foi devidamente acondicionado e disposto para recolha especial pela AMBIMED.

Os procedimentos realizados nos animais foram conduzidos de acordo com as recomendações de *Federation of European Laboratory Animal Science Associations* (FELASA) para a experimentação animal, de acordo com a Directiva Europeia número 86/609 e com as indicações de *Principles of Laboratory Animal Science* (Van Zutphen e col., 2001).

5 Cirurgias

As cirurgias efectuadas, para o implante das sondas de MD e para a cateterização da veia jugular dos animais, foram conduzidas segundo os princípios e os procedimentos básicos de cirurgia em ratos (Waynforth e Flecknell, 2001). Todas as cirurgias foram devidamente planeadas e cumpridos os requisitos de aclimatização dos animais à área experimental, de preparação e esterilização da área de trabalho e dos instrumentos de cirurgia.

5.1 Implante da sonda de microdiálise na veia jugular

O rato foi anestesiado por via intra-peritoneal com uma solução salina de pentobarbital (60 mg/kg). A temperatura corporal do animal anestesiado foi monitorizada e mantida constante durante todo o procedimento cirúrgico, utilizando um controlador de temperatura CMA/150 (figura 2).



Figura 2: Controlador de temperatura CMA/150. O equipamento monitoriza e regula a temperatura do animal anestesiado. A unidade de controlo indica a temperatura medida pela sonda rectal e regula a potência para a placa que aquece o animal. Fonte: adaptado da referência (CMA/Microdialysis, 2003).

O pêlo do pescoço do rato foi rapado e o local de incisão foi desinfectado com Betadine[®]. A incisão foi feita imediatamente acima da clavícula direita, como representado na figura 3.

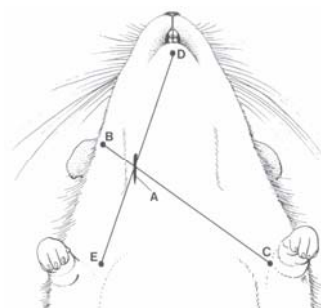


Figura 3: Local de incisão. As linhas imaginárias entre a orelha direita do animal e o seu sovaco esquerdo (B-C) e entre o queixo e o sovaco direito (D-E) foram usadas para a determinação do local de incisão (A). Fonte: adaptado da referência (Van Dongen e col., 1990).

O animal foi colocado em decúbito dorsal, com a cabeça para o lado do operador. A veia jugular foi exposta por dissecação dos tecidos adiposo e de ligação circundantes, ficando a referida veia visível numa extensão de aproximadamente 1 cm.

A veia jugular bifurca-se nas veias maxilar e linguofacial. A veia jugular foi fechada, na zona imediatamente anterior àquela bifurcação, com a ajuda de uma pinça hemostática e de duas ligaduras efectuadas com uma linha de sutura. As ligaduras referidas anteriormente foram colocadas na veia a montante e a jusante do ponto de inserção da sonda de MD – ligadura rostral e ligadura caudal, respectivamente (figura 4). A ligadura rostral foi mantida bem apertada e de maneira que não fosse possível a sua remoção. A ligadura caudal foi colocada folgada, para que a sua remoção fosse possível e permitisse a posterior inserção da sonda de MD.

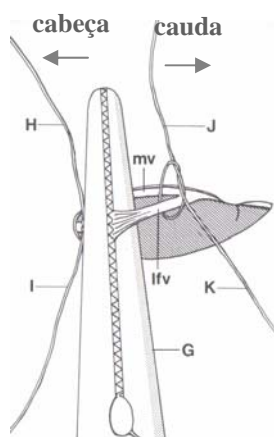


Figura 4: Fecho da veia jugular. O fecho da veia foi efectuado com uma pequena pinça hemostática. A ligadura rostral foi feita bem apertada enquanto que a ligadura caudal foi colocada folgada à volta do vaso. G- pinça; H/I- ligadura rostral; J/K- ligadura caudal; lfv- veia linguofacial; mv- veia maxilar. Fonte: adaptado da referência (Van Dongen e col., 1990).

O orifício para a inserção da sonda de MD foi efectuado com uma ponta de uma agulha 25G dobrada a 90°, com a qual se efectuou um pequeno corte no vaso sanguíneo. A mesma agulha que foi utilizada para abrir o orifício, foi usada para o manter aberto, facilitando o procedimento de inserção da sonda.

As sondas de MD foram introduzidas na veia jugular através do orifício referido, com a ajuda de guias em tubo, especificamente preparadas para a inserção das referidas sondas em vasos sanguíneos. Cada sonda de MD, juntamente com a sua guia foi introduzida gentilmente na veia jugular direita, até que a ponta da sonda estivesse ao nível da aurícula direita. De seguida, a sonda foi fixada ao músculo peitoral do animal, por meio de duas suturas, para assegurar que aquela não se movesse. Nesta fase, a guia da sonda de MD foi cuidadosamente retirada. A figura 5 esquematiza os passos mais importantes da inserção da sonda de MD, na veia jugular do rato.

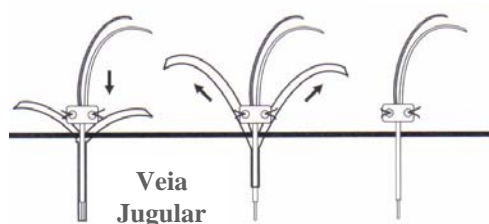


Figura 5: Inserção e fixação da sonda de MD CMA/20. As suturas são efectuadas entre o apoio da sonda e o músculo peitoral do animal, fixando a sonda na posição pretendida. Fonte: adaptado da referência (CMA/Microdialysis, 2003).

Após a inserção da sonda de MD e a sua fixação ao músculo peitoral do rato, os tubos *inlet* e *outlet* da referida sonda foram passados, subcutaneamente, até emergirem na zona posterior da cabeça ao nível do pescoço do rato, prevenindo qualquer possibilidade de dano nos referidos tubos, que poderia ser provocado pelo animal ou por qualquer outro factor mecânico. Com a ajuda de um bisturi, foi feita uma incisão através da pele no local desejado para a saída dos tubos da sonda. De seguida, uma pinça hemostática foi passada subcutaneamente desde a referida abertura na pele até à zona onde a sonda estava implantada. Os tubos da sonda de MD foram presos com a referida pinça hemostática e puxados pelo movimento da mesma pinça, emergindo atrás da cabeça do rato, como representado na figura 6. O procedimento de implante da sonda de MD, propriamente dito, foi finalizado nesta fase da cirurgia, em que a abertura na pele, por onde passaram os tubos da sonda de MD, e a incisão feita para a exposição da veia jugular foram fechadas e suturadas.



Figura 6: Passagem subcutânea dos tubos *inlet* e *outlet* da sonda de MD.

Fonte: adaptado da referência (Van Dongen e col., 1990).

O passo que se seguiu ao implante da sonda de MD foi a preparação da mesma para a sua perfusão contínua. O tubo *inlet* foi ligado ao sistema de MD e iniciou-se a perfusão da sonda com a solução de Ringer, utilizando uma bomba micro-injectora de infusão contínua (CMA/100), apresentada na figura 7.



Figura 7: Bomba micro-injectora CMA/100. Fonte: adaptado da referência (CMA/Microdialysis, 2003).

A sonda foi inicialmente submetida a um fluxo de 10 a 15 $\mu\text{L}/\text{min}$ e o tubo *outlet* foi observado à transparência para se assegurar a passagem do líquido de perfusão. Este fluxo foi mantido, por aproximadamente 5 minutos, para remoção de alguma eventual bolha de ar do interior da sonda de MD. Nesta fase do procedimento, o tubo *outlet* não estava ligado ao sistema de MD, de maneira a evitar-se uma eventual rotura da membrana de MD, provocada pela pressão induzida pelo fluxo relativamente elevado que estava a ser aplicado na sonda. Antes da ligação do tubo *outlet*, o fluxo de perfusão foi ajustado a 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ e mantido até ao final da experiência.

5.2 Cateterização da veia jugular

A cateterização da veia jugular é um processo que permite a colheita de amostras de sangue dos ratos, com os animais não anestesiados.

A cateterização da veia jugular dos ratos foi efectuada, utilizando cateteres preparados especificamente para esse fim. Os cateteres, com 10 cm de comprimento, foram preparados a partir de tubos de polietileno Intramedic[®] com diâmetros interno de 0.580 mm e externo de 0.965 mm. Um anel de silicone foi colocado à distância de 3 cm da ponta de cada cateter, usando uma agulha 19 G, previamente embebida em cola de silicone. A colocação do anel de silicone foi conseguida, rodando lentamente o cateter entre o polegar e o indicador de ambas as mãos, sobre a referida agulha embebida em cola de silicone, como representado na figura 8. A preparação do cateter ficou concluída aquando do seu enchimento com uma solução salina heparinizada (50 UI/mL), com a ajuda de uma seringa de 1 mL, tendo o cuidado de não se deixar bolhas de ar no seu interior.

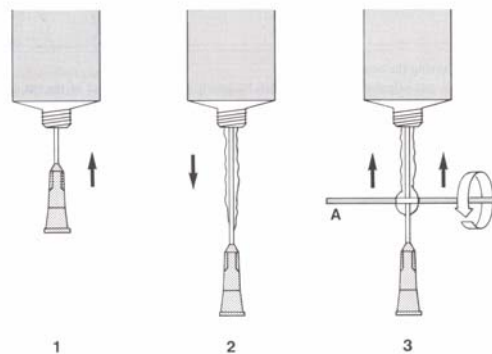


Figura 8: Preparação do anel de silicone. Uma agulha é inserida num tubo de silicone (1) e removida. Alguma cola de silicone fica na agulha (2). A cola de silicone é envolvida no cateter, rodando-o e movendo-o na direcção do tubo de cola (3). Fonte: adaptado da referência (Van Dongen e col., 1990).

O procedimento de cateterização da veia jugular foi, em parte, semelhante ao procedimento de implante da sonda de MD (secção 5.1). O rato foi anestesiado, preparado, posicionado e monitorizado, durante o procedimento cirúrgico. A veia jugular foi exposta e orifício de entrada do cateter foi efectuado com a ajuda de uma ponta de uma agulha 19 G. A ponta da mesma agulha foi dobrada e utilizada como guia, para facilitar a inserção do cateter.

O cateter foi inserido gentilmente até ao anel de silicone, situado a 3 cm da ponta, que deverá estar ao nível da aurícula direita. O correcto posicionamento do cateter foi testado,

aspirando algum sangue com uma seringa.

O cateter foi fixado à veia jugular, usando as duas ligaduras rostral e caudal, referidas anteriormente na secção 5.1. A ligadura caudal, nesta fase, foi ligeiramente mais apertada e, em conjunto com a ligadura rostral, foram usadas para fixar o cateter à veia. Para assegurar que o cateter não se moveria, foi dado um nó entre as pontas das duas ligaduras, cruzando o anel de silicone, como representado na figura 9.

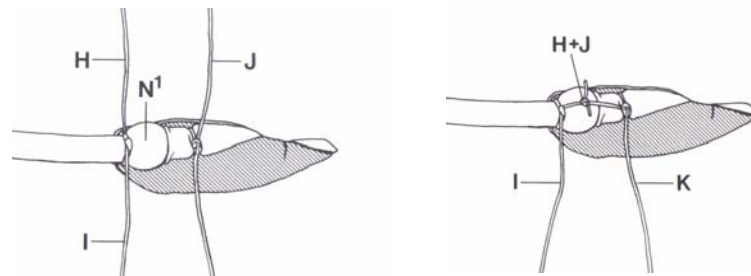


Figura 9: Fixação do cateter à veia jugular do rato. Os fios de sutura J e K são apertados quando o anel de silicone atinge o orifício de entrada na veia. Os fios H e I são apertados ao nível do anel de silicone. Finalmente, os fios H e J são apertados através do anel de silicone, fixando o cateter à veia. Fonte: adaptado da referência (Van Dongen e col., 1990).

Nesta fase do procedimento de cateterização, o cateter foi cuidadosamente passado subcutaneamente até emergir atrás da cabeça do rato, procedendo-se como está descrito na secção 5.1. O procedimento de cateterização, propriamente dito, foi finalizado pelo fecho e sutura da abertura na pele por onde saiu o cateter e a da incisão feita para a exposição da veia jugular.

A solução salina de enchimento do cateter foi substituída por uma outra solução salina de 60% PVP (polivinilpirrolidona), contendo 500 unidades de heparina/mL. Esta última solução, por ter alguma viscosidade, prevenia a difusão do sangue do animal para o interior do cateter.

6 Estudos de recuperação das sondas de microdialise

Para que o dialisado reflecta a concentração real livre dos analitos no local de amostragem, é necessário que a recuperação das sondas seja previamente estabelecida. Assim, a correcta quantificação de L-DOPA e de 3OMD livres na corrente sanguínea, foi conseguida com base nos testes de recuperação das sondas, efectuados *in vitro* e *in vivo*.

As amostras de dialisado e as soluções de L-DOPA e de 3OMD, utilizadas nos estudos de recuperação das sondas de MD, foram armazenadas a -80 °C até serem analisadas por HPLC-ED.

6.1 Recuperação *in vitro*

A recuperação relativa *in vitro*, das sondas de MD, foi avaliada pelas técnicas de ganho e de perda.

6.1.1 Técnica de ganho

Avaliou-se a influência do fluxo de perfusão e da concentração de L-DOPA e de 3OMD na recuperação das sondas de MD.

6.1.1.1 Influência do fluxo de perfusão

As recuperações das sondas foram avaliadas a dois níveis de concentrações diferentes de L-DOPA e de 3OMD (500 e 1000 ng/mL) e a três diferentes fluxos de perfusão – 1, 2 e 3 $\mu\text{L}/\text{min}$. As sondas foram imersas nas referidas soluções de L-DOPA e de 3OMD, a 37 °C, sob agitação e perfundidas com uma solução de Ringer, constituída por 147 mM Na^+ , 4.0 mM K^+ , 2.3 mM Ca^{2+} , 156 mM Cl^- (CMA/Microdialysis, 2003). As colheitas das amostras de dialisado, para quantificação de L-DOPA e de 3OMD, recuperados pelas sondas de MD, foram feitas após 30 minutos de estabilização das referidas sondas.

6.1.1.2 Influência da concentração dos analitos

A recuperação das sondas de MD foi avaliada numa gama alargada de concentrações de L-DOPA e de 3OMD (200 ng/mL a 4000 ng/mL), com fluxo de perfusão 2.0 $\mu\text{L}/\text{min}$. As sondas foram imersas nas referidas soluções de L-DOPA e de 3OMD, a 37 °C, sob agitação e perfundidas com solução de Ringer.

6.1.2 Técnica de perda

Os estudos de recuperação relativa das sondas de MD, pela técnica de perda, foram realizados através da perfusão de uma solução de Ringer com L-DOPA e 3OMD à concentração de 1000 ng/mL, com fluxo de perfusão 2 μ L/min. As colheitas de dialisados foram feitas com as sondas de MD imersas numa solução de Ringer, a 37 °C, sob agitação. As colheitas foram realizadas após uma pré-estabilização de 30 minutos das sondas de MD.

6.2 Recuperação *in vivo*

A recuperação das sondas *in vivo* foi realizada pelo método de retrodiálise. As sondas de MD foram inseridas na veia jugular direita dos ratos conforme descrito na secção 5.1 e perfundidas com uma solução de Ringer com L-DOPA e 3OMD à concentração de 1000 ng/mL, a um fluxo de 2 μ L/min. As colheitas de dialisado foram efectuadas com os animais em livre movimento, após 24 horas de recuperação da cirurgia para a implantação das sondas de MD. A recuperação das sondas de MD foi efectuada sob condições semelhantes às utilizadas nas experiências em animais.

7 Integridade das sondas de microdiálise

O desenho experimental dos estudos de inibição de COMT *in vivo* requeria a manutenção do comportamento da sonda por um longo período de tempo. As experiências de microdiálise exigiram que se assegurassem as condições perfeitas das sondas durante as diferentes fases de colheita das amostras. Assim, a avaliação da integridade das sondas de MD, foi feita através de um estudo com 5 sondas diferentes, usadas em colheitas de 5 experiências de farmacocinética diferentes. O estudo para a validação da integridade das sondas de MD consistiu na comparação entre os valores de recuperação das referidas sondas antes e após a sua utilização nos animais. A recuperação das sondas foi elaborada pela técnica de ganho *in vitro*, com o fluxo de perfusão 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ e utilizando a concentração de L-DOPA e de 3OMD de 1000 ng/mL.

8 Concentração livre *versuss* concentração total

Os níveis de L-DOPA e de 3OMD livres foram comparados com os níveis totais em circulação sanguínea. Neste estudo foram avaliados os valores de concentração dos referidos analitos obtidos pela técnica de MD e pela técnica de quantificação directa em plasma. O plasma foi obtido a partir de amostras de sangue de rato (± 1 mL) colhidas, através de um cateter previamente colocado na veia jugular direita do animal, como o descrito na secção 5.2. As colheitas de sangue foram elaboradas, com os ratos acordados e em movimento livre, tal como foram feitas as amostragens por MD.

Os níveis plasmáticos de L-DOPA e de 3OMD foram avaliados 0, 30, 50, 110 e 210 minutos após uma administração oral de L-DOPA e benserazida (12 e 3 mg/kg, respectivamente) e comparados com o mesmo tipo de tratamento dos estudos de MD.

9 Inibição de COMT – farmacocinética de L-DOPA e de 3OMD

As experiências de farmacocinética de L-DOPA e de 3OMD permitiram avaliar a inibição de COMT. Os perfis das curvas de concentrações *versus* tempo, de L-DOPA e de 3OMD nas diferentes condições de inibição de COMT, foram determinados após as colheitas de dialisado do sangue, na veia jugular direita dos ratos.

Em cada experiência de farmacocinética, cada animal foi sujeito a um conjunto de 3 dias de ensaios, em que foi feita diariamente uma administração oral simultânea de L-DOPA (12 mg/kg), de benserazida (3 mg/kg) e de um inibidor de COMT (3 mg/kg) ou veículo controle (0.5 % carboximetilcelulose): nos dias 1 (D1) e 3 (D3), os animais não foram administrados com qualquer inibidor de COMT, tendo sido unicamente tratados com L-DOPA e benserazida – tratamentos controle de cada experiência de farmacocinética; no segundo dia de ensaio experimental (D2) cada animal foi tratado simultaneamente com L-DOPA, benserazida e um inibidor de COMT (nebicapone ou entacapone), de maneira a verificar-se a inibição da enzima. Todas as experiências farmacocinéticas tiveram início 24 horas após a cirurgia para implante das sondas de MD, altura em que se considerou que o animal estava recuperado.

Os ratos foram sujeitos a um jejum nocturno, anterior a cada administração diária dos fármacos. A comida foi disponibilizada durante aproximadamente 3 horas, no final de cada dia de ensaio experimental, findas as quais eram mantidos em jejum nocturno até à administração do dia seguinte. A água foi disponibilizada durante todo o procedimento experimental, tendo os animais tido livre acesso à mesma durante 24 horas por dia durante os 3 dias da experiência de farmacocinética. Note-se que, no dia da cirurgia para a implantação das sondas de MD, a comida foi retirada aos animais, pelo que foram mantidos em jejum nocturno antes da administração dos fármacos em D1.

As amostras de dialisado foram obtidas, utilizando sondas de MD CMA/20 perfundidas com solução de Ringer, a um fluxo de 2 μ L/min. O fluxo de 2 μ L/min foi definido a partir dos estudos preliminares de recuperação das sondas de MD, referidos na secção 6 deste capítulo.

O comportamento de cada sonda, usada em cada experiência de farmacocinética, foi avaliado antes do seu implante no animal, através da determinação sua taxa de recuperação por ganho *in vitro*. Assim, as concentrações de L-DOPA e de 3OMD livres em circulação sanguínea, puderam ser calculadas a partir das concentrações obtidas nas amostras de dialisado.

A concentração de determinado analito numa amostra de dialisado representa a concentração média do referido analito no ECF, num intervalo determinado intervalo de tempo.

Este intervalo de tempo corresponde ao tempo de colheita da amostra de dialisado. Assim, a concentração da amostra de dialisado foi considerada como sendo a concentração no tempo médio deste intervalo.

O desfasamento no tempo de colheita devido ao volume morto entre o local de amostragem no sangue e o local de colheita do dialisado, foi calculado como sendo aproximadamente 30 segundos. Este valor foi considerado desprezável, pelo que não foi realizada nenhuma correcção nos tempos de colheita.

A amostragem por MD foi elaborada com a ajuda de um colector de fracções CMA/170, representado na figura 10. Cada amostra de dialisado foi obtida a cada 20 minutos, por um período de 6.5 h, após a administração dos fármacos. Duas amostras foram colhidas, antes de cada administração dos fármacos – pré-dose. As amostras de dialisado foram processadas como o descrito na secção 10.1.2 deste capítulo e congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até à sua análise.



Figura 10: Colector de fracções CMA/170. Fonte: adaptado da referência (CMA/Microdialysis, 2003).

As experiências de farmacocinética foram elaboradas em ratos conscientes, utilizando um sistema para animais em movimento livre CMA/120 (figura 11) Este sistema permitiu que o fluxo de perfusão pudesse ser mantido nas sondas de MD, com os animais acordados. O sistema CMA/120 foi sujeito a algumas adaptações para que (i) permitisse que os animais tivessem o livre acesso à água e que (ii) proporcionasse o mínimo de mal-estar aos animais, devido à acumulação de fezes e urina. O livre acesso à água foi conseguido pela elaboração de alguns furos na taça do sistema CMA/120, que permitiram a fixação e o acesso ao biberão da água. O contacto com os excrementos foi evitado pela colocação de uma grelha de aço inoxidável no fundo da taça do sistema CMA/120.



Figura 11: Sistema para animais em movimento livre CMA/120.

Fonte: adaptado da referência (CMA/Microdialysis, 2003).

A disposição geral dos equipamentos que constituíram os sistemas de MD está representada na figura 12. Nas experiências de farmacocinética e de inibição de COMT, foram usados 2 sistemas de MD simultaneamente controlados por um sistema informático.

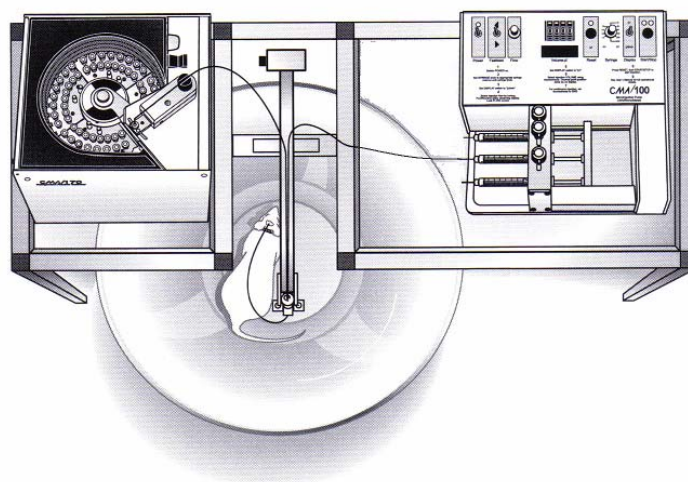


Figura 12: Disposição dos equipamentos de um sistema de MD.

Fonte: adaptado da referência (CMA/Microdialysis, 2003).

10 Metodologia analítica para quantificação de L-DOPA e de 3OMD

10.1 Processamento de amostras

A diferença de complexidade da matriz plasma e da matriz dialisado, faz com que as amostras constituídas por estes diferentes tipos de matrizes necessitem de métodos de processamento diferentes, para poderem ser analisadas.

As amostras de plasma ou dialisado foram analisadas, usando o método de HPLC-ED, previamente validado.

10.1.1 Plasma

As amostras de sangue foram colhidas para tubos de ensaio e centrifugadas de imediato ($1500 \times g$, 15 min, 4 °C). O plasma foi separado e ao volume resultante, foi adicionado uma solução de metabissulfito de sódio 25% (p/v) na proporção de 25/1000 para prevenir a oxidação dos analitos. As amostras de plasma com metabissulfito foram armazenadas a -80 °C até requeridas para análise.

A extracção de L-DOPA e de 3OMD das amostras de plasma foi efectuada por precipitação directa das proteínas plasmáticas presentes. A 300 μ L de volume de plasma, adicionou-se 200 μ L de 1 M ácido perclórico (PCA) e agitou-se durante 10 segundos, num agitador de tubos. A mistura foi incubada durante 10 minutos em gelo e imediatamente submetida a uma centrifugação a $16000 \times g$, durante 3 minutos, a 4 °C. Após a referida centrifugação, o sobrenadante resultante foi filtrado, usando filtros Spin-X[®] 0.22 μ m. As amostras foram armazenadas a -80 °C até requeridas para análise.

10.1.2 Dialisado

As amostras de dialisado foram colhidas para tubos de colheita de MD, foi-lhes adicionado igual volume de 0.4 M PCA e armazenadas a -80 °C até requeridas para análise.

10.2 Validação da metodologia analítica

A validação de uma metodologia analítica é definida como sendo um processo através do qual estudos de laboratório são utilizados para garantir que a metodologia utilizada cumpra as exigências desejadas. Uma validação é realizada para garantir que a metodologia analítica é exacta, específica e reprodutível, assegurando a sua credibilidade durante o seu uso rotineiro

(FDA, 2001).

A metodologia utilizada neste trabalho para a quantificação de L-DOPA e de 3OMD nas amostras de plasma e de dialisado consiste na técnica de HPLC-ED. A referida metodologia foi uma adaptação da validada e descrita por Silveira e col. (2003).

Conforme descrito no Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos para a Indústria (FDA, 2001) a validação de metodologia é necessária quando são realizadas modificações numa metodologia previamente validada. Entre estas modificações, cita-se a troca da matriz biológica. Uma vez que na metodologia descrita por Silveira e col. (2003), a matriz biológica foi plasma humano, foi necessário que se fizessem duas validações diferentes, para a análise de amostras de matrizes diferentes – plasma de rato e dialisado de sangue de rato. Assim as validações da metodologia, em ambas as matrizes biológicas, incluíram os seguintes parâmetros de validação: selectividade, *carryover*, intra-lote, inter-lote, linearidade, diluição, recuperação (plasma) e estabilidade.

Os parâmetros de validação, das diferentes metodologias analíticas, foram avaliados através de curvas padrão e controlos de qualidade preparados com as diferentes matrizes, contendo concentrações conhecidas de L-DOPA e de 3OMD, conforme descrito nas normas da *Food and Drug Administration* (FDA, 2001).

10.2.1 Curvas padrão e controlos de qualidade

Os padrões que constituíram cada curva de calibração e as amostras para controlo de qualidade, usados em cada processo de análise, foram obtidos pela adição de soluções com diferentes concentrações de L-DOPA e de 3OMD – soluções de adição – à matriz em análise (plasma ou dialisado).

Uma solução stock padrão inicial de L-DOPA e de 3OMD foi preparada à concentração de 1 mg/mL. Para tal, L-DOPA e 3OMD foram pesadas separadamente numa balança analítica e dissolvidas em 0.2 M PCA, obtendo-se uma solução de cada analito à concentração de 2 mg/mL. Iguais volumes das soluções de 2 mg/mL de L-DOPA e de 3OMD foram misturados, obtendo-se uma solução stock à concentração de 1 mg/mL.

As soluções de adição foram preparadas a partir da solução stock padrão, já referida, por diluições sucessivas em 0.2 M PCA. As soluções de adição foram adicionadas à matriz em análise, de maneira que volume da solução de adição não excedesse 5 % do volume total da referida matriz, de forma a assegurar a integridade da mesma (FDA, 2001). O processamento das

amostras de padrões de calibração e controlos de qualidade foi feito como o descrito na secção 10.1 deste capítulo.

10.2.2 Selectividade

A selectividade de uma metodologia analítica consiste na sua capacidade para diferenciar e quantificar o analito de interesse na presença de outros componentes presentes na amostra. Há vários potenciais interferentes nas matrizes biológicas dos quais são exemplos componentes endógenos da matriz, metabólitos, produtos de degradação, medicações concomitantes e outros xenobióticos exógenos (FDA, 2001). A selectividade foi estudada através da análise de amostras branco de matriz, provenientes de lotes diferentes. Os resultados obtidos a partir da análise de amostras branco de matriz, foram comparados com os observados em amostras de matriz às quais tinham sido previamente adicionados L-DOPA e 3OMD.

10.2.3 Carryover

A análise cromatográfica de uma amostra poderá sofrer influências resultantes da análise de uma amostra anterior, uma vez que pode acontecer a ocorrência do aparecimento de interferentes na quantificação do analito de interesse. Esta interferência entre amostras consecutivas é chamada de *carryover* (FDA, 2001). O parâmetro de validação *carryover* foi avaliado pela análise de amostras branco de matriz, após a injeção de amostras às quais tinham sido previamente adicionados L-DOPA e 3OMD, às duas concentrações mais elevadas da gama de quantificação.

10.2.4 Precisão e exactidão

A precisão de uma metodologia analítica representa a concordância entre uma série de variáveis, resultantes da aplicação repetida da referida metodologia a um conjunto de amostras homogéneas. A precisão pode ser avaliada pela repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade. A repetibilidade (avaliada no parâmetro de validação intra-lote) representa a variação da metodologia e é medida em função dos valores encontrados através de várias reproduções do método, nas mesmas condições, num curto intervalo de tempo. A precisão intermediária (avaliada no parâmetro de validação inter-lote) expressa o efeito das variações da metodologia, quando esta é aplicada em diferentes dias de ensaio, por diferentes analistas ou em diferentes equipamentos. A reprodutibilidade refere-se aos resultados de estudos efectuados entre diferentes laboratórios (FDA, 2001).

A precisão das metodologias utilizadas para a análise das diferentes matrizes biológicas, foi avaliada através dos parâmetros intra-lote e inter-lote, analisando amostras branco das referidas matrizes, às quais tinham sido previamente adicionados L-DOPA e 3OMD a três níveis de concentração diferentes, em 3 dias de ensaios consecutivos. A precisão foi expressa pelo coeficiente de variação CV , que foi calculado pela equação 3:

$$CV = \frac{\bar{x}}{DP} \times 100 \quad (3)$$

onde \bar{x} é a média aritmética do conjunto de valores obtidos para determinada concentração de analito e DP é o desvio padrão para o mesmo conjunto de valores.

A exactidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados e um valor aceite como referência (FDA, 2001). A exactidão das diferentes metodologias para a quantificação de L-DOPA e de 3OMD foi avaliada pela análise de amostras branco das referidas matrizes às quais tinham sido previamente adicionados os analitos de interesse. A exactidão foi avaliada a três níveis de concentração diferentes, em três dias de ensaios consecutivos. A exactidão foi expressa pelo erro relativo ER , que foi calculado através da equação 4:

$$ER = \frac{C_{obt} - C_{nom}}{C_{nom}} \times 100 \quad (4)$$

onde C_{obt} é a média aritmética do conjunto de valores obtidos para determinada concentração dos analitos e C_{nom} é o valor nominal teórico da concentração dos referidos analitos.

O CV e o ER devem apresentar valores inferiores a 15 % para cada concentração avaliada, excepto para o LLOQ, que deve ser inferior a 20 % (FDA, 2001).

10.2.5 Limites de quantificação e linearidade

Os limites mínimo (LLOQ) e máximo (ULOQ) de quantificação representam as concentrações mais baixa e mais alta, respectivamente, das substâncias em análise, que podem ser quantificadas através de uma determinada metodologia, apresentando exactidão e precisão satisfatórias.

A linearidade consiste na capacidade da metodologia analítica para fornecer resultados que

variam de uma forma directamente proporcional à concentração da substância em análise, dentro de uma determinada gama de valores.

A linearidade das metodologias analíticas usadas neste trabalho, foi avaliada através de oito níveis de concentração diferentes. As curvas de calibração foram constituídas por oito padrões de calibração, cobrindo toda a gama de quantificação, incluindo o LLOQ e o ULOQ. A linearidade dos métodos analíticos foi avaliada a partir de três curvas calibração, em três ensaios diferentes (os padrões de calibração usados para os parâmetros de validação intra-lote e inter-lote). As curvas de calibração foram obtidas pela análise de regressão dos mínimos quadrados, considerando as alturas dos picos de L-DOPA e de 3OMD, em função das suas concentrações teóricas. O declive (m), a ordenada na origem (a) e o coeficiente de correlação (R) das curvas de melhor ajuste foram determinados e avaliados neste parâmetro de validação.

10.2.6 Diluição

O parâmetro de validação diluição permite estudar a possibilidade de uma amostra ser diluída, na matriz apropriada, com precisão e exactidão, no caso de aquela amostra apresentar concentrações acima do ULOQ.

A possibilidade de diluição das amostras de plasma e de dialisado foi estudada, em triplicado, à concentração mais alta da gama de quantificação. As amostras foram diluídas com matriz branco e analisadas através da metodologia analítica correspondente a cada tipo de matriz. Os resultados obtidos foram avaliados quanto à sua precisão e exactidão.

10.2.7 Recuperação

A recuperação refere-se à eficiência do processo de extracção do analito de interesse, numa metodologia analítica. A recuperação de um analito é a resposta do detector obtida para uma quantidade do referido analito adicionado a uma matriz biológica, após esta ter sido submetida ao processo de extracção, comparada com a resposta do mesmo detector obtida para a correspondente concentração nominal de um padrão de referência, do mesmo analito.

A recuperação da metodologia analítica foi determinada em plasma de rato, a baixas, médias e altas concentrações de L-DOPA e de 3OMD, tendo sido testados 5 replicados de cada nível de concentração. As alturas de picos dos replicados das amostras de plasma, em diferentes níveis de concentração, foram comparadas com as alturas de picos das amostras de plasma branco, contendo concentrações equivalentes adicionadas após o passo de extracção, assumindo

nestas últimas 100% de recuperação.

O parâmetro recuperação não foi avaliado na metodologia analítica aplicada às amostras de dialisado, porque o correspondente método de processamento das amostras não requer qualquer tipo de extração.

10.2.8 Estabilidade

A estabilidade de substâncias em fluidos biológicos, depende do material de acondicionamento, das condições de armazenamento, das propriedades químicas da substância e da matriz biológica onde se encontra. A estabilidade de muitos analitos numa matriz biológica particular não pode ser extrapolada para outras matrizes e sistemas de armazenamento (FDA, 2001).

A estabilidade de L-DOPA e de 3OMD foi avaliada nas matrizes plasma e dialisado. A estabilidade das amostras biológicas foi avaliada a diferentes temperaturas – temperatura ambiente (TA), 4 °C, -20 °C e -80 °C, após diferentes tempos de permanência (1, 7 ou 14 dias), a dois níveis diferentes de concentrações de L-DOPA e de 3OMD. As amostras de cinco aliquotas de cada nível de concentração foram analisadas imediatamente após o seu processamento e comparadas com as amostras sujeitas às condições de armazenamento referidas anteriormente. Os valores das concentrações de L-DOPA e de 3OMD foram obtidos pela interpolação a uma curva padrão preparada de fresco.

10.3 Cromatografia e detecção

A análise das amostras de plasma e dialisado foi elaborada usando um sistema de HPLC-ED Gilson™. A separação cromatográfica foi feita por uma coluna PerkinElmer™, usando uma fase móvel, a um fluxo de 1 mL/min, constituída por 0.15 mM ácido etilenodiaminatetraacético, 0.5 mM octilsulfato de sódio, 2 mM dibutilamina, 100 mM acetato de sódio, 100 mM ácido cítrico, 10 % metanol e pH 3.5 ajustado com 70 % PCA. A detecção electroquímica foi realizada ao potencial de 0.75 V. Em todas as análises foi usado um volume de 50 µL de injeção de amostra.

11 Análise farmacocinética

A análise farmacocinética foi elaborada a partir do estudo das diferentes variáveis farmacocinéticas: $t_{1/2}$, AUC_{0-t} e $AUC_{0-\infty}$, C_{max} e t_{max} . Estas variáveis farmacocinéticas foram derivadas para a L-DOPA e para a 3OMD, a partir dos valores individuais das concentrações livres destes analitos na corrente sanguínea do rato, em função do tempo. Os referidos valores foram obtidos pela análise das amostras obtidas por MD. As variáveis farmacocinéticas estudadas foram derivadas a partir de uma análise baseada num modelo não-compartimental, usando o software WinNonlin[®].

As análises mais correntes para caracterizar a cinética dos fármacos envolvem modelos não-compartimentais e análises de regressão não lineares. Este tipo de análises não requer qualquer suposição relativamente à compartimentalização dos fármacos nem dos seus metabolitos no organismo (Gabrielsson e Weiner, 2000). O método usado envolve o cálculo da área sob a curva das concentrações ao longo do tempo e aplica modelos matemáticos lineares de primeira ordem. Neste tipo de modelo de análise, a expressão matemática que descreve o processo de eliminação de fármacos do organismo é a equação 5:

$$C = C_0 \times e^{-K_{el} \times t} \quad (5)$$

onde C é a concentração do fármaco, K_{el} é a taxa de eliminação e t é o tempo de colheita da amostra. A equação logarítmica para esta função exponencial tem a forma geral da equação (6) descrevendo uma linha recta:

$$\ln C = \ln C_0 - K_{el} \times t \quad (6)$$

onde $\ln C$ representa o ponto de intercepção com o eixo das ordenadas e $(-K_{el})$ representa a inclinação da referida recta.

$t_{1/2}$, o tempo requerido para a concentração de um analito reduzir para metade – o tempo de semi-vida terminal – foi calculado através da equação 7:

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{\lambda_z} \quad (7)$$

onde λ_z é estimado pelo declive terminal da recta representada pela equação 6 (3 a 4 observações), sendo calculado pela equação 8:

$$\lambda_z = (-K_{el}) \quad (8)$$

AUC_{0-t} é o valor da área sob a curva das concentrações ao longo do tempo, desde o tempo zero até ao último valor quantificável de concentração do analito. Este valor foi calculado pela regra trapezoidal linear.

$AUC_{0-\infty}$ é o valor da área sob a curva das concentrações ao longo do tempo, desde o tempo zero até ao infinito. Este valor foi determinado pela equação 9:

$$AUC_{0-\infty} = AUC_{0-t} + \frac{C_{last}}{\lambda_z} \quad (9)$$

onde C_{last} é último valor quantificável da concentração do analito.

As variáveis farmacocinéticas C_{max} e t_{max} são definidas como sendo, respectivamente, o valor máximo da variável concentração do analito e o tempo a que C_{max} ocorre.

A análise farmacocinética englobou a avaliação das razões médias entre os valores obtidos, para as referidas variáveis farmacocinéticas, na situação de inibição da COMT (D2) e os valores obtidos no tratamento controlo (D1).

12 Análise estatística

A análise estatística foi elaborada, usando o software Statistica.

As comparações estatísticas entre médias de valores de dois grupos diferentes foram elaboradas através do teste t-Student. Este teste foi aplicado, quando apropriado, para amostras independentes e para amostras emparelhadas. Quando necessário, foi usado o teste não paramétrico de Wilcoxon.

CAPÍTULO III
RESULTADOS

1 Validação da metodologia analítica para quantificação de L-DOPA e de 3OMD

A técnica de HPLC-ED é uma das técnicas mais utilizadas para a quantificação de catecolaminas, pelo que foi a escolhida para a quantificação de L-DOPA e de 3OMD nas amostras de dialisado e de plasma. A metodologia usada para a quantificação de L-DOPA e de 3OMD em amostras de plasma e dialisado foi validada conforme as especificações e normas estabelecidas no Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos para a Indústria (FDA, 2001), pelo que pode ser considerada precisa e exacta, nas respectivas gamas de quantificação avaliadas.

1.1 Plasma

A validação da metodologia analítica para a quantificação de L-DOPA e de 3OMD em amostras de plasma de rato foi realizada com base na metodologia, previamente validada em plasma humano (Silveira e col., 2003). Os cromatogramas típicos obtidos por HPLC-ED para a L-DOPA e para a 3OMD em amostras de plasma de rato podem ser observados na figura 13. Os tempos de retenção de L-DOPA e de 3OMD foram aproximadamente 3.2 min e 4.6 min, respectivamente.

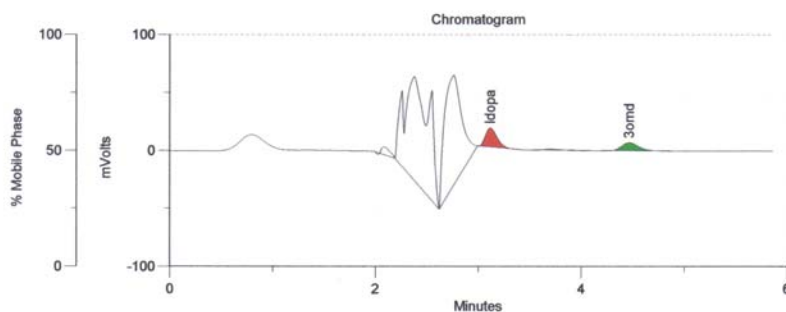


Figura 13: Cromatograma obtido por HPLC-ED para a L-DOPA e para a 3OMD em extracto de plasma de rato: amostra de uma curva padrão na concentração de 500 ng/mL.

1.1.1 Selectividade

A selectividade foi avaliada através da análise de 5 amostras branco de matriz, provenientes de diferentes lotes de plasma de rato.

Não foram observados picos que pudessem comprometer a selectividade da metodologia analítica para a quantificação de L-DOPA e de 3OMD. A figura 14 mostra um cromatograma típico de um extracto de matriz branco de plasma de rato.

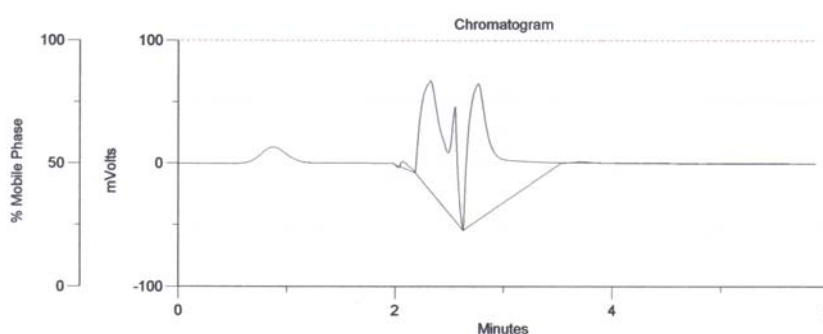


Figura 14: Cromatograma de matriz branco de plasma de rato.

1.1.2 Carryover

As injecções das amostras com as concentrações mais altas da gama analítica (800 e 1000 ng/mL) não interferiram na análise das amostras consecutivas de matriz branco de plasma analisadas. As amostras matriz branco de plasma não apresentaram picos eluindo aos mesmos tempos de retenção que a L-DOPA ou a 3OMD.

1.1.3 Precisão e exactidão

A precisão e exactidão da metodologia analítica para quantificação de L-DOPA e de 3OMD em amostras de plasma de rato foram avaliadas ao longo da gama de concentrações entre 100 e 1000 ng/mL. A precisão e a exactidão foram avaliadas em três níveis de concentrações: baixa – 200 ng/mL, média – 500 ng/mL e alta – 800 ng/mL. Nesta gama de concentrações, o *CV* e o *ER* apresentaram valores inferiores a 15 % para cada concentração avaliada, em todos os ensaios efectuados. Os valores encontrados estão de acordo com o critério de aceitação (FDA, 2001), demonstrando que o método é preciso e exacto quando aplicado em dias de ensaio diferentes.

1.1.3.1 Intra-lote

A precisão calculada no parâmetro intra-lote, expressa por *CV*, variou entre 0.60 % e 2.20 % para a L-DOPA e entre 0.65 % e 2.18 % para a 3OMD. A exactidão, expressa em *ER*, variou para a L-DOPA entre 1.00 % e 2.91 % enquanto que para a 3OMD variou de 4.60 % a 6.55 %. Os valores individuais podem ser visualizados nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1: Precisão e exactidão intra-lote na quantificação de L-DOPA em plasma de rato.

Concentração Nominal (ng/mL)	Concentração Obtida (ng/mL)	N	Concentração Média Obtida (ng/mL)	DP	CV (%)	ER (%)
200.00	202.11	5	202.05	4.44	2.20	1.03
	200.37					
	209.67					
	198.92					
	199.21					
500.00	505.68	5	504.98	10.41	2.06	1.00
	514.10					
	512.07					
	505.39					
	487.67					
800.00	821.45	5	823.31	4.93	0.60	2.91
	817.96					
	823.48					
	822.32					
	831.32					

Tabela 2: Precisão e exactidão intra-lote na quantificação de 3OMD em plasma de rato.

Concentração Nominal (ng/mL)	Concentração Obtida (ng/mL)	N	Concentração Média Obtida (ng/mL)	DP	CV (%)	ER (%)
200.00	211.29	5	213.00	4.64	2.18	6.50
	210.58					
	221.27					
	210.58					
	211.29					
500.00	519.99	5	522.99	9.04	1.73	4.60
	531.40					
	530.69					
	523.56					
	509.30					
800.00	852.22	5	852.36	5.55	0.65	6.55
	846.52					
	851.51					
	850.08					
	861.49					

1.1.3.2 Inter-lote

O CV, calculado através do parâmetro inter-lote, variou entre 1.54 % e 2.44 % para a L-DOPA e entre 1.57 % e 2.65 % para a 3OMD. O ER variou para a L-DOPA entre 0.20 % e 1.54 % enquanto que para a 3OMD variou de 0.21 % a 6.07 %. Os valores individuais podem ser visualizados nas tabelas 3 e 4.

Tabela 3: Precisão e exactidão inter-lote na quantificação de L-DOPA em plasma de rato.

Concentração Nominal (ng/mL)	Concentração Obtida (ng/mL)			N	Concentração Média Obtida (ng/mL)	DP	CV (%)	ER (%)
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3					
200.00	202.11	204.86	199.15	15	202.96	4.34	2.14	1.48
	200.37	206.25	200.60					
	209.67	204.86	211.91					
	198.92	206.81	197.70					
	199.21	203.46	198.57					
500.00	505.68	503.30	498.19	15	500.40	7.71	1.54	0.20
	514.10	495.50	501.38					
	512.07	507.76	497.90					
	505.39	490.49	498.19					
	487.67	496.89	491.52					
800.00	821.45	801.75	847.70	15	812.33	19.81	2.44	1.54
	817.96	790.05	845.38					
	823.48	797.01	803.61					
	822.32	778.90	796.07					
	831.32	801.47	806.52					

Tabela 4: Precisão e exactidão inter-lote na quantificação de 3OMD em plasma de rato.

Concentração Nominal (ng/mL)	Concentração Obtida (ng/mL)			N	Concentração Média Obtida (ng/mL)	DP	CV (%)	ER (%)
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3					
200.00	211.29	211.76	203.87	15	212.14	4.56	2.15	6.07
	210.58	213.79	209.46					
	221.27	211.76	221.35					
	210.58	215.82	208.07					
	211.29	211.76	209.46					
500.00	519.99	516.59	511.48	15	516.08	8.09	1.57	0.21
	531.40	511.17	516.38					
	530.69	519.30	512.18					
	523.56	503.72	517.08					
	509.30	513.20	505.19					
800.00	852.22	819.39	868.73	15	836.94	22.19	2.65	4.62
	846.52	810.59	872.93					
	851.51	814.65	820.50					
	850.08	803.14	819.80					
	861.49	832.94	829.58					

1.1.3.3 Limites de quantificação e linearidade

O valor obtido para o LLOQ foi 100 ng/mL para a L-DOPA e para a 3OMD, enquanto que o valor obtido para o ULOQ foi 1000 ng/mL, para os mesmos analitos. Segundo FDA (2001), as variáveis *CV* e *ER* devem apresentar valores inferiores a 15 % para cada concentração avaliada, excepto para o LLOQ, que deve ser inferior a 20 %. Os valores de *CV* e de *ER* apresentaram-se inferiores a 15 % em toda a gama de concentrações avaliada, incluindo o LLOQ (tabela 5 e tabela 6).

A linearidade da metodologia analítica foi avaliada e considerada linear na gama de concentrações referida, entre 100 ng/mL e 1000 ng/mL. Para avaliar este parâmetro foram usadas as 3 curvas de calibração preparadas para a avaliação dos parâmetros de validação intra-lote e inter-lote. Cada curva de calibração consistiu em oito padrões – 100, 150, 200, 400 500 600, 800 e 1000 ng/mL – englobando toda a gama de concentrações, incluindo o LLOQ e o ULOQ. As curvas de calibração foram calculadas segundo o método dos mínimos quadrados. *R*, *m* e *a* foram calculados para todas as curvas avaliadas neste parâmetro de validação. A curva padrão média para a quantificação de L-DOPA e de 3OMD, resultante das três curvas padrão utilizadas para a validação do parâmetro linearidade, está representada na tabela 5 e na tabela 6, respectivamente.

Tabela 5: Limites de quantificação e linearidade na quantificação de L-DOPA em plasma de rato.

Concentração Nominal (ng/mL)	Altura de Pico (mV)			N	Altura de Pico Média (mV)			Concentração Média Obtida (ng/mL)	ER (%)
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3		DP	CV (%)			
100.00	3.17	3.08	3.19	3	3.15	0.06	1.86	104.26	4.26
150.00	4.75	4.84	4.61	3	4.73	0.12	2.45	149.68	-0.21
200.00	6.35	6.46	6.31	3	6.37	0.08	1.22	196.64	-1.68
400.00	13.24	13.67	14.01	3	13.64	0.39	2.83	404.68	1.17
500.00	16.82	16.75	16.59	3	16.72	0.12	0.71	492.86	-1.43
600.00	20.43	20.50	20.17	3	20.37	0.17	0.85	597.26	-0.46
800.00	27.87	27.94	27.05	3	27.62	0.49	1.79	804.92	0.62
1000.00	33.52	35.56	34.19	3	34.42	1.04	3.02	999.70	-0.03
<i>R</i>	1.00	1.00	1.00		1.00				
<i>m</i>	0.03	0.04	0.03		0.03				
<i>a</i>	-0.37	-0.72	-0.40		-0.49				

Tabela 6: Limites de quantificação e linearidade na quantificação de 3OMD em plasma de rato.

Concentração Nominal (ng/mL)	Altura de Pico (mV)			N	Média Altura de Pico (mV)	DP	CV (%)	Concentração Média Obtida (ng/mL)	ER (%)
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3						
100.00	1.66	1.63	1.76	3	1.68	0.07	4.04	102.70	2.70
150.00	2.29	2.40	2.40	3	2.36	0.06	2.69	150.04	0.03
200.00	3.02	3.08	3.08	3	3.06	0.03	1.13	198.54	-0.73
400.00	5.77	6.01	6.27	3	6.02	0.25	4.16	404.38	1.10
500.00	7.18	7.34	7.31	3	7.28	0.09	1.17	492.10	-1.58
600.00	8.71	8.82	8.87	3	8.80	0.08	0.93	598.15	-0.31
800.00	11.74	11.89	11.63	3	11.75	0.13	1.11	803.76	0.47
1000.00	14.04	15.02	14.67	3	14.58	0.50	3.41	1000.31	0.03
R	1.00	1.00	1.00		1.00				
m	0.01	0.01	0.01		0.01				
a	0.23	0.10	0.29		0.21				

Segundo o Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos para a Indústria (FDA, 2001) o valor 0.95 é o menor valor aceitável de correlação. A metodologia analítica utilizada mostrou que tem linearidade funcional entre as concentrações e as alturas dos picos nos cromatogramas obtidos para ambos os analitos, uma vez que todos os valores de *R* calculados foram cerca de 1.00.

1.1.4 Diluição

A possibilidade de diluição das amostras de plasma foi avaliada utilizando a concentração mais alta da gama de concentrações (1000 ng/mL), demonstrando que uma amostra pode ser diluída até 10 vezes (1:2, 1:5 e 1:10) com extracto de matriz branco. Os diferentes níveis de diluição foram preparados em triplicado. As concentrações calculadas resultantes das diferentes diluições estão apresentadas nas tabelas 7 e 8 para a quantificação de L-DOPA e de 3OMD, respectivamente.

Tabela 7: Diluição de amostras de plasma de rato, para a quantificação de L-DOPA.

Concentração Nominal (ng/mL)	Factor Diluição	Concentração Obtida (ng/mL)	N	Concentração Média Obtida (ng/mL)	DP	CV (%)	ER (%)
1000.00	2.00	1016.96	3	1015.80	2.00	0.20	1.58
		1013.49					
		1016.96					
1000.00	5.00	1054.42	3	1055.38	4.42	0.42	5.54
		1051.53					
		1060.20					
1000.00	10.00	1108.18	3	1114.92	9.30	0.83	11.49
		1125.53					
		1111.07					

Tabela 8: Diluição de amostras de plasma de rato, para a quantificação de 3OMD.

Concentração Nominal (ng/mL)	Factor Diluição	Concentração Obtida (ng/mL)	N	Concentração Média Obtida (ng/mL)	DP	CV (%)	ER (%)
1000.00	2.00	1024.88	3	1028.17	3.55	0.34	2.82
		1031.93					
		1027.70					
1000.00	5.00	1089.43	3	1095.30	7.33	0.67	9.53
		1092.95					
		1103.52					
1000.00	10.00	1150.03	3	1173.52	21.53	1.83	17.35
		1192.31					
		1178.22					

O valor de *ER* calculado para a quantificação de 3OMD numa amostra diluída 1:10 foi 17.35. A quantificação da amostra sujeita a este factor de diluição atinge o LLOQ da metodologia analítica, pelo que o valor de *ER* a este nível pode atingir 20 %. Segundo o Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos para a Indústria (FDA, 2001), *CV* e *ER* devem apresentar valores inferiores a 15 % para todas as concentrações avaliadas, excepto para o menor limite de quantificação, que pode ser inferior a 20 % (FDA, 2001). Assim, todos os valores encontrados estão de acordo com o critério de aceitação.

1.1.5 Recuperação

O parâmetro recuperação da metodologia analítica foi avaliado em plasma de rato para as concentrações de 200 ng/mL, 500 ng/mL e 800 ng/mL de L-DOPA e de 3OMD. O processo de extração dos analitos do plasma apresentou uma eficiência de cerca de 100 %. Os valores da recuperação variaram entre 98.06 % e 99.93 % para a L-DOPA, e entre 96.70 % e 98.77 % para a 3OMD. Os valores individuais das recuperações para a L-DOPA e para a 3OMD estão apresentados na tabela 9 e tabela 10, respectivamente.

Tabela 9: Recuperação de L-DOPA em plasma de rato.

Concentração Nominal (ng/mL)	Recuperação Obtida (%)	N	Média Recup. Obtida (ng/mL)	DP	CV (%)
200.00	96.92	5.00	98.06	1.96	2.00
	96.42				
	101.23				
	97.08				
	98.61				
500.00	95.43	5.00	98.19	2.14	2.18
	100.97				
	99.16				
	98.58				
	96.78				
800.00	97.89	5.00	99.93	1.28	1.28
	99.76				
	100.86				
	99.96				
	101.16				

Tabela 10: Recuperação de 3OMD em plasma de rato.

Concentração Nominal (ng/mL)	Recuperação Obtida (%)	N	Média Recup. Obtida (ng/mL)	DP	CV (%)
200.00	97.13	5.00	96.70	1.19	1.23
	95.57				
	98.39				
	95.56				
	96.83				
500.00	93.96	5.00	97.03	2.28	2.35
	99.73				
	98.65				
	96.94				
	95.88				
800.00	96.39	5.00	98.77	1.47	1.48
	98.72				
	99.75				
	98.81				
	100.17				

1.1.6 Estabilidade

A estabilidade de L-DOPA e de 3OMD em amostras de plasma de rato foi avaliada a dois níveis de concentração – 200 ng/mL e 800 ng/mL – dos referidos analitos. As amostras de plasma (N=5) foram sujeitas a diferentes períodos de permanência – 1, 7 ou 14 dias – às diferentes condições de armazenamento – TA, 4 °C, -20 °C e -80 °C. A L-DOPA e a 3OMD mostraram-se estáveis em plasma de rato, em todos os testes de estabilidade efectuados às temperaturas de -20 °C e -80 °C. No entanto, a L-DOPA não se mostrou estável à TA durante 14 dias. O mesmo se verificou com a 3OMD, que não se mostrou estável em plasma de rato, após 14 dias à TA ou a 4 °C. Os valores individuais das concentrações de L-DOPA e de 3OMD e variações percentuais em relação ao tempo zero, verificadas para os diferentes tipos de testes de estabilidade efectuados, estão representados nas tabelas 11 e 12.

Tabela 11: Estabilidade de L-DOPA em plasma de rato.

Temperatura (°C)	Dia	Concentração		N	Concentração Média Obtida (ng/mL)	DP	CV (%)	ER (%)	Diferença (%)
		Nominal (ng/mL)							
NA	0	200		5	203.38	2.26	1.11	1.69	-
		800		5	819.25	6.23	0.76	2.41	-
TA	1	200		5	197.52	2.12	1.07	-1.24	-2.88
		800		5	807.86	10.35	1.28	0.98	-1.39
	7	200		5	199.77	2.95	1.48	-0.11	-1.77
		800		5	743.94	14.34	1.93	-7.01	-9.19
14	200		5	15.00	0.00	0.00	-92.50	-92.63	
	800		5	146.42	1.69	1.15	-81.70	-82.13	
4	1	200		5	197.04	2.34	1.19	-1.48	-3.12
		800		5	807.39	6.91	0.86	0.92	-1.45
	7	200		5	216.45	1.98	0.92	8.23	6.43
		800		5	831.60	67.65	8.14	3.95	1.51
14	200		5	201.40	2.76	1.37	0.70	-0.98	
	800		5	787.75	12.04	1.53	-1.53	-3.84	
-20	1	200		5	199.06	3.22	1.62	-0.47	-2.12
		800		5	816.77	38.36	4.70	2.10	-0.30
	7	200		5	217.82	2.44	1.12	8.91	7.10
		800		5	815.33	16.97	2.08	1.92	-0.48
14	200		5	207.95	1.86	0.90	3.98	2.25	
	800		5	844.20	9.86	1.17	5.52	3.05	
-80	1	200		5	195.14	3.83	1.96	-2.43	-4.05
		800		5	785.95	7.30	0.93	-1.76	-4.06
	7	200		5	212.40	2.70	1.27	6.20	4.43
		800		5	805.16	5.31	0.66	0.65	-1.72
14	200		5	203.27	3.56	1.75	1.64	-0.05	
	800		5	803.67	10.67	1.33	0.46	-1.90	

Tabela 12: Estabilidade de 3OMD em plasma de rato.

Temperatura (°C)	Dia	Concentração Nominal (ng/mL)	N	Concentração Média Obtida (ng/mL)	DP	CV (%)	ER (%)	Diferença (%)
NA	0	200	5	206.65	3.44	1.67	3.32	-
		800	5	828.74	5.36	0.65	3.59	-
	1	200	5	211.89	3.16	1.49	5.95	2.54
		800	5	831.51	13.63	1.64	3.94	0.33
TA	7	200	5	232.99	4.66	2.00	16.50	12.75
		800	5	840.71	22.32	2.66	5.09	1.45
	14	200	5	284.93	7.09	2.49	42.47	37.88
		800	5	899.00	8.45	0.94	12.38	8.48
4	1	200	5	209.86	1.70	0.81	4.93	1.55
		800	5	819.87	11.13	1.36	2.48	-1.07
	7	200	5	224.26	4.33	1.93	12.13	8.52
		800	5	873.27	67.84	7.77	9.16	5.37
-20	14	200	5	239.73	6.55	2.73	19.86	16.01
		800	5	884.94	9.20	1.04	10.62	6.78
	1	200	5	211.08	4.62	2.19	5.54	2.14
		800	5	833.40	37.47	4.50	4.17	0.56
-80	7	200	5	216.58	3.46	1.60	8.29	4.81
		800	5	834.20	19.20	2.30	4.28	0.66
	14	200	5	220.31	1.38	0.62	10.15	6.61
		800	5	893.31	10.07	1.13	11.66	7.79
-80	1	200	5	206.07	2.59	1.26	3.04	-0.28
		800	5	796.06	8.92	1.12	-0.49	-3.94
	7	200	5	209.42	5.10	2.43	4.71	1.34
		800	5	813.62	11.75	1.44	1.70	-1.82
14	200	5	206.08	6.05	2.93	3.04	-0.28	
	800	5	831.03	14.15	1.70	3.88	0.28	

1.2 Dialisado

A validação da metodologia analítica para a quantificação de L-DOPA e de 3OMD em amostras de dialisado foi realizada com base na metodologia previamente validada em plasma de rato.

Os cromatogramas típicos obtidos por HPLC-ED para a L-DOPA e para a 3OMD em amostras de dialisado podem ser observados na figura 15. Os tempos de retenção de L-DOPA e de 3OMD em amostras de dialisado foram semelhantes aos obtidos em amostras de plasma.

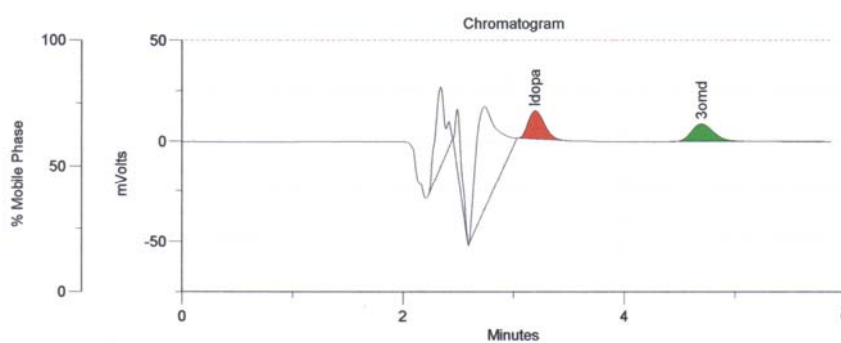


Figura 15: Cromatograma obtido por HPLC-ED para a L-DOPA e para a 3OMD em dialisado: amostra de uma curva padrão na concentração de 100 ng/mL.

1.2.1 Selectividade

A selectividade foi avaliada através da análise de 5 amostras branco de matriz, provenientes de diferentes lotes de dialisado.

Não foram observados picos que pudessem comprometer a selectividade da metodologia analítica para a quantificação de L-DOPA e de 3OMD. A figura 16 mostra um cromatograma típico de uma matriz branco de dialisado

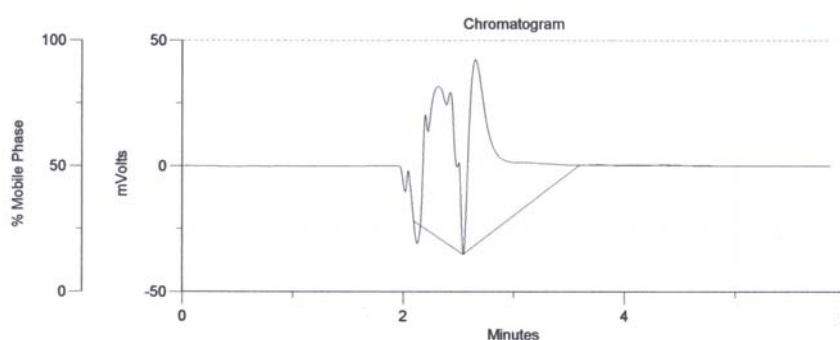


Figura 16: Cromatograma de matriz branco de dialisado.

1.2.2 Carryover

As injecções das amostras com as concentrações mais altas da gama analítica (150 e 200 ng/mL) não interferiram na análise das amostras consecutivas de matriz branco de dialisado analisados. As amostras de matriz branco de dialisado não apresentaram picos eluindo aos mesmos tempos de retenção que a L-DOPA ou a 3OMD.

1.2.3 Precisão e exactidão

A precisão e exactidão da metodologia analítica para quantificação de L-DOPA e de 3OMD em amostras de dialisado foram avaliadas ao longo da gama de concentrações entre 10 e 200 ng/mL. A precisão e a exactidão foram avaliadas em três níveis de concentrações: baixa – 20 ng/mL, média – 50 ng/mL e alta – 150 ng/mL. Em todos os ensaios efectuados nesta gama de concentrações, o *CV* e o *ER* apresentaram valores inferiores a 15 % para cada concentração avaliada, estando de acordo com o critério de aceitação (FDA, 2001), demonstrando que o método é preciso e exacto quando aplicado em dias de ensaio diferentes.

1.2.3.1 Intra-lote

A precisão calculada no parâmetro intra-lote, expressa por *CV*, variou entre 1.01 % e 2.22 % para a L-DOPA e entre 0.73 % e 1.88 % para a 3OMD. A exactidão, expressa por *ER*, variou para a L-DOPA entre -1.24 % e -0.26 % enquanto que para a 3OMD variou de -2.35 % a 1.46 %. Os valores individuais podem ser visualizados nas tabelas 13 e 14.

Tabela 13: Precisão e exactidão intra-lote para a quantificação de L-DOPA em dialisado.

Concentração Nominal (ng/mL)	Concentração Obtida (ng/mL)	N	Concentração Média Obtida (ng/mL)	DP	CV (%)	ER (%)
20.00	19.35	5	19.95	0.44	2.22	-0.26
	20.04					
	20.58					
	19.96					
	19.81					
50.00	49.10	5	49.66	0.50	1.01	-0.67
	50.02					
	50.32					
	49.56					
	49.33					
150.00	151.40	5	148.14	2.31	1.56	-1.24
	145.94					
	148.25					
	149.17					
	145.94					

Tabela 14: Precisão e exactidão intra-lote para a quantificação de 3OMD em dialisado.

Concentração Nominal (ng/mL)	Concentração Obtida (ng/mL)	N	Concentração Média Obtida (ng/mL)	DP	CV (%)	ER (%)
20.00	19.72	5	20.29	0.38	1.88	1.46
	20.48					
	20.48					
	20.67					
	20.10					
50.00	49.83	5	50.06	0.37	0.73	0.11
	50.02					
	50.59					
	49.64					
	50.21					
150.00	148.16	5	146.48	1.51	1.03	-2.35
	145.11					
	147.59					
	146.83					
	144.73					

1.2.3.2 Inter-lote

O CV, calculado através do parâmetro inter-lote, variou entre 1.21 % e 2.84 % para a L-DOPA e entre 1.59 % e 4.44 % para a 3OMD. O ER variou para a L-DOPA entre -1.06 % e 1.99 % enquanto que para a 3OMD variou de -1.83 % a 2.01 %. Os valores individuais podem ser visualizados nas tabelas 15 e 16.

Tabela 15: Precisão e exactidão inter-lote para a quantificação de L-DOPA em dialisado.

Concentração Nominal (ng/mL)	Concentração Obtida (ng/mL)			N	Concentração Média Obtida (ng/mL)	DP	CV (%)	ER (%)
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3					
20.00	19.35	20.65	19.38	15	19.96	0.57	2.84	-0.21
	20.04	20.26	19.38					
	20.58	20.57	19.30					
	19.96	20.73	19.23					
	19.81	20.57	19.54					
50.00	49.10	50.34	49.67	15	49.86	0.87	1.75	1.99
	50.02	50.73	48.80					
	50.32	50.73	48.88					
	49.56	50.96	48.88					
	49.33	51.50	49.04					
150.00	151.40	149.71	148.71	15	148.41	1.79	1.21	-1.06
	145.94	150.33	149.50					
	148.25	148.08	147.36					
	149.17	150.79	145.70					
	145.94	146.92	148.31					

Tabela 16: Precisão e exactidão inter-lote para a quantificação de 3OMD em dialisado.

Concentração Nominal (ng/mL)	Concentração Obtida (ng/mL)			N	Concentração Média Obtida (ng/mL)	DP	CV (%)	ER (%)
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3					
20.00	19.72	20.16	19.20	15	20.00	0.89	4.44	-0.01
	20.48	20.94	18.80					
	20.48	19.97	18.40					
	20.67	21.71	19.39					
	20.10	20.74	19.20					
50.00	49.83	51.55	49.45	15	50.31	1.43	2.85	2.01
	50.02	52.13	48.66					
	50.59	51.74	47.67					
	49.64	52.13	49.05					
	50.21	52.52	49.45					
150.00	148.16	151.52	145.94	15	147.25	2.35	1.59	-1.83
	145.11	149.58	146.93					
	147.59	149.39	145.15					
	146.83	150.35	142.77					
	144.73	148.03	146.73					

1.2.3.3 Limites de quantificação e linearidade

O valor obtido para o LLOQ foi 10 ng/mL para a L-DOPA e para a 3OMD, enquanto que o valor obtido para o ULOQ foi 200 ng/mL, para os mesmos analitos. Segundo FDA (2001), as variáveis *CV* e *ER* devem apresentar valores inferiores a 15 % para cada concentração avaliada, excepto para o LLOQ, que pode ser inferior a 20 %. Os valores de *CV* e de *ER* apresentaram-se inferiores a 15 % em toda a gama de concentrações avaliada, incluindo o LLOQ (tabela 17 e tabela 18).

A linearidade da metodologia analítica foi avaliada e considerada linear na gama de concentrações referida previamente (entre 10 ng/mL e 200 ng/mL). Este parâmetro foi avaliado, usando as 3 curvas de calibração preparadas para a avaliação dos parâmetros de validação intra-lote e inter-lote. Cada curva de calibração consistiu em oito padrões – 10, 15, 20, 40 50 100, 150 e 200 ng/mL – englobando toda a gama de concentrações, incluindo o LLOQ e o ULOQ. As curvas de calibração foram calculadas segundo o método dos mínimos quadrados. *R*, *m* e *a* foram calculados para todas as curvas avaliadas neste parâmetro de validação. A curva padrão média para a quantificação de L-DOPA e de 3OMD, resultante das três curvas padrão utilizadas para a validação do parâmetro linearidade, está representada na tabela 17 e na tabela 18, respectivamente.

Tabela 17: Limites de quantificação e linearidade para o método de quantificação de L-DOPA em dialisado.

Concentração Nominal (ng/mL)	Altura de Pico (mV)			N	Altura de Pico Média (mV)			Concentração Média Obtida (ng/mL)	<i>ER</i> (%)
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3		<i>DP</i>	<i>CV</i> (%)			
10.00	1.48	1.45	1.47	3	1.47	0.02	1.04	9.52	-4.75
15.00	2.11	2.07	2.20	3	2.13	0.07	3.13	14.66	-2.26
20.00	2.82	2.71	2.76	3	2.76	0.06	1.99	19.61	-1.93
40.00	5.48	5.44	5.36	3	5.43	0.06	1.13	40.34	0.85
50.00	6.80	6.70	6.78	3	6.76	0.05	0.78	50.71	1.43
100.00	13.40	13.26	13.11	3	13.26	0.15	1.09	101.27	1.27
150.00	19.64	19.31	19.10	3	19.35	0.27	1.41	148.68	-0.88
200.00	26.24	26.15	25.52	3	25.97	0.39	1.51	200.20	0.10
<i>R</i>	1.00	1.00	1.00		1.00				
<i>m</i>	0.13	0.13	0.13		0.13				
<i>a</i>	0.23	0.18	0.32		0.24				

Tabela 18: Limites de quantificação e linearidade para o método de quantificação de 3OMD em dialisado.

Concentração Nominal (ng/mL)	Altura de Pico (mV)			N	Altura de Pico Média (mV)	DP	CV (%)	Concentração Média Obtida (ng/mL)	ER (%)
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3						
10.00	0.63	0.64	0.68	3	0.65	0.03	4.07	9.03	-9.72
15.00	0.94	0.89	0.96	3	0.93	0.04	3.88	14.46	-3.61
20.00	1.23	1.21	1.20	3	1.21	0.02	1.26	19.95	-0.23
40.00	2.33	2.27	2.21	3	2.27	0.06	2.64	40.45	1.12
50.00	2.84	2.80	2.88	3	2.84	0.04	1.41	51.51	3.01
100.00	5.47	5.44	5.25	3	5.39	0.12	2.21	100.90	0.90
150.00	7.98	7.77	7.71	3	7.82	0.14	1.81	148.10	-1.27
200.00	10.68	10.53	10.37	3	10.53	0.16	1.47	200.60	0.30
R	1.00	1.00	1.00		1.00				
m	0.05	0.05	0.05		0.05				
a	0.18	0.17	0.21		0.18				

A metodologia analítica utilizada mostrou que tem linearidade funcional entre as concentrações e as alturas dos picos nos cromatogramas obtidos para ambos os analitos, uma vez que todos os valores de *R* calculados foram de cerca de 1.00. Segundo o Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos para a Indústria (FDA, 2001) o valor 0.95 é o menor valor aceitável de correlação.

1.2.4 Diluição

O parâmetro de validação diluição foi avaliado utilizando a concentração mais alta da gama de concentrações (200 ng/mL), demonstrando que uma amostra de dialisado pode ser diluída até 10 vezes (1:2, 1:5 e 1:10) com matriz branco. Os diferentes níveis de diluição foram preparados em triplicado. As concentrações calculadas resultantes das diferentes diluições estão apresentadas nas tabelas 19 e 20 para a quantificação de L-DOPA e de 3OMD, respectivamente.

Tabela 19: Diluição de amostras de dialisado, para a quantificação de L-DOPA.

Concentração Nominal (ng/mL)	Factor Diluição	Concentração Obtida (ng/mL)	N	Concentração Média Obtida (ng/mL)	DP	CV (%)	ER (%)
200.00	2.00	201.82	3	198.34	3.38	1.70	-0.83
		195.07					
		198.12					
200.00	5.00	202.10	3	210.40	17.24	8.19	5.20
		230.21					
		198.88					
200.00	10.00	200.15	3	196.13	3.68	1.88	-1.93
		195.33					
		192.92					

Tabela 20: Diluição de amostras de dialisado, para a quantificação de 3OMD.

Concentração Nominal (ng/mL)	Factor Diluição	Concentração Obtida (ng/mL)	N	Concentração Média Obtida (ng/mL)	DP	CV (%)	ER (%)
200.00	2.00	202.88	3	198.34	4.55	2.29	-0.83
		193.79					
		198.34					
200.00	5.00	203.37	3	212.33	15.51	7.31	6.16
		230.24					
		203.37					
200.00	10.00	193.84	3	190.40	3.16	1.66	-4.80
		187.64					
		189.71					

CV e ER apresentaram valores inferiores a 15 % para todas as concentrações avaliadas, pelo que estão de acordo com o critério de aceitação (FDA, 2001).

1.2.5 Estabilidade

A estabilidade de L-DOPA e de 3OMD em amostras de dialisado foi avaliada a dois níveis de concentração – 20 ng/mL e 150 ng/mL – dos referidos analitos. As amostras de dialisado (N=5) foram sujeitas a diferentes períodos de permanência – 1, 7 ou 14 dias – às diferentes condições de armazenamento – TA, 4 °C, -20 °C e -80 °C. A L-DOPA e a 3OMD mostraram-se estáveis em dialisado, em todos os testes de estabilidade efectuados. Os valores individuais das concentrações de L-DOPA e de 3OMD e as variações percentuais em relação ao tempo zero verificadas para os diferentes tipos de testes de estabilidade efectuados estão representados nas tabelas 21 e 22.

Tabela 21: Estabilidade de L-DOPA em dialisado.

Temperatura (°C)	Dia	Concentração		N	Concentração Média Obtida (ng/mL)	DP	CV (%)	ER (%)	Diferença (%)
		Nominal (ng/mL)							
NA	0	20		5	19.45	0.43	2.19	-2.75	-
		150		5	148.21	1.11	0.75	-1.19	-
TA	1	20		5	18.69	0.21	1.15	-6.56	-3.91
		150		5	142.72	2.72	1.91	-4.86	-3.71
	7	20		5	17.53	1.61	9.21	-12.33	-9.85
		150		5	135.27	4.56	3.37	-9.82	-8.73
14	20		5	14.79	0.43	2.90	-26.03	-23.94	
	150		5	135.32	2.90	2.15	-9.79	-8.70	
4	1	20		5	18.64	0.31	1.68	-6.81	-4.17
		150		5	142.98	2.54	1.77	-4.68	-3.53
	7	20		5	18.49	0.26	1.38	-7.55	-4.93
		150		5	152.76	11.02	7.21	1.84	3.07
14	20		5	19.41	0.23	1.17	-2.96	-0.21	
	150		5	147.25	0.84	0.57	-1.84	-0.65	
-20	1	20		5	19.30	0.32	1.68	-3.50	-0.77
		150		5	144.52	3.14	2.17	-3.65	-2.49
	7	20		5	18.66	0.44	2.36	-6.69	-4.05
		150		5	145.17	2.80	1.93	-3.22	-2.05
14	20		5	18.40	0.18	0.99	-7.98	-5.37	
	150		5	150.94	1.36	0.90	0.63	1.84	
-80	1	20		5	19.10	0.26	1.35	-4.49	-1.79
		150		5	144.55	1.70	1.17	-3.63	-2.47
	7	20		5	18.76	0.56	2.98	-6.20	-3.54
		150		5	146.02	2.33	1.60	-2.66	-1.48
14	20		5	19.36	0.20	1.03	-3.19	-0.45	
	150		5	150.39	1.66	1.10	0.26	1.47	

Tabela 22: Estabilidade de 3OMD em dialisado.

Temperatura (°C)	Dia	Concentração Nominal (ng/mL)	N	Concentração Média Obtida (ng/mL)	DP	CV (%)	ER (%)	Diferença (%)
NA	0	20	5	19.81	0.34	1.74	-0.96	-
		150	5	147.96	1.28	0.86	-1.36	-
TA	1	20	5	17.59	0.34	1.92	-12.03	-11.18
		150	5	140.89	2.77	1.97	-6.07	-4.78
	7	20	5	14.87	1.42	9.54	-25.67	-24.95
		150	5	132.55	3.79	2.86	-11.63	-10.41
	14	20	5	19.30	0.43	2.21	-3.51	-2.58
		150	5	148.27	2.50	1.69	-1.15	0.21
4	1	20	5	18.36	0.49	2.67	-8.19	-7.31
		150	5	142.30	2.22	1.56	-5.13	-3.83
	7	20	5	17.47	0.34	1.97	-12.66	-11.82
		150	5	144.25	9.89	6.86	-3.83	-2.51
	14	20	5	19.62	0.33	1.68	-1.91	-0.96
		150	5	146.63	1.53	1.05	-2.25	-0.90
-20	1	20	5	19.26	0.70	3.62	-3.72	-2.79
		150	5	144.73	3.87	2.67	-3.51	-2.19
	7	20	5	18.23	0.25	1.39	-8.85	-7.97
		150	5	142.29	2.83	1.99	-5.14	-3.83
	14	20	5	19.28	0.27	1.38	-3.61	-2.68
		150	5	150.17	2.28	1.52	0.11	1.49
-80	1	20	5	19.38	0.67	3.44	-3.08	-2.14
		150	5	145.84	1.71	1.17	-2.78	-1.44
	7	20	5	18.61	0.33	1.78	-6.94	-6.04
		150	5	144.80	2.12	1.47	-3.47	-2.14
	14	20	5	19.32	0.35	1.81	-3.40	-2.47
		150	5	149.29	1.32	0.88	-0.47	0.90

Os resultados obtidos permitiram verificar que a L-DOPA e a 3OMD em amostras de plasma ou dialisado podem ser consideradas estáveis, quando armazenadas a temperaturas entre -80 °C e -20 °C, por um período não superior a 14 dias. As amostras provenientes dos estudos em animais foram quantificadas dentro do prazo estabelecido por este estudo.

2 Estudos de recuperação das sondas de microdiálise

2.1 Recuperação *in vitro*

2.1.1 Influência do fluxo de perfusão

A influência do fluxo de perfusão na recuperação das sondas de MD foi avaliada pela técnica de ganho *in vitro*. A recuperação relativa das sondas (N=4) diminui com o aumento do fluxo de perfusão. As médias das recuperações obtidas com os diferentes fluxos foram significativamente diferentes ($p < 0.05$), quando comparadas entre si. Os valores de recuperação obtidos com o fluxo 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ foram cerca de 2 a 3 vezes superiores aos obtidos com os fluxos 2 ou 3 $\mu\text{L}/\text{min}$, respectivamente – tabela 23 e figura 17. Este comportamento foi verificado para ambas as concentrações dos analitos avaliadas (500 ng/mL e 1000 ng/mL). Os valores individuais das recuperações obtidos para cada sonda de MD estão apresentados na tabela 23.

Tabela 23: Influência do fluxo de perfusão na recuperação das sondas de MD.

Recuperação (%)		L-DOPA						3OMD					
		500 (ng/mL)			1000 (ng/mL)			500 (ng/mL)			1000 (ng/mL)		
Fluxo ($\mu\text{L}/\text{min}$)		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Sonda	# 1	40.25	19.76	12.10	38.14	24.56	13.92	49.54	25.59	18.62	41.80	28.48	18.35
	# 2	28.67	14.82	7.78	33.64	16.39	9.32	38.08	22.08	14.74	39.80	20.96	13.47
	# 3	32.27	15.57	9.58	30.96	17.59	12.96	33.64	17.91	13.75	34.78	19.71	15.28
	# 4	31.89	18.41	12.61	30.16	16.17	12.41	32.14	21.06	13.67	31.12	19.17	14.32
Média		33.27	17.14	10.52	33.23	18.68	12.15	38.35	21.66	15.19	36.87	22.08	15.35
DP		4.92	2.34	2.26	3.60	3.97	1.99	7.88	3.16	2.33	4.84	4.33	2.13

Os valores individuais de recuperação estão apresentados em média aritmética (N=3).

A relação inversa entre o fluxo de perfusão e a recuperação das sondas de MD deve-se ao facto de o aumento do fluxo fazer diminuir o equilíbrio entre os meios externo e interno. Assim, a passagem do analito para o interior da sonda de MD diminui, fazendo com que também diminua a recuperação da referida sonda (Benveniste e Hüttemeier, 1990; Johansen e col., 1997).

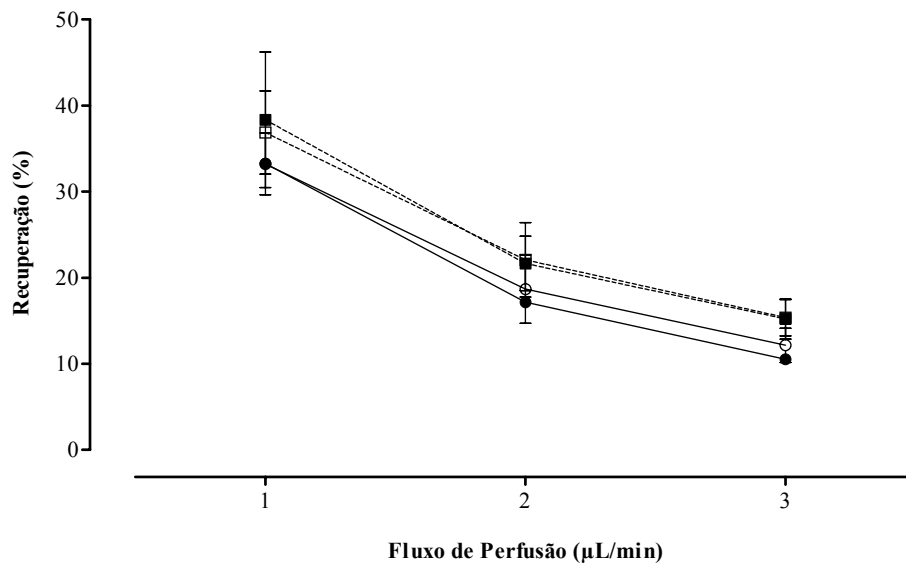


Figura 17: Influência do fluxo de perfusão na recuperação das sondas de MD. A recuperação das sondas foi avaliada para a L-DOPA (—) às concentrações de 500 ng/mL (●) e 1000 ng/mL (○) e para a 3OMD (---) às concentrações de 500 ng/mL (■) e 1000 ng/mL (□). Os valores estão apresentados em média aritmética $\pm DP$ (N=4).

2.1.2 Influência da concentração dos analitos

A técnica de ganho *in vitro* foi usada para avaliar a influência da concentração dos analitos na recuperação das sondas de MD. As sondas de MD avaliadas (N=4) mostraram ter o mesmo comportamento em toda a gama de concentrações de L-DOPA e de 3OMD avaliada. Os valores de recuperação obtidos em cada sonda foram semelhantes para todas as concentrações dos analitos avaliadas (200, 400, 2000 e 4000 ng/mL). As médias das recuperações obtidas para as diferentes concentrações dos analitos não foram significativamente diferentes ($p < 0.05$), quando comparadas entre si. Os valores individuais das recuperações obtidos para cada sonda estão apresentados na tabela 24 e representados graficamente na figura 18.

Tabela 24: Influência da concentração dos analitos na recuperação das sondas de MD. A recuperação das sondas (N=4) foi avaliada para a L-DOPA e para a 3OMD às concentrações de 200, 400, 2000 e 4000 ng/mL.

Recuperação (%)		L-DOPA				3OMD			
		200	400	2000	4000	200	400	2000	4000
Sonda	Conc. (ng/mL)								
	# 1	28.45	25.45	25.66	25.54	25.65	25.37	23.87	23.71
	# 2	20.75	20.41	19.37	21.24	22.96	21.67	20.96	21.69
	# 3	17.80	nd	17.16	19.04	18.99	nd	19.62	19.77
# 4	20.94	nd	20.44	20.35	21.22	nd	23.41	22.44	
Média		21.98	22.93	20.66	21.54	22.20	23.52	21.96	21.90
DP		4.54	3.57	3.60	2.82	2.82	2.61	2.02	1.65

Os valores individuais de recuperação estão apresentados em média aritmética (N=3).

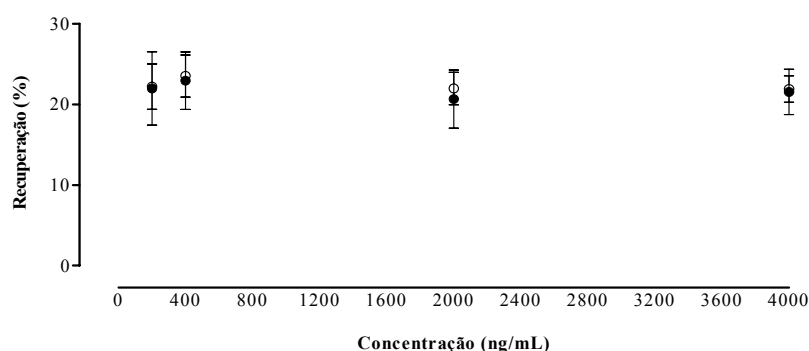


Figura 18: Influência da concentração dos analitos na recuperação das sondas de MD. A recuperação foi avaliada para a L-DOPA (●) e para a 3OMD (○) às concentrações de 200, 400, 2000 e 4000 ng/mL. Os valores estão apresentados em média aritmética \pm DP (N=4).

2.1.3 Técnica de perda *versus* técnica de ganho

Os valores de perda relativa dos analitos foram comparados com os valores de recuperação por ganho durante uma MD normal. As diferentes técnicas de recuperação foram comparadas, usando soluções de L-DOPA e de 3OMD à concentração de 1000 ng/mL.

As sondas de MD avaliadas (N=5) mostraram ter a mesma taxa de recuperação *in vitro* quando avaliadas pela técnica de perda ou pela técnica de ganho. A média dos valores de recuperação obtidos pela técnica de ganho não foi significativamente diferente ($p < 0.05$) da média dos valores obtidos pela técnica de perda. As razões entre os valores de recuperação obtidos através das duas diferentes técnicas são sempre da ordem de 1. Os valores individuais das recuperações obtidas para cada sonda de MD avaliada, em cada diferente técnica de teste de recuperação, estão apresentados na tabela 25.

Tabela 25: Comparação entre as técnicas de recuperação por ganho e por perda.

Recuperação %	L-DOPA			3OMD		
	Sonda	Ganho	Perda	Razão Perda/Ganho	Ganho	Perda
# 1	30.05	29.15	0.97	26.08	26.89	1.03
# 2	15.23	16.28	1.07	21.46	21.32	0.99
# 3	28.11	28.59	1.02	35.53	34.23	0.96
# 4	24.43	23.25	0.95	28.16	25.34	0.90
# 5	20.20	22.18	1.10	28.32	29.69	1.05
Média	23.60	23.89		27.91	27.49	
DP	6.00	5.27		5.08	4.83	

Os valores individuais de recuperação estão apresentados em média aritmética (N=3).

2.2 Recuperação *in vivo*

A realização de testes de recuperação *in vivo* foi imprescindível para uma exacta avaliação das concentrações de L-DOPA e de 3OMD livres em circulação sanguínea. A determinação da recuperação das sondas de MD *in vivo* foi elaborada através método de retrodiálise. Neste método, assume-se que as taxas de perda e ganho dos analitos são semelhantes (Elmqvist e Sawchuk, 1997), o que foi observado para a L-DOPA e para a 3OMD nas condições *in vitro* avaliadas.

A recuperação *in vivo* foi determinada, perfundindo-se as sondas implantadas na veia jugular direita de animais não tratados. As sondas (N=5) foram perfundidas com soluções de Ringer contendo L-DOPA e 3OMD à concentração 1000 ng/mL. Os resultados de recuperação das sondas de MD *in vivo* obtidos foram 23.98 ± 5.61 % para a L-DOPA e 27.08 ± 5.41 % para a 3OMD. Os valores individuais das recuperações obtidas para cada sonda avaliada estão apresentados na tabela 26.

Tabela 26: Recuperação das sondas de microdiálise *in vitro* e *in vivo*.

Recuperação (%)	L-DOPA			3OMD		
	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>	Razão <i>in vivo/in vitro</i>	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>	Razão <i>in vivo/in vitro</i>
Sonda						
1	29.15	29.55	1.01	26.89	24.52	0.91
2	16.28	15.76	0.97	21.32	20.99	0.98
3	28.59	28.94	1.01	34.23	34.69	1.01
4	23.25	23.11	0.99	25.34	24.91	0.98
5	22.18	22.53	1.02	29.69	30.30	1.02
Média	23.89	23.98		27.49	27.08	
DP	5.27	5.61		4.83	5.40	

Os valores individuais de recuperação estão apresentados em média aritmética (N=3).

A média dos valores de recuperação obtidos *in vivo* não foi significativamente diferente ($p < 0.05$) da média dos valores obtidos *in vitro*. As razões entre os valores de recuperação obtidos *in vivo* e *in vitro* foram sempre da ordem de 1. Assim, o comportamento das sondas de MD *in vivo* poderá ser equiparado ao comportamento *in vitro*, nas mesmas condições de fluxo de perfusão e para mesma gama de concentrações de L-DOPA e de 3OMD.

2.3 Integridade das sondas de microdiálise

A integridade das sondas de MD durante o tempo que decorreram as experiências de farmacocinética foi evidenciada através da comparação entre as recuperações de cada sonda, antes e após terem sido utilizadas nas referidas experiências *in vivo*. A recuperação das sondas de MD (N=5) foi efectuada pela técnica de ganho *in vitro*.

Tabela 27: Integridade das sondas de MD.

Recuperação (%)	L-DOPA			3OMD		
	Sonda	0 dias	3 dias	Diferença %	0 dias	3 dias
1	20.42	21.05	3.07	38.56	37.16	-3.63
2	21.91	21.57	-1.54	20.74	23.01	10.94
3	30.53	27.93	-8.51	31.45	32.10	2.08
4	30.41	31.96	5.08	29.30	31.33	6.90
5	17.76	18.92	6.55	18.79	20.77	10.55
Média	24.21	24.29		27.77	28.87	
DP	5.91	5.45		8.10	6.80	

Os valores individuais de recuperação estão apresentados em média aritmética (N=3).

A média dos valores de recuperação das sondas antes das colheitas *in vivo* não foi significativamente diferente ($p < 0.05$) da média dos valores de recuperação das mesmas sondas após os 3 dias de experiência nos animais. As percentagens de diferença variaram entre -8.51 % e 6.55 % para a L-DOPA e entre -3.63 % e 10.94 % para a 3OMD. Os valores individuais das recuperações obtidas para cada sonda estão apresentados na tabela 27.

2.4 Concentração livre *versus* concentração total

Entre outros componentes, o plasma sanguíneo contém proteínas às quais se ligam, em algum grau, a maioria dos fármacos. Os complexos fármaco-proteína são moléculas muito grandes, com dificuldade em atravessar as membranas celulares, sendo a fracção livre de fármaco a que atinge o local de acção. Portanto, as moléculas de fármaco livres são as responsáveis pela produção do efeito farmacológico (Mehvar, 2005).

Nas últimas décadas, as concentrações vasculares totais de fármacos têm sido medidas e interpretadas terapêuticamente. Este tipo de resultados pode não ser muito útil, uma vez que reflectem as concentrações de fármacos híbridas (livres e ligados a proteínas).

A utilização da técnica de MD têm-se mostrado útil como alternativa para a determinação das concentrações livres de fármacos directamente nos seus locais de acção, tendo resolvido a ambiguidade referida no parágrafo anterior (De la Penã e col., 2000). Sarre e col. (1995) usaram a técnica de MD para determinar a concentração de L-DOPA em plasma de cão. Os autores validaram a técnica de quantificação de L-DOPA em plasma, tendo verificado que os níveis de L-DOPA livre em circulação sanguínea obtidos por MD não diferiam dos níveis obtidos pela colheita tradicional de sangue.

A relação entre a concentração livre e total plasmática dos fármacos é normalmente constante, independentemente das suas concentrações plasmáticas totais (Mehvar, 2005).

Neste trabalho estudou-se a relação entre a fracção livre/total de L-DOPA e de 3OMD em circulação sanguínea, com a intenção de se evidenciar uma proporcionalidade entre as referidas fracções obtidas respectivamente por MD e por colheita de sangue. Os valores das concentrações de L-DOPA e de 3OMD totais em circulação sanguínea foram obtidos 0, 30, 50, 110 e 210 minutos após administração oral de L-DOPA e benserazida (12 e 3 mg/kg, respectivamente) e comparadas os valores obtidos por microdiálise relativos aos mesmos tempos de colheita.

Os valores de concentrações livres calculados a partir de amostragem por MD não podem ser comparados ponto a ponto com os valores das concentrações totais obtidos através de colheitas de sangue. Note-se que a amostragem por MD é um processo contínuo que resulta em dados de concentração *versus* tempo, que são reflexo de concentrações médias obtidas no local de amostragem durante um determinado intervalo de tempo. Isto contrasta com a tradicional colheita de sangue, que resulta em concentrações de fármacos em instantes de tempo. O cálculo de *AUC* permite comparar os dois tipos de amostragem. O valor de concentração obtido em amostras de dialisado é essencialmente um valor integrado de respostas (Elmqvist e Sawchuk, 1997).

A avaliação da relação entre as concentrações livre e total de L-DOPA e de 3OMD em circulação sanguínea foi elaborada através do cálculo da razão entre os valores médios de *AUC* dos perfis farmacocinéticos obtidos para as referidas fracções, em cada intervalo de tempo avaliado. A relação entre os níveis de L-DOPA e de 3OMD livres e totais foi calculada através dos valores de AUC_{0-t} , para os diferentes valores de *t* (0, 30, 50 110 e 210 min) entre as curvas concentração livre *versus* tempo (${}_L AUC_{0-t}$) e concentração total *versus* tempo (${}_T AUC_{0-t}$).

No que diz respeito a L-DOPA, a média dos valores de ${}_L AUC_{0-t}$ não foi significativamente diferente ($p < 0.05$) da média dos valores de ${}_T AUC_{0-t}$, em qualquer dos intervalos de tempo avaliados; as razões entre os valores de concentração livre e total foram sempre da ordem de 1 (tabela 28). A relação entre as concentrações total e livre de L-DOPA mostrou ser constante ao longo do tempo e ser independente da concentração total em circulação sanguínea. Relativamente a 3OMD, verificou-se que a razão entre os valores médios de ${}_L AUC_{0-t}$ e ${}_T AUC_{0-t}$ é da ordem de 0.7, em todos os intervalos de tempo estudados (tabela 28). Tal como o observado com a L-DOPA, também para a 3OMD a relação entre as concentrações total e livre foi independente da sua concentração total em circulação sanguínea.

Tabela 28: Razões entre as médias de valores de *AUC* dos perfis de concentrações de L-DOPA e de 3OMD totais e livres em circulação sanguínea, 30, 50, 110 e 210 minutos após administração oral de L-DOPA/benserazida (12/3 mg/kg).

Tempo (min)	L-DOPA			3OMD		
	${}_L AUC_{0-t}$	${}_T AUC_{0-t}$	Razão ${}_L AUC_{0-t} / {}_T AUC_{0-t}$	${}_L AUC_{0-t}$	${}_T AUC_{0-t}$	Razão ${}_L AUC_{0-t} / {}_T AUC_{0-t}$
0 - 30	20868	19691	1.06	4708	7040	0.67
0 - 50	54040	53551	1.01	19022	27403	0.69
0 - 110	131321	133366	0.98	110035	156129	0.70
0 - 210	166625	165920	1.00	301102	426227	0.71
Média			1.01			0.69
DP			0.03			0.02

Os valores das concentrações de L-DOPA e de 3OMD livres, utilizados para os cálculos das razões efectuados, foram obtidos em D1 nas experiências de inibição de COMT em que foi testado o inibidor nebicapone. Os valores individuais estão apresentados em média aritmética (N=5).

O perfil médio de concentrações de L-DOPA e de 3OMD totais e livres em circulação sanguínea *versus* tempo pode ser visualizado na figura 19.

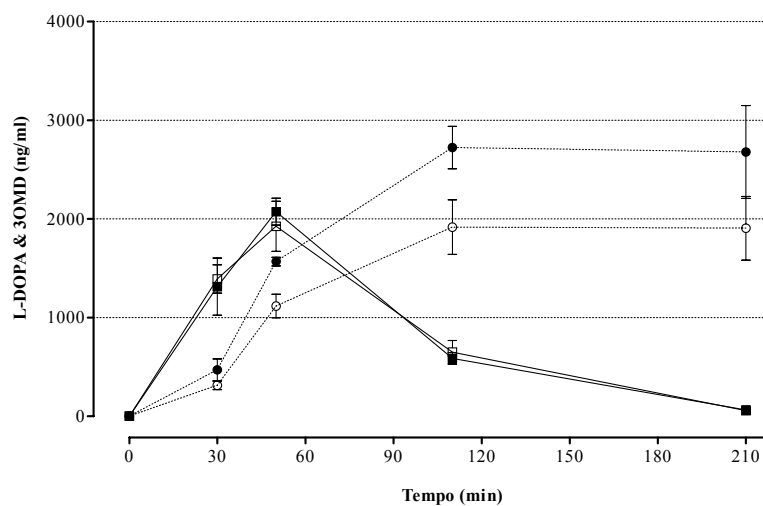


Figura 19: Perfil médio das concentrações de L-DOPA (—) e de 3OMD (---) livres e totais em circulação sanguínea *versus* tempo, após administração oral de L-DOPA/benserazida (12/3 mg/kg): L-DOPA livre (□), L-DOPA total (■), 3OMD livre (○) e 3OMD total (●). As amostras para quantificação de L-DOPA livre foram obtidas em D1 (ver figura 20) nas experiências de inibição de COMT em que foi testado o inibidor nebicapone. Os valores estão apresentados em média aritmética \pm EPM (N=5).

obtidos a partir da análise das amostras de dialisado.

Após a amostragem por MD e a análise por HPLC-ED, foram obtidos os perfis individuais de concentração de L-DOPA e de 3OMD livre em circulação sanguínea em função do tempo. De seguida, com base nos referidos perfis, foi elaborada uma análise farmacocinética por abordagem não-compartmental. Os parâmetros farmacocinéticos obtidos foram comparados estatisticamente, entre os diferentes grupos de ensaio.

4.1 Nebicapone

A inibição de COMT foi verificada quando 3 mg/kg de nebicapone foi administrado por via oral a ratos tratados com L-DOPA/benserazida. A administração de nebicapone (em D2) resultou num aumento dos níveis de L-DOPA, acompanhado de uma diminuição dos níveis de 3OMD, comparativamente aos períodos em que os animais foram tratados unicamente com L-DOPA/benserazida (D1 e D3).

Os níveis de L-DOPA e de 3OMD não foram diferentes entre os períodos D1 e D3, o que indica que em D3 a actividade enzimática de COMT retomou os níveis basais iniciais, verificados em D1.

4.1.1 L-DOPA

Os estudos de inibição e de recuperação da actividade de COMT foram elaborados através de um conjunto de parâmetros farmacocinéticos: C_{max} , t_{max} , AUC_{0-t} , $t_{1/2}$ e $AUC_{0-\infty}$. Estes parâmetros foram calculados para os diferentes períodos de tratamento D1, D2 e D3 e comparados entre os referidos períodos.

D2 foi comparado com D1 e D3 com o objectivo de se demonstrar a inibição de COMT, que, se se verificasse, resultaria em aumento dos valores dos parâmetros farmacocinéticos C_{max} , AUC_{0-t} , $t_{1/2}$ e $AUC_{0-\infty}$, em D2 relativamente a D1, não tendo necessariamente que haver aumento dos valores de t_{max} . Estas hipóteses foram colocadas com base num estudo, elaborado por Soares-da-Silva e col. (2003), que demonstrou que o nebicapone administrado por via oral a ratos, faz aumentar significativamente os níveis de L-DOPA em circulação sanguínea, quando comparados com os níveis obtidos em animais controlo (12 mg/kg de L-DOPA e 3 mg/kg de benserazida). Nesse trabalho, não foi calculada qualquer variável farmacocinética, no entanto a curva de concentração-tempo obtida relativamente a L-DOPA, aparenta indicar no sentido das hipóteses colocadas.

Os valores dos diferentes parâmetros farmacocinéticos calculados, através do modelo de inibição de COMT desenvolvido neste trabalho, são concordantes com o que foi previamente relatado. Os valores de C_{\max} , AUC_{0-t} , $t_{1/2}$ e $AUC_{0-\infty}$, são superiores em D2 quando comparados com D1 e D3 (tabela 29), verificando-se diferenças significativas ($p < 0.05$) entre as médias das referidas variáveis, para aqueles períodos de tratamento. Os valores de t_{\max} não apresentaram diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os diferentes dias de ensaio (tabela 29).

Tabela 29: Parâmetros farmacocinéticos de L-DOPA livre em circulação sanguínea obtidos após administração oral de L-DOPA/benserazida (12/3 mg/kg), em simultâneo com 3 mg/kg de nebicapone (D2) ou controlo (D1 e D3).

	C_{\max} (ng/mL)	t_{\max} (min)	AUC_{0-t} (ng.min/mL)	$AUC_{0-\infty}$ (ng.min/mL)	$t_{1/2}$ (min)
D1	1926 (29.4)	50 (50-50)	150288 (31.7)	152518 (31.3)	32.9 (11.6)
D2	3658 (21.8)	50 (50-70)	403548 (33.6)	407472 (33.0)	42.7 (12.3)
D3	1793 (28.9)	50 (50-50)	141014 (43.1)	144455 (40.9)	37.7 (10.5)

C_{\max} , AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$ e $t_{1/2}$ estão apresentados em média aritmética (N=5) com os coeficientes de variação (%) entre parênteses. t_{\max} está apresentado em mediana com a correspondente gama de valores entre parênteses.

Bonifácio e col. (2003) demonstraram que, em homogêneos de fígado de rato, a actividade de COMT é totalmente recuperada após 24h de administração oral de 30 mg/kg de nebicapone. Assim, no esquema experimental do modelo desenvolvido neste trabalho, a dose 3 mg/kg fez prever uma recuperação total da actividade basal de COMT em D3 de cada experiência de farmacocinética, pelo que seria de esperar que os níveis de L-DOPA fossem semelhantes em D1 e D3. Os resultados obtidos confirmaram a hipótese colocada anteriormente. Os valores dos parâmetros farmacocinéticos avaliados não são estatisticamente diferentes ($p < 0.05$) entre os períodos D1 e D3. Os valores dos diferentes parâmetros farmacocinéticos avaliados para a L-DOPA, estão apresentadas na tabela 29.

O perfil médio de concentrações de L-DOPA livre em circulação sanguínea *versus* tempo, nos diferentes dias de ensaio (D1, D2 e D3) pode ser visualizado na figura 21.

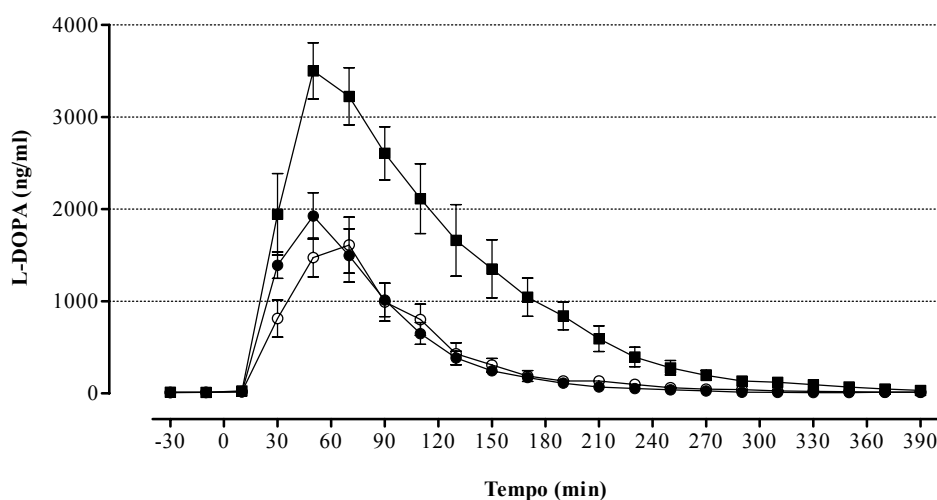


Figura 21: Perfil médio das concentrações de L-DOPA livre em circulação sanguínea *versus* tempo, após administração oral de L-DOPA/benserazida (12/3 mg/kg) em simultâneo com 3 mg/kg de nebicapone – D2 (■) ou controle – D1 (●) e D3 (○). As amostras para quantificação de L-DOPA foram obtidas através da técnica de MD na veia jugular de ratos conscientes e em movimento livre. Os valores estão apresentados em média aritmética \pm EPM (N=5).

O tempo de amostragem em cada dia de ensaio foi definido de maneira a que se garantisse uma descrição adequada da fase de eliminação de L-DOPA. O tempo 390 minutos permitiu que a fase terminal monoexponencial do perfil farmacocinético fosse claramente identificado (figura 21) e que assim fosse possível o cálculo dos parâmetros farmacocinéticos $t_{1/2}$ e $AUC_{0-\infty}$.

4.1.2 3OMD

Soares-da-Silva e col. (2003) demonstraram que o nebicapone inibe a actividade de COMT em eritrócitos e em homogeneizados de fígado de rato, apresentando valores de ED_{50} da ordem de 2 mg/kg, 1 h após a administração do referido inibidor. Nesse estudo, os autores verificaram que o nebicapone previne a formação de 3OMD livre em circulação sanguínea, em ratos administrados com L-DOPA e benserazida. Assim, hipoteticamente a administração de 3 mg/kg do referido inibidor seria uma dose adequada ao modelo de inibição de COMT desenvolvido neste trabalho.

O efeito de nebicapone poderá ser avaliado graficamente na figura 22 através dos perfis médios das concentrações de 3OMD livre em circulação sanguínea *versus* tempo, nos diferentes dias de ensaio. Em D2, a dose 3 mg/kg de nebicapone fez diminuir os níveis de 3OMD, quando comparados com os períodos de tratamento controlo D1 e D3.

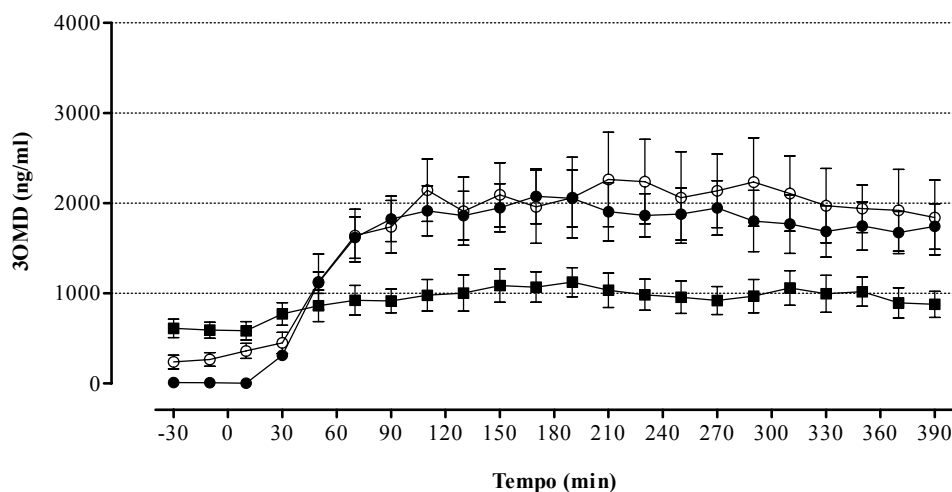


Figura 22: Perfil médio das concentrações de 3OMD livre em circulação sanguínea *versus* tempo, após administração oral de L-DOPA/benserazida (12/3 mg/kg) em simultâneo com 3 mg/kg de nebicapone – D2 (■) ou controlo – D1 (●) e D3 (○). As amostras para quantificação de L-DOPA foram obtidas através da técnica de MD na veia jugular de ratos conscientes e em movimento livre. Os valores estão apresentados em média aritmética \pm EPM (N=5).

Nos perfis médios de concentrações de 3OMD livre em circulação sanguínea *versus* tempo, representados na figura 22, pode observar-se a existência de um *plateau* em todos os dias de ensaio (D1, D2 e D3), não sendo claramente identificada a fase terminal monoexponencial em qualquer dos referidos perfis. Este facto deve-se ao elevado tempo de eliminação daquele metabolito. O período de 390 minutos, definido no desenho experimental deste trabalho, não se mostrou suficiente para garantir uma descrição da fase de eliminação de 3OMD e, desta forma, não foi possível estimar os parâmetros $t_{1/2}$ e $AUC_{0-\infty}$. A partir dos perfis individuais de concentração-tempo foram calculados os parâmetros farmacocinéticos C_{max} , t_{max} e AUC_{0-t} , relativos a cada período de tratamento – D1, D2 e D3.

A inibição de COMT foi verificada entre os períodos de tratamento, através da comparação dos valores dos parâmetros farmacocinéticos referidos no parágrafo anterior. Os valores de C_{max} e AUC_{0-t} são inferiores em D2 quando comparados com D1 e D3 (tabela 30), verificando-se diferenças significativas ($p < 0.05$) entre as médias dos valores dos referidos parâmetros, para

aqueles períodos de tratamento. Os valores de t_{\max} não apresentaram diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os diferentes dias de ensaio.

Tabela 30: Parâmetros farmacocinéticos de 3OMD livre em circulação sanguínea obtidos após administração oral de L-DOPA/benserazida (12/3 mg/kg), em simultâneo com 3 mg/kg de nebicapone (D2) ou controlo (D1 e D3).

	C_{\max} (ng/mL)	t_{\max} (min)	AUC_{0-t} (ng.min/mL)	$AUC_{0-\infty}$ (ng.min/mL)	$t_{1/2}$ (min)
D1	2156 (33.0)	170 (150-390)	637748 (32.6)	NC	NC
D2	1170 (34.3)	190 (130-350)	369068 (38.3)	NC	NC
D3	2397 (44.9)	210 (150-290)	704109 (44.6)	NC	NC

C_{\max} e AUC_{0-t} , estão apresentados em média aritmética (N=5) com os coeficientes de variação (%) entre parênteses. t_{\max} está apresentado em mediana com a correspondente gama de valores entre parênteses.

NC – Não calculado, devido à fase terminal monoexponencial não ter sido claramente identificada.

A recuperação da actividade de COMT foi verificada 24 h após a administração de nebicapone, através da avaliação dos valores dos parâmetros farmacocinéticos calculados para a 3OMD. Os valores de C_{\max} , t_{\max} e AUC_{0-t} não são estatisticamente diferentes ($p < 0.05$) entre os períodos D1 e D3.

4.2 Entacapone

O procedimento de avaliação do efeito de entacapone na actividade de COMT foi idêntico ao usado com nebicapone. A administração oral de 3 mg/kg de entacapone resultou numa diminuição da actividade de COMT em ratos tratados com L-DOPA e benserazida. Em D2, o entacapone provocou um aumento dos níveis de L-DOPA, acompanhado de uma diminuição dos níveis de 3OMD, comparativamente aos períodos D1 e D3.

A COMT recuperou a actividade basal inicial 24 h após a administração do inibidor. Este facto foi evidenciado pelos níveis de L-DOPA e de 3OMD obtidos em D1 e D3, que não foram diferentes entre estes períodos de tratamento.

4.2.1 L-DOPA

A inibição de COMT foi evidenciada pelo aumento dos valores dos parâmetros farmacocinéticos C_{\max} , AUC_{0-t} e $AUC_{0-\infty}$, em D2 relativamente a D1 e D3 (tabela 31). As diferenças de valores destes parâmetros, entre os referidos períodos de tratamento, foram estatisticamente significativas ($p < 0.05$).

Neste trabalho verificou-se que, enquanto 3 mg/kg de nebicapone resulta num aumento de $t_{1/2}$ (tabela 29), a administração da mesma dose de entacapone não provoca qualquer alteração nos valores de tempo de semi-vida terminal (tabela 31). Não se verificaram diferenças significativas entre os períodos de tratamento controlo (D1 e D3) e o período em que foi administrado entacapone. Este resultado está de acordo com a hipótese colocada previamente e com o que tem sido reportado na literatura em modelos animais e no Homem (Kaakkola e col., 1994; Learmonth e col., 2002; Silveira e col., 2003).

A administração de entacapone não teve qualquer influência nos valores de t_{\max} . As médias de valores deste parâmetro farmacocinético não sofreram qualquer variação entre os diferentes dias de ensaio (tabela 31), não se tendo verificando diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$).

Tabela 31: Parâmetros farmacocinéticos de L-DOPA livre em circulação sanguínea obtidos após administração oral de L-DOPA/benserazida (12/3 mg/kg), em simultâneo com 3 mg/kg de entacapone (D2) ou controlo (D1 e D3).

	C_{\max} (ng/mL)	t_{\max} (min)	AUC_{0-t} (ng.min/mL)	$AUC_{0-\infty}$ (ng.min/mL)	$t_{1/2}$ (min)
D1	1979 (15.6)	50 (30-70)	168391 (17.4)	173548 (18.6)	36.3 (6.68)
D2	3123 (27.8)	50 (50-70)	283983 (24.5)	287082 (24.4)	37.6 (15.8)
D3	2085 (24.0)	50 (50-70)	173632 (25.5)	166420 (24.8)	36.7 (18.4)

C_{\max} , AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$ e $t_{1/2}$ estão apresentados em média aritmética (N=5) com os coeficientes de variação (%) entre parênteses. t_{\max} está apresentado em mediana com a correspondente gama de valores entre parênteses.

Os valores de todos os parâmetros farmacocinéticos avaliados não foram estatisticamente diferentes ($p < 0.05$) entre os períodos D1 e D3. As médias de valores, dos diferentes parâmetros farmacocinéticos avaliados para a L-DOPA, estão apresentadas na tabela 31. Assim, pode constatar-se que a COMT recuperou na totalidade os níveis de actividade basais iniciais.

O perfil médio das concentrações de L-DOPA livre em circulação sanguínea *versus* tempo, nos diferentes dias de ensaio (D1, D2 e D3), pode ser visualizado na figura 23.

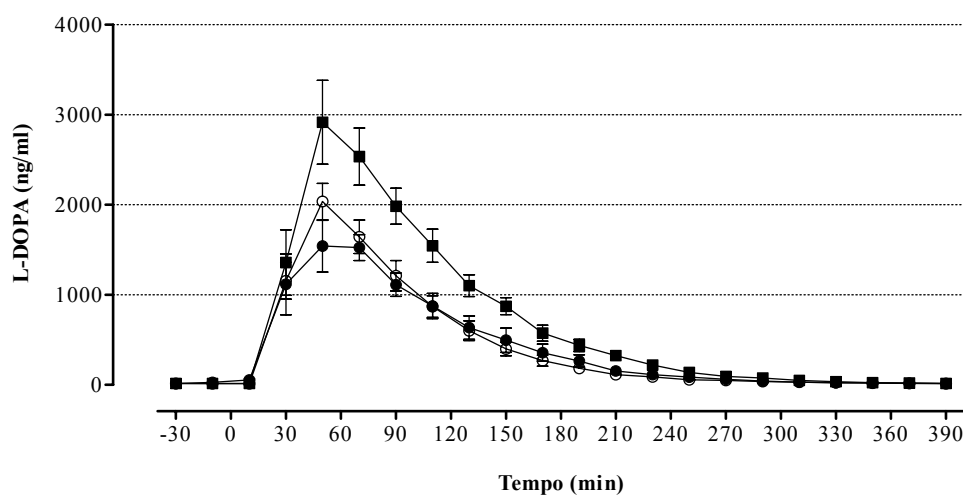


Figura 23: Perfil médio das concentrações de L-DOPA livre em circulação sanguínea *versus* tempo, após administração oral de L-DOPA/benserazida (12/3 mg/kg) em simultâneo com 3 mg/kg de entacapone – D2 (■) ou controlo – D1 (●) e D3 (○). As amostras para quantificação de L-DOPA foram obtidas através da técnica de MD na veia jugular de ratos conscientes e em movimento livre. Os valores estão apresentados em média aritmética \pm EPM (N=5).

4.2.2 3OMD

A inibição de COMT foi verificada através da comparação dos parâmetros farmacocinéticos C_{\max} , t_{\max} e AUC_{0-t} . Em D2, C_{\max} e AUC_{0-t} apresentaram valores inferiores quando comparados com os períodos D1 e D3 (tabela 32), verificando-se diferenças significativas ($p < 0.05$). Os valores de t_{\max} não são estatisticamente diferentes ($p < 0.05$) entre os diferentes dias de ensaio.

Note-se que não foi possível identificar a fase terminal monoexponencial das curvas concentração-tempo. Este facto, explicado na secção 4.1.2, impossibilitou o cálculo dos parâmetros farmacocinéticos $t_{1/2}$ e $AUC_{0-\infty}$.

Tabela 32: Parâmetros farmacocinéticos de 3OMD livre em circulação sanguínea obtidos após administração oral de L-DOPA/benserazida (12/3 mg/kg), em simultâneo com 3 mg/Kg de entacapone (D2) ou controlo (D1 e D3).

	C_{\max} (ng/mL)	t_{\max} (min)	AUC_{0-t} (ng.min/mL)	$AUC_{0-\infty}$ (ng.min/mL)	$t_{1/2}$ (min)
D1	2260 (25.4)	190 (130-270)	642612 (27.2)	NC	NC
D2	1221 (40.2)	290 (230-350)	354718 (36.9)	NC	NC
D3	2475 (28.7)	180 (110-350)	718746 (27.6)	NC	NC

C_{\max} e AUC_{0-t} , estão apresentados em média aritmética (N=5) com os coeficientes de variação (%) entre parênteses. t_{\max} está apresentado em mediana com a correspondente gama de valores entre parênteses.

NC – Não calculado, devido à fase terminal monoexponencial não ter sido claramente identificada.

A recuperação da actividade de COMT foi verificada 24 h após a administração de entacapone, através da avaliação dos valores C_{\max} , t_{\max} e AUC_{0-t} calculados para a 3OMD. Os valores de todos os parâmetros farmacocinéticos avaliados não foram estatisticamente diferentes ($p < 0.05$) entre os períodos D1 e D3. Os valores dos diferentes parâmetros avaliados, estão apresentadas na tabela 32.

O efeito da administração de entacapone poderá ser visualizado graficamente na figura 24 através dos perfis médios de concentrações de 3OMD livre em circulação sanguínea *versus* tempo, nos diferentes dias de ensaio.

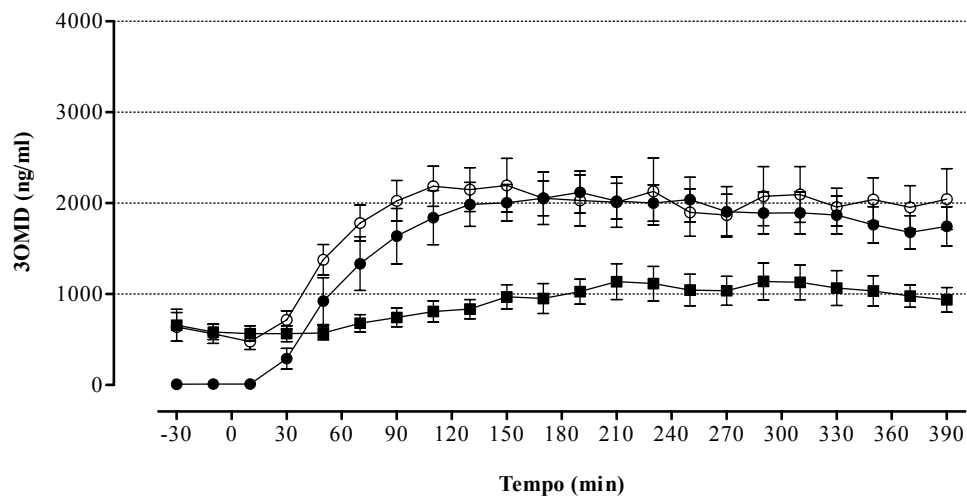


Figura 24: Perfil médio das concentrações de 3OMD livre em circulação sanguínea *versus* tempo, após administração oral de L-DOPA/benserazida (12/3 mg/kg) em simultâneo com 3 mg/kg de entacapone – D2 (■) ou controle – D1 (●) e D3 (○). As amostras para quantificação de L-DOPA foram obtidas através da técnica de MD na veia jugular de ratos conscientes e em movimento livre. Os valores estão apresentados em média aritmética \pm EPM (N=5).

4.3 Nebicapone versus Entacapone

Learmonth e col. (2002) verificaram que, em homogeneizados de fígado de ratos administrados com nebicapone ou entacapone, a potência de nebicapone é mais intensa e mais prolongada do que com entacapone na inibição de COMT. Em voluntários saudáveis tratados com L-DOPA e benserazida, 200 mg de nebicapone provoca aumentos superiores da exposição sistêmica de L-DOPA, quando comparados com a mesma dose de entacapone (Kaakkola e col., 1994; Silveira e col., 2003). Estes factos indicam que o nebicapone é mais eficaz no aumento da exposição sistêmica de L-DOPA. Estas constatações foram usadas para formular a hipótese de que a administração de 3 mg/kg de entacapone causaria uma inibição de COMT menos eficaz e menos duradoura, do que a mesma dose de nebicapone.

Nesta secção, o nebicapone e o entacapone são comparados entre si relativamente à sua influência na actividade de COMT e na farmacocinética de L-DOPA e de 3OMD. Este estudo foi elaborado através da avaliação de razões de valores de parâmetros farmacocinéticos entre os dias de tratamento D1 e D2 de cada experiência de inibição de COMT. O período de tratamento D3 não foi considerado para este estudo comparativo, uma vez que os níveis de L-DOPA e de 3OMD entre D1 e D3 não são significativamente diferentes, em qualquer das experiências de farmacocinética elaboradas para este trabalho (secções 4.1 e 4.2).

4.3.1 L-DOPA

A exposição sistêmica de L-DOPA, representada pelos parâmetros AUC_{0-t} e $AUC_{0-\infty}$, foi influenciada pelo tratamento com nebicapone ou entacapone, em ratos tratado com L-DOPA e benserazida. A administração de qualquer dos referidos inibidores de COMT (em D2) resultou num aumento da biodisponibilidade de L-DOPA relativamente ao período de tratamento controlo D1 (tabela 33). O mesmo se verifica para a concentração máxima de L-DOPA (C_{max}), cujos valores de razões 1.93 e 1.54 indicam um aumento de 93 % e 54 %, nos dias em que os animais foram tratados com nebicapone ou entacapone, respectivamente (tabela 33). Embora se verifique um aumento dos valores de C_{max} , o tempo a que este ocorre (t_{max}) não é alterado pela administração de qualquer dos inibidores testados. As razões entre os valores de t_{max} obtidos nos diferentes dias de ensaio (D2/D1) são sempre da ordem de 1 (tabela 33).

No que diz respeito a $t_{1/2}$, os valores obtidos para as razões D2/D1 são 1.30 ou 1.02 para o nebicapone ou o entacapone, respectivamente (tabela 33). Estes valores indicam que unicamente o nebicapone influencia o tempo de semi-vida terminal de L-DOPA, em ratos tratados com L-DOPA e benserazida. Esta demonstração confirma o que está descrito anteriormente nas secções 4.1.1 e 4.2.1.

Tabela 33: Razões entre os períodos de tratamento D2 e D1, para os valores dos parâmetros farmacocinéticas de L-DOPA livre em circulação sanguínea, após administração oral de L-DOPA/benserazida (12/3 mg/kg), em simultâneo com 3 mg/kg de nebicapone ou de entacapone.

	C_{\max}	t_{\max}	AUC_{0-t}	$AUC_{0-\infty}$	$t_{1/2}$
Nebicapone	1.93 (1.62-2.26)	1.00 (1.00-1.40)	2.66 (2.06-3.36)	2.65 (2.06-3.34)	1.30 (1.10-1.51)
Entacapone	1.54 (1.15-2.02)	1.00 (1.00-1.67)	1.67 (1.21-2.25)	1.60 (1.02-2.30)	1.02 (0.83-1.23)

C_{\max} , AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$ e $t_{1/2}$ estão apresentados em média geométrica e intervalos de confiança (95%) entre parênteses. t_{\max} estão apresentado em mediana com a correspondente gama de valores entre parênteses.

4.3.2 3OMD

A partir da avaliação das razões obtidas para os parâmetros farmacocinéticos de 3OMD, pode verificar-se que a potência de nebicapone é equivalente à de entacapone na inibição de COMT. Em todos os parâmetros farmacocinéticos avaliados, os valores das razões são semelhantes entre o nebicapone e o entacapone (tabela 34). O tratamento com entacapone resulta num aumento aparente de t_{\max} (razão D2/D1 = 1.47). No entanto, os valores de t_{\max} não apresentaram diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os dias de ensaio D1 e D2 (secção 4.2.2).

Tabela 34: Razões entre os períodos de tratamento D2 e D1, para os valores dos parâmetros farmacocinéticos de 3OMD livre em circulação sanguínea, após administração oral de L-DOPA/benserazida (12/3 mg/kg), em simultâneo com 3 mg/kg de nebicapone ou de entacapone.

	C_{\max}	t_{\max}	AUC_{0-t}	$AUC_{0-\infty}$	$t_{1/2}$
Nebicapone	0.54 (0.47-0.62)	1.00 (0.49-2.06)	0.57 (0.46-0.68)	NC	NC
Entacapone	0.52 (0.41-0.64)	1.47 (1.07-2.23)	0.54 (0.44-0.66)	NC	NC

C_{\max} e AUC_{0-t} estão apresentados em média geométrica (N=5) e intervalos de confiança (95%) entre parênteses. t_{\max} estão apresentado em mediana com a correspondente gama de valores entre parênteses. NC – Não calculado, devido à fase terminal monoexponencial não ter sido claramente identificada.

A farmacocinética de 3OMD é influenciada pelo tratamento de qualquer dos inibidores de COMT que foram utilizados. A administração de nebicapone ou de entacapone resultaram numa diminuição dos níveis de 3OMD em circulação sanguínea. As razões obtidas em C_{\max} e AUC_{0-t} , entre os períodos D2 e D1, indicam que os valores destes parâmetros farmacocinéticos foram reduzidos para cerca de metade (tabela 34).

CAPÍTULO IV
DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

No presente trabalho foi desenvolvido um modelo experimental para avaliação de inibição de COMT em ratos em livre movimento. Neste modelo, o efeito de inibidores de COMT é avaliado através da análise farmacocinética não-compartimental dos perfis de concentração de L-DOPA e de 3OMD livres em circulação sanguínea *versus* tempo. O protocolo do referido modelo consiste em experiências, em que cada animal é sujeito a um conjunto de 3 dias de ensaios experimentais, durante os quais os níveis de L-DOPA e de 3OMD são monitorizados através de amostragem por MD. A L-DOPA (12 mg/kg) e a benserazida (3 mg/kg) são administradas por via oral diariamente e em simultâneo com um inibidor de COMT (3 mg/kg) ou veículo controlo. Nos dias 1 e 3, os animais não são administrados com qualquer inibidor de COMT, sendo tratados unicamente com L-DOPA e benserazida – tratamentos controlo de cada experiência de farmacocinética. No segundo dia de ensaio, cada animal é tratado simultaneamente com L-DOPA, benserazida e um inibidor de COMT, de maneira a verificar-se a inibição da referida enzima. A dose 3 mg/kg de nebicapone ou de entacapone (em D2) administrada a ratos Wistar resultou em inibição de COMT, o que é concordante com o descrito na literatura para estudos com este tipo de animais (Learmonth e col., 2002; Bonifacio e col., 2003; Soares-da-Silva e col., 2003), demonstrando a adequabilidade do protocolo experimental desenvolvido.

A técnica de MD *in vivo* tem-se tornado uma das ferramentas mais importantes na neurofisiologia e na neuroquímica. Uma grande parte dos trabalhos publicados nestas áreas, nas últimas décadas, realça a importância da MD no que concerne à informação proporcionada relativamente à libertação e ao metabolismo de neurotransmissores. Recentemente, MD *in vivo* tem sido utilizada em estudos de farmacocinética, especialmente no campo de distribuição e metabolismo, na investigação e desenvolvimento de novos fármacos. Esta nova aplicação da MD, tem sido possível graças ao refinamento e à melhoria dos aspectos qualitativos da metodologia, principalmente no que diz respeito a características relacionadas com a dimensão, a forma, o tipo de material e a recuperação das sondas.

Uma das fases importantes do desenvolvimento do modelo para avaliação de inibição de COMT deste trabalho foi o estudo do comportamento das sondas de MD. Os estudos de recuperação das sondas demonstraram que a taxa de recuperação é independente da concentração de L-DOPA e de 3OMD, na gama entre 200 e 4000 ng/mL, e independente do método de determinação *in vitro* (perda ou ganho). A referida gama de concentrações avaliada compreende os níveis de L-DOPA e de 3OMD encontrados nas amostras obtidas nas experiências de inibição de COMT *in vivo*, mediante a aplicação do modelo de MD desenvolvido neste trabalho. A

recuperação das sondas *in vivo* (em circulação sanguínea) foi elaborada através da técnica de retrodiálise. Os valores de recuperação obtidos foram 23.98 ± 5.61 % para a L-DOPA e 27.08 ± 5.41 % para a 3OMD. O comportamento das sondas de MD *in vivo* é idêntico ao comportamento *in vitro*, nas mesmas condições de fluxo de perfusão e para a mesma gama de concentrações dos referidos analitos. Note-se que a variabilidade verificada na recuperação entre diferentes sondas obriga à avaliação prévia de cada sonda, antes da sua utilização em ensaios *in vivo*.

A amostragem por MD não altera o volume dos fluidos corporais, o que possibilita a obtenção de numerosas amostras, pelo que permite uma alta resolução temporal, durante longos períodos, em estudos com animais não anestesiados. Os estudos em animais não anestesiados e em livre movimento permitem a avaliação da resposta farmacodinâmica em simultâneo com as relações entre as concentrações de um fármaco e a referida resposta. Para o modelo de inibição de COMT desenvolvido no presente trabalho, a monitorização de L-DOPA e de 3OMD foi feita durante 3 dias através de 22 colheitas diárias de dialisado, em que cada amostra foi obtida a cada 20 minutos. Num procedimento experimental, um animal pode ser usado como seu próprio controlo, uma vez que as amostras podem ser obtidas antes e após a administração de fármaco. A utilização da técnica de MD, neste modelo experimental, reduz substancialmente o número de animais necessários para um determinado estudo de farmacocinética de L-DOPA e de 3OMD, quando comparado com modelos clássicos de colheita de amostras.

A perfusão das sondas de MD deve ser mantida continuamente, para que as sondas mantenham o mesmo comportamento durante todo o tempo de amostragem. Um sistema CMA/120 foi ligeiramente adaptado para que permitisse a perfusão contínua das sondas durante os 3 dias de duração de cada experiência. A integridade das sondas foi verificada e evidenciada através da comparação entre as recuperações de cada sonda, antes e após terem sido utilizadas nas referidas experiências. As percentagens de diferença entre as recuperações obtidas no dia 0 (zero) e no final do dia 3 variaram entre -8.51 % e 6.55 % para a L-DOPA e entre -3.63 % e 10.94 % para a 3OMD.

A proporção entre as concentrações livres e totais plasmáticas da generalidade dos fármacos é normalmente constante e independente das suas concentrações totais (Mehvar, 2005).

Neste trabalho, avaliou-se a relação entre a fracção livre e a fracção total de L-DOPA e de 3OMD em circulação sanguínea, com o objectivo de demonstrar que as referidas fracções obtidas respectivamente por MD e por colheita de sangue apresentam uma relação de proporcionalidade entre si. Para cada catecolamina estudada, verificou-se que a relação entre as concentrações livre

e total é independente da sua concentração total em circulação sanguínea de ratos Wistar, o que foi avaliado entre 0 e 210 minutos após administração oral de L-DOPA e de benserazida.

A técnica utilizada neste trabalho para a quantificação de L-DOPA e de 3OMD nas amostras de dialisado e de plasma foi HPLC-ED. A metodologia usada foi validada conforme as especificações e normas estabelecidas no Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos para a Indústria (FDA, 2001). A metodologia analítica utilizada é linear, precisa e exacta, nas gamas de quantificação avaliadas. Os LLOQs obtidos foram 100 ng/mL e 10 ng/mL para plasma e dialisado, respectivamente. Os valores encontrados para os ULOQs foram 1000 ng/mL e 200 ng/mL, para os respectivos tipos de matriz biológica referidos anteriormente.

Os inibidores de COMT têm mostrado que influenciam a farmacocinética de L-DOPA, aumentando a sua biodisponibilidade sistémica e diminuindo a sua eliminação. O nebicapone e o entacapone são inibidores selectivos reversíveis da enzima COMT que é uma das enzimas principais no processo de metabolização de L-DOPA, para além da AADC. Quando o nebicapone ou o entacapone são adicionados ao regime de tratamento com L-DOPA e um inibidor de AADC, inibem a actividade de COMT, diminuindo a velocidade de metabolização de L-DOPA à periferia. Isto resulta numa semi-vida de eliminação mais longa e num aumento previsível da área sob a curva concentração-tempo. Deste modo, a L-DOPA encontra-se disponível para o transporte para o cérebro durante um período de tempo mais prolongado (Hauser, 2007). No entanto, tem sido demonstrado que no Homem, doses elevadas (superiores a 200 mg) de inibidores de COMT podem não fazer aumentar (ou mesmo fazer reduzir) a biodisponibilidade de L-DOPA (Dingemans e col., 1995; Rouru e col., 1999; Almeida e Soares-da-Silva, 2003). Algumas hipóteses têm sido consideradas, incluindo a degradação de L-DOPA através de uma via metabólica alternativa ou a competição entre os referidos inibidores e a L-DOPA durante a absorção ao nível do intestino (Dingemans e col., 1995; Contin e col., 2005).

A formação de 3OMD a partir de L-DOPA é dependente da actividade de COMT, particularmente ao nível do intestino, que é o principal local de *O*-metilação de L-DOPA (Nutt e Fellman, 1984). Como tal, a inibição de COMT pode ser avaliada através dos níveis de 3OMD plasmáticos. Na literatura tem sido relatado que, no Homem, os fármacos nebicapone e entacapone provocam a diminuição dos níveis de 3OMD plasmáticos, verificando-se reduções nos valores de C_{\max} e AUC_{0-t} . A administração de 200 mg de nebicapone ou de entacapone resulta em reduções nos valores dos referidos parâmetros farmacocinéticos para cerca de metade, comparativamente com placebo. Os valores de C_{\max} e AUC_{0-t} referentes a placebo são reduzidos

60 % e 55 % pelos tratamentos com nebicapone (Silveira e col., 2003; Almeida e col., 2004) e entacapone, respectivamente (Keränen e col., 1993).

No presente estudo elaborado em ratos Wistar, nos dias em que foi administrado nebicapone ou entacapone na dose 3 mg/kg, os valores de C_{\max} apresentaram reduções de 46 % (nebicapone) ou 48 % (entacapone) quando comparados com os dias de tratamento controlo. Da mesma maneira, a AUC_{0-t} apresentou valores mais baixos 57 % ou 54 % (nebicapone ou entacapone, respectivamente) do que os valores do referido parâmetro obtidos nos períodos de tratamento controlo.

O efeito da administração de nebicapone ou de entacapone avaliado a partir dos níveis de 3OMD livre em circulação sanguínea em ratos Wistar e a partir dos níveis de 3OMD plasmáticos no Homem, indica que há semelhanças entre a dose 3 mg/kg em ratos e a dose 200 mg na espécie humana.

No que concerne à farmacocinética de L-DOPA, aparentemente o tratamento com nebicapone ou entacapone é mais eficaz em ratos do que no Homem. Este facto poderá ser devido a diferenças inter-espécies em factores relacionados (i) com a farmacocinética e metabolismo dos referidos inibidores de COMT (Loureiro e col., 2004) ou (ii) com absorção e metabolismo de L-DOPA. Contudo, em ambas as espécies, a administração de qualquer dos referidos inibidores resulta num aumento da biodisponibilidade de L-DOPA relativamente aos tratamentos controlo, nomeadamente nos valores dos parâmetros farmacocinéticos $AUC_{0-\infty}$, $t_{1/2}$, e C_{\max} . No Homem, verifica-se que o nebicapone é mais eficiente do que o entacapone a aumentar os níveis de L-DOPA, no entanto os referidos aumentos são menos notórios e menos diferenciáveis do que os verificados no Rato. No Homem, a dose de 200 mg de nebicapone resulta num aumento (52 %) (Silveira e col., 2003) dos valores de $AUC_{0-\infty}$, que é superior ao aumento verificado com a mesma dose de entacapone (38 %) (Kaakkola e col., 1994). Com base nas experiências de farmacocinética elaboradas no presente trabalho, verificou-se que os valores de $AUC_{0-\infty}$ aumentaram 165 % e 60 %, quando os animais foram tratados com 3 mg/kg de nebicapone e de entacapone, respectivamente. No dia em que foram administrados o nebicapone ou o entacapone (D2), verificou-se que os valores de C_{\max} aumentaram em cerca de 93 % e 54 %, quando comparados com o período de tratamento controlo (D1). Contudo, contrariamente ao que seria de esperar, a dose 200 mg em voluntários saudáveis não faz alterar os valores de C_{\max} .

Em oposição ao verificado para os parâmetros farmacocinéticos $AUC_{0-\infty}$ e C_{\max} , os aumentos de $t_{1/2}$ resultantes do tratamento com nebicapone e entacapone são mais evidentes no

Homem (200 mg) do que em ratos (3 mg/kg). No Homem, os aumentos de $t_{1/2}$ resultantes do tratamento com 200 mg de nebicapone (56 %) (Silveira e col., 2003) são superiores aos que são obtidos através da mesma dose de entacapone (33 %) (Myllylä e col., 1993). Em ratos, com tratamento de 3 mg/kg de nebicapone, os valores de $t_{1/2}$ aumentaram 30 % relativamente ao período de tratamento controlo. Este aumento não se verificou com a administração de entacapone (3 mg/kg). Contudo a aplicação do modelo de inibição de COMT em ratos permitiu verificar a maior eficiência de nebicapone no que diz respeito ao aumento da semi-vida de eliminação de L-DOPA.

A reversibilidade na actividade de COMT é verificada em voluntários saudáveis tratados com nebicapone ou entacapone. A COMT recupera os níveis de actividade basais iniciais 18 h após a administração de 200 mg de nebicapone (Dingemans e col., 1995; Silveira e col., 2003). Quando o entacapone é administrado na mesma quantidade, a COMT recupera os níveis de actividade basais 8 h após a administração do referido inibidor (Keränen e col., 1994). A recuperação dos níveis de actividade de COMT basais iniciais é igualmente verificada em pacientes com doença de Parkinson. Num estudo de comparação entre tratamentos com nebicapone (150 mg) e entacapone (200 mg), os autores verificaram que os valores de inibição máxima são semelhantes entre os tratamentos 150 mg de nebicapone (56.5 %) e 200 mg de entacapone (59.6 %), embora a inibição de COMT seja mais continuada com nebicapone do que com entacapone (Ferreira e col., 2007).

O modelo experimental descrito no presente trabalho permite a avaliação da recuperação da actividade de COMT até 24 h após o tratamento com um inibidor da referida enzima. A dose de 3 mg/kg de nebicapone ou de entacapone não tem qualquer efeito 24 h após a sua administração por via oral a ratos Wistar. Os perfis de concentrações de L-DOPA e de 3OMD livres em circulação sanguínea em função do tempo não são diferentes entre os períodos de tratamento controlo (D1 e D3) das experiências de inibição de COMT. Todos os parâmetros farmacocinéticos avaliados não são estatisticamente diferentes entre os dias D1 e D3 de ensaio experimental. Os resultados de reversibilidade na actividade de COMT obtidos em ratos não contrariam os verificados no Homem. Porém, a partir deste desenho experimental não foi possível discriminar qual dos referidos inibidores tem um efeito mais prolongado. Contudo, o modelo *in vivo* apresentado neste trabalho permite que se avalie a reversibilidade em períodos de tempo menores do que 24 h após a administração dos fármacos, o que poderá possibilitar a avaliação e diferenciação de inibidores de COMT pela durabilidade do seu efeito.

Em conclusão, pode-se constatar que a amostragem por MD mostrou ser uma técnica adequada para a avaliação de inibição de COMT periférica em rato, permitindo uma monitorização fidedigna dos níveis de L-DOPA e de 3OMD em circulação sanguínea. O modelo de MD *in vivo* desenvolvido neste trabalho permite avaliar a eficácia de entidades químicas inibidoras de COMT. Quando comparado com os modelos clássicos de estudo de inibição de COMT, o modelo de microdiálise desenvolvido neste trabalho de mestrado permite avaliar com maior eficiência as novas entidades químicas inibidoras de COMT, facilitando a selecção de novos compostos em estudos pré-clínicos. A aplicação deste modelo permite que os estudos de farmacocinética de L-DOPA e de 3OMD livres e circulação sanguínea sejam elaborados num curto período de tempo, minimizando os recursos materiais e humanos, em que o uso de animais é reduzido. Todos estes factores fazem deste modelo *in vivo* uma ferramenta de grande importância para o desenvolvimento de novos fármacos, que poderão ser incluídos em futuras terapêuticas da doença de Parkinson.

CAPÍTULO V
REFERÊNCIAS

- Almeida, L., Soares-da-Silva, P. (2003), Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Profiles of BIA 3-202, a Novel Catechol-O-Methyltransferase (COMT) Inhibitor, during Multiple-Dose Administration to Healthy Subjects. *Journal of Clinical Pharmacology*, 43, 1350-1360.
- Almeida, L., Vaz-da-Silva, M., Silveira, P., Falcao, A., Maia, J., Loureiro, A., Torrao, L., Machado, R., Wright, L., Soares-da-Silva, P. (2004), Pharmacokinetic-pharmacodynamic interaction between BIA 3-202, a novel COMT inhibitor, and levodopa/carbidopa. *Clinical Neuropharmacology*, 27, 17-24.
- Axelrod, J., Tomchick, R. (1958), Enzymatic O-methylation of epinephrine and other catechols. *Journal of Biological Chemistry*, 233, 702-705.
- Bäckström, R., Honkanen, E., Pippuri, A., Kairisalio, P., Pystynen, J., Heinola, K., Nissinen, E., Linden, I.B., Männistö, P.T., Kaakkola, S. (1989), Synthesis of some novel potent and selective catechol-O-methyltransferase inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 32, 841-846.
- Bellmann, R., Kuchling, G., Dehghanyar, P., Zeitlinger, M., Minar, E., Mayer, B.X., Müller, M., Joukhadar, C. (2004), Tissue pharmacokinetics of levofloxacin in human soft tissue infections. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 57, 563-568.
- Benveniste, H. (1989), Brain microdialysis. *Journal of Neurochemistry*, 52, 1667-1679.
- Benveniste, H., Hüttemeier, P.C. (1990), Microdialysis--theory and application. *Progress in Neurobiology*, 35, 195-215.
- Bonifacio, M.J., Vieira-Coelho, M.A., Soares-da-Silva, P. (2003), Kinetic inhibitory profile of BIA 3-202, a novel fast tight-binding, reversible and competitive catechol-O-methyltransferase inhibitor. *European Journal of Pharmacology*, 460, 163-170.
- Borgulya, J., Bruderer, H., Bernauer, K., Zürcher, G., Da Prada, M. (1989), Catechol-O-methyltransferase - Inhibiting Pyrocatechol Derivatives: Synthesis and Structure-Activity Studies. *Helvetica Chimica Acta*, 72, 952-968.
- Borgulya, J., Da Prada, M., Dingemans, J., Scherschlicht, R., Schläppi, B., Zürcher, G. (1991), RO 40-7592-catechol-O-methyltransferase (COMT) inhibitor. *Drugs of the Future*, 16, 719-721.
- CMA/Microdialysis: Training Course in Scientific Research Microdialysis. Stockholm, 2003.
- Contin, M., Martinelli, P., Mochi, M., Riva, R., Albani, F., Baruzzi, A. (2005), Genetic polymorphism of catechol-O-methyltransferase and levodopa pharmacokinetic-pharmacodynamic pattern in patients with Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 20, 734-739.
- Da Prada, M., Kettler, R., Zürcher, G., Schaffner, R., Haefely, W.E. (1987), Inhibition of decarboxylase and levels of dopa and 3-O-methyldopa: A comparative study of benserazide versus carbidopa in rodents and of Madopar standard versus Madopar HBS in volunteers. *European Neurology*, 27, 9-20.
- Dalla Costa, T., Nolting, A., Kovar, A., Derendorf, H. (1998), Determination of free interstitial concentrations of piperacillin-tazobactam combinations by microdialysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 42, 769-778.
- Davies, M.I. (1999), A review of microdialysis sampling for pharmacokinetic applications. *Analytica Chimica Acta*, 379, 227-249.
- De la Penã, A., Liu, P., Derendorf, H. (2000), Microdialysis in peripheral tissues. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 45, 189-216.
- Deleu, D., Sarre, S., Michotte, Y., G., E. (1994), Simultaneous in vivo microdialysis in plasma and skeletal muscle: a study of the pharmacokinetic properties of levodopa by noncompartmental analysis. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 83, 25-28.
- Deleu, D., Sarre, S., Ebinger, G., Michotte, Y. (1995), The effect of carbidopa and entacapone pretreatment on the L-dopa pharmacokinetics and metabolism in blood plasma and skeletal muscle in beagle dog: an in vivo microdialysis study. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 273, 1323-1331.

- Dingemanse, J., Jorga, K., Zürcher, G., Schmitt, M., Sedek, G., Da Prada, M., Van Brummelen, P. (1995), Pharmacokinetic-pharmacodynamic interaction between the COMT inhibitor tolcapone and single-dose levodopa. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 40, 253-262.
- Dingemanse, J., Jorga, K.M., Schmitt, M., Gieschke, R., Fotteler, B., Zürcher, G., Da Prada, M., van Brummelen, P. (1995), Integrated pharmacokinetics and pharmacodynamics of the novel catechol-O-methyltransferase inhibitor tolcapone during first administration to humans. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 57, 508-517.
- Elmqvist, W.F., Sawchuk, R.J. (1997), Application on microdialysis in pharmacokinetic studies. *Pharmaceutical Research*, 14, 267-288.
- Factor, S.A., Molho, E.S., Feustel, P.J., Brown, D.L., Evans, S.M. (2001), Long-term comparative experience with tolcapone and entacapone in advanced Parkinson's disease. *Clinical Neuropharmacology*, 24, 295-299.
- FDA: Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation. In Services, U.S.D.H.H. (ed), 2001.
- Ferreira, J., Almeida, L., Cunha, L., Ticmeanu, M., Rosa, M., Januário, C., Mitu, C.E., Coelho, M., Correia-Guedes, L., Morgadinho, A., Nunes, T., Wright, L., Falcao, A., Sampaio, C., Soares-da-Silva, P. (2007), Effects of Nebicapone on levodopa pharmacokinetics, catechol-O-methyltransferase activity, and motor fluctuations in patients with Parkinson disease. *Clinical Neuropharmacology*, in Press.
- Gabrielsson, J., Weiner, D.: Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Data Analysis: Concepts and Applications. 3th ed., Stockholm, Swedish Pharmaceutical Society, 2000.
- Gomes, P., Soares-da-Silva, P. (1999), Interaction between L-DOPA and 3-O-methyl-L-DOPA for transport in immortalised rat capillary cerebral endothelial cells. *Neuropharmacology*, 38, 1371-1380.
- Guldberg, H.C., Marsden, C.A. (1975), Catechol-O-methyl transferase: pharmacological aspects and physiological role. *Pharmacological Reviews*, 27, 135-206.
- Hauser, R. (2007), Cuidados a longo prazo na doença de Parkinson: Estratégias para o tratamento da reemergência dos sintomas por *wearing-off* e das discinésias. *Geriatrics*, 3, 54-63.
- Johansen, M.J., Newman, R.A., Madden, T. (1997), The use of microdialysis in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacotherapy*, 17, 464-481.
- Joukhadar, C., Frossard, M., Mayer, B.X., Brunner, M., Klein, N., Siostrzonek, P., Eichler, H.G., Müller, M. (2001), Impaired target site penetration of beta-lactams may account for therapeutic failure in patients with septic shock. *Critical Care Medicine*, 29, 385-391.
- Kaakkola, S., Teravainen, H., Ahtila, S., Rita, H., Gordin, A. (1994), Effect of entacapone, a COMT inhibitor, on clinical disability and levodopa metabolism in parkinsonian patients. *Neurology*, 44, 77-80.
- Keränen, T., Gordin, A., Harjola, V.P., Karlsson, M., Korpela, K., Pentikäinen, P.J., Rita, H., Seppälä, L., Wikberg, T. (1993), The effect of catechol-O-methyl transferase inhibition by entacapone on the pharmacokinetics and metabolism of levodopa in healthy volunteers. *Clinical Neuropharmacology*, 16, 145-156.
- Keränen, T., Gordin, A., Karlsson, M., Korpela, K., Pentikäinen, P.J., Rita, H., Schultz, E., Seppälä, L., Wikberg, T. (1994), Inhibition of soluble catechol-O-methyltransferase and single-dose pharmacokinetics after oral and intravenous administration of entacapone. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 46, 151-157.
- Klaassen, D., Watkins III, J.: Toxicologia de Casarett e Doull's. 5ª ed., Lisboa, McGraw-Hill de Portugal, 2001.
- Lambert, D., Waters, C.H. (2000), Comparative tolerability of the newer generation antiparkinsonian agents. *Drugs and Aging*, 16, 55-65.

- Learmonth, D.A., Vieira-Coelho, M.A., Benes, J., Alves, P.C., Borges, N., Freitas, A.P., Soares-da-Silva, P. (2002), Synthesis of 1-(3,4-dihydroxy-5-nitrophenyl)-2-phenyl-ethanone and derivatives as potent and long-acting peripheral inhibitors of catechol-O-methyltransferase. *Journal of Medicinal Chemistry*, 45, 685-695.
- Lönnroth, P., Jansson, P.A., Smith, U. (1987), A microdialysis method allowing characterization of intercellular water space in humans. *American Journal of Physiology*, 253, 228-231.
- Loureiro, A., Fernandes-Lopes, C., Torrão, L., Almeida, L., Wright, L.C., Soares-da-Silva, P.: Metabolism of BIA 3-202, a novel COMT inhibitor: comparison in rat, mouse and human. In EPHAR (Federation of European Pharmacological Societies). Porto, Portugal, 2004.
- Männistö, P.T., Kaakkola, S. (1990), Rationale for selective COMT inhibitors as adjuncts in the drug treatment of Parkinson's disease. *Pharmacology & Toxicology*, 66, 317-323.
- Männistö, P.T., Ulmanen, I., Lundstrom, K., Taskinen, J., Tenhunen, J., Tilgmann, C., Kaakkola, S. (1992), Characteristics of catechol-O-methyl-transferase (COMT) and properties of selective COMT inhibitors. *Progress in Drug Research*, 39, 291-350.
- Männistö, P.T. (1994), Clinical potential of catechol-O-methyltransferase inhibitors as adjuvants in Parkinson's disease. *CNS Drugs*, 1, 172-179.
- Mehvar, R. (2005), Role of Protein Binding in Pharmacokinetics. *American Journal of Pharmaceutical Education*, 69, Article 103.
- Myllylä, V.V., Sotaniemi, K.A., Illi, A., Suominen, K., Keränen, T. (1993), Effect of entacapone, a COMT inhibitor, on the pharmacokinetics of levodopa and on cardiovascular responses in patients with Parkinson's disease. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 45, 419-423.
- Nissinen, E., Linden, I.B., Schultz, E., Pohto, P. (1992), Biochemical and pharmacological properties of a peripherally acting catechol-O-methyltransferase inhibitor entacapone. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 346, 262-266.
- Nutt, J.G., Fellman, J.H. (1984), Pharmacokinetics of levodopa. *Clinical Neuropharmacology*, 7, 35-49.
- Olanow, C.W., Watts, R.L., Koller, W.C. (2001), An algorithm (decision tree) for the management of Parkinson's disease (2001): treatment guidelines. *Neurology*, 56, S1-S88.
- Parada, A., Loureiro, A.I., Vieira-Coelho, M.A., Hainzl, D., Soares-da-Silva, P. (2001), BIA 3-202, a novel catechol-O-methyltransferase inhibitor, enhances the availability of L-DOPA to the brain and reduces its O-methylation. *European Journal of Pharmacology*, 420, 27-32.
- Parada, A., Soares-da-Silva, P. (2003), BIA 3-202, a Novel Catechol-O-Methyltransferase Inhibitor, Reduces the Peripheral O-Methylation of L-DOPA and Enhances Its Availability to the Brain. *Pharmacology*, 68, 29-37.
- Rouru, J., Gordin, A., Huupponen, R., Huhtala, S., Savontaus, E., Korpela, K., Reinikainen, K., Scheinin, M. (1999), Pharmacokinetics of oral entacapone after frequent multiple dosing and effects on levodopa disposition. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 55, 461-467.
- Sarre, S., Deleu, D., Van Belle, K., Ebinger, G., Michotte, Y. (1995), Quantitative microdialysis for studying the in vivo L-DOPA kinetics in blood and skeletal muscle of the dog. *Pharmaceutical Research*, 12, 746-750.
- Schultz, E., Nissinen, E. (1989), Inhibition of rat liver and duodenum soluble catechol-O-methyltransferase by a tight-binding inhibitor OR-462. *Biochemical Pharmacology*, 38, 3953-3956.
- Sharpless, N.S., McCann, D.S. (1971), Dopa and 3-O-methyldopa in cerebrospinal fluid of Parkinsonism patients during treatment with oral L-dopa. *Clinica Chimica Acta*, 31, 155-169.
- Silveira, P., Vaz-da-Silva, M., Almeida, L., Maia, J., Falcao, A., Loureiro, A., Torrao, L., Machado, R., Wright, L., Soares-da-Silva, P. (2003), Pharmacokinetic-pharmacodynamic interaction between BIA 3-202, a novel COMT inhibitor, and levodopa/benserazide. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 59, 603-609.

- Skoog, A.D., West, D.M., Holler, F.J.: Fundamentals of analytical chemistry. 7th ed., Philadelphia, Saunders Golden Sunburst Series, 1996.
- Soares-da-Silva, P., Parada, A., Serrao, P. (2000), The Omethylated derivative of L-DOPA, 3-O-methyl-L-DOPA, fails to inhibit neuronal and nonneuronal aromatic L-amino acid decarboxylase. *Brain Research*, 863, 293–297.
- Soares-da-Silva, P., Vieira-Coelho, M.A., Parada, A. (2003), Catechol-O-methyltransferase Inhibition in Eritocytes and Liver by BIA 3-202 (1-[3,4-dihydroxy-5-nitrophenyl]-2-phenyl-ethanone). *Pharmacology & Toxicology*, 92, 272-278.
- Stenzen, J.A., Topp, E.M., Southard, M.Z., E., L.C. (1993), Examination of microdialysis sampling in a well-characterized hydrodynamic system. *Analytical Chemistry*, 65, 2324-2328.
- Stenzen, J.A. (1999), Methods and issues in microdialysis calibration. *Analytica Chimica Acta*, 379, 337-358.
- Tegeder, I., Schmidtko, A., Bräutigam, L., Kirschbaum, A., Geisslinger, G., Lötsch, J. (2002), Tissue distribution of imipenem in critically ill patients. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 71, 325-333.
- Telting-Diaz, M., Scott, D.O., Lunte, C.E. (1992), Intravenous microdialysis sampling in awake, freely-moving rats. *Analytical Chemistry*, 64, 806-810.
- Van Dongen, J.J., Remie, R., Rensema, J.W., Van Wunnik, G.H.J.: Manual of microsurgery on the laboratory rat. 1, Maastricht and Weesp, Elsevier, 1990.
- Van Zutphen, L.F.M., Baumans, V., Beynen, A.C.: Principles of Laboratory Animal Science. Amsterdam, 2001.
- Waynforth, H.B., Flecknell, P.A.: Experimental and Surgical Technique in the Rat. 2th ed., San Diego, Academic Press, 2001.
- Weiss, D.F., Lunte, C.E. (2000), In vivo microdialysis as a tool for monitoring pharmacokinetics. *Trends in Analytical Chemistry*, 19, 606-616.
- Zhang, J., Qu, F.R., Nakatsuka, A., Nomura, T., Nagai M, Nomoto, M. (2003), Pharmacokinetics of L-dopa in plasma and extracellular fluid of striatum in common marmosets. *Brain Research*, 993, 54-58.
- Zhu, B.T., Patel, U.K., Cai, M.X., Conney, A.H. (2000), O-methylation of tea polyphenols catalyzed by human placental cytosolic catechol-O-methyltransferase. *Drug Metabolism and Disposition*, 28, 1024-1030.
- Zurcher, G., Colzi, A., Da Prada, M. (1990a), Ro 40-7592: inhibition of COMT in rat brain and extracerebral tissues. *Journal of Neural Transmission. Supplementum*, 32, 375-380.
- Zurcher, G., Keller, H.H., Kettler, R., Borgulya, J., Bonetti, E.P., Eigenmann, R., Da Prada, M. (1990b), Ro 40-7592, a novel, very potent, and orally active inhibitor of catechol-O-methyltransferase: a pharmacological study in rats. *Advances in Neurology*, 53, 497-503.