

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

Modelo farmacocinético-farmacodinâmico da metformina baseado na fisiologia (PBPK/PD) em ratos com diabetes induzida por estreptozotocina/nicotinamida

ANDRESSA BRAGA

Porto Alegre, 2017

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

Modelo farmacocinético-farmacodinâmico da metformina baseado na fisiologia (PBPK/PD) em ratos com diabetes induzida por estreptozotocina/nicotinamida

Tese apresentada por **Andressa Braga** como requisito para a obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Bibiana Verlindo de Araujo

Co-Orientador: Prof. Dr. Stephan Schmidt

Porto Alegre, 2017

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 27/10/2017, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr^a. Cristiane Matte

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr^a. Flávia Valladão Thiesen

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Profa. Dr^a. Teresa Cristina Dalla Costa

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

Braga, Andressa
Modelo farmacocinético-farmacodinâmico da metformina baseado na fisiologia (PBPK/PD) em ratos com diabetes induzida por estreptozotocina/nicotinamida / Andressa Braga. -- 2017.

157 f.

Orientadora: Bibiana Verlindo de Araújo.

Coorientador: Stephan Schmidt.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. farmacocinética. 2. metformina. 3. microdiálise. 4. modelo PBPK/PD. 5. ratos diabéticos. I. de Araújo, Bibiana Verlindo, orient. II. Schmidt, Stephan, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório 405 e no Centro Bioanalítico de Medicamentos (CBIM) da Faculdade de Farmácia da UFRGS, no Laboratório Nacional Agropecuário do Rio Grande do Sul (LANAGRO-RS) em Porto Alegre – RS e no *Center for Pharmacometrics & Systems Pharmacology - University of Florida*. O autor recebeu bolsa de estudos CNPq (processo 159722/2013-6) e CAPES/PDSE (processo 88881.132773/2016-01) para doutorado sanduíche na *University of Florida* (Estados Unidos da América).

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dr. Bibiana Verlindo de Araújo por todo suporte ao longo desta jornada, e pela oportunidade em participar do seu grupo de pesquisa e aprender sobre farmacocinética.

Ao Prof. Dr. Stephan Schmidt pela oportunidade de ter participado por um breve período em seu grupo de pesquisa, mas com certeza de muito aprendizado.

Aos colegas “PKs” pela agradabilíssima companhia no decorrer desta jornada, ainda mais intenso durante as viagens aos congressos.

Às minhas companheiras de experimento Jaqueline Izolan e Daiane Dias pela parceria, discussões de resultados e conselhos mesmo em “terras gringas”.

Um agradecimento especial à Carolina Miranda, por ter me acolhido em Orlando e pelas inúmeras ideias trocadas e pelas boas risadas, uma pessoa que sem dúvidas tem um coração enorme.

Aos meus pais por terem compreendido minha ausência neste período. E a minha família, pelo suporte e paciência.

Um agradecimento especialíssimo a quem me incentivou a iniciar o doutorado e em nenhum momento deixou de me animar mesmo nas adversidades, minha “*personal coaching*” e parceira para a vida, Luciana Spagnoli. Obrigada pelos inúmeros puxões de orelha e pela paciência.

RESUMO

A metformina é o fármaco de primeira linha para o tratamento de pacientes com diabetes *mellitus* tipo II (DM II), contudo algumas características farmacocinéticas/farmacodinâmicas (PK/PD) ainda não foram totalmente esclarecidas, como a distribuição no tecido alvo em pacientes diabéticos e o mecanismo de ação. Esta tese se propõe a compreender a distribuição tecidual da fração livre de metformina em um tecido de fácil acesso (músculo) e o seu tecido alvo (fígado), o impacto desse processo em um modelo de diabetes experimental em ratos, bem como a relação entre a concentração livre de metformina no tecido alvo e o efeito anti-hiperglicemiante em ratos diabéticos através de um modelo farmacocinético/farmacodinâmico baseado na fisiologia (PBPK/PD). Visando reproduzir o cenário clínico de pacientes DM II com ausência de dano renal, adaptamos um modelo experimental de DM descrito na literatura, o qual resultou em ratos diabéticos e sem danos hepático e renal. A quantificação de metformina em ratos diabéticos foi dada em duas matrizes: microdialisado tecidual (fígado e músculo), quantificado por CLAE/UV, e plasma por CLAE MS/MS. Os métodos bioanalíticos foram validados de acordo com as diretrizes internacionais e demonstraram-se sensíveis e adequados para caracterizar os perfis farmacocinéticos da metformina em animais diabéticos e controle até 12 h pós dose. A farmacocinética da metformina por abordagem não-compartimental (NCA) foi analisada no software Phoenix® e os dados de PK/PD compartimental foram analisados no software GastroPlus®. A NCA demonstrou que a administração de metformina (50 mg/kg; i.v.) a ratos controle e diabéticos resulta em semelhante concentração livre no fígado e músculo, sem diferença significativa nos parâmetros farmacocinéticos plasmáticos e teciduais entre ambos os grupos. Contudo, observou-se um aumento na exposição do fármaco nos tecidos em relação a fração livre no plasma no grupo controle: ASC₀₋₁₂ fígado vs plasma (116,39 ± 39,71 vs 42,73 ± 22,33 µg.h/mL) e músculo (106,26 ± 43,34 vs 42,73 ± 22,33 µg.h/mL). Já para o grupo diabético observou-se uma tendência de aumento na exposição do músculo quando comparado a concentração livre no plasma (100,69 ± 60,72 vs 44,31 ± 24,11 µg.h/mL). Para a construção do modelo farmacocinético baseado na fisiologia (PBPK), os dados de ambos os grupos foram agrupados devido a semelhança verificada na NCA. Considerando que a metformina é um fármaco com permeabilidade limitada às membranas biológicas, a inclusão de transportadores de

influxo OCT (transportadores orgânicos de cátions) no fígado (OCT-1) e rins (OCT-2) e o transportador de efluxo MATE-1 (proteína extrusora de fármacos e toxinas subtipo 1) no túbulo renal possibilitou a descrição do perfil médio do plasma e tecidos (fígado e músculo) pelo modelo PBPK. Este modelo desenvolvido foi aplicado em indivíduos saudáveis após a administração intravenosa ou oral (389,93 mg) utilizando dados de estudos previamente publicados. A simulação do modelo PBPK conseguiu descrever o perfil médio da metformina em plasma após a administração intravenosa. A extensão do modelo para a administração oral, incluiu o ajuste do tempo de trânsito intestinal e a inserção do transportador de influxo monoamina da membrana plasmática (PMAT) no intestino delgado, descrevendo adequadamente os dados de concentração plasmática observados e prevendo as concentrações intersticiais livres hepática e muscular. O efeito anti-hiperglicemiante da metformina foi avaliado através do teste de tolerância oral a glicose em ratos diabéticos tratados com metformina (50, 100 e 150 mg/kg, i.v.), e em indivíduos saudáveis tratados com metformina (389,93 mg; v.o.). A concentração intersticial hepática para ambas as espécies foram simuladas utilizando o modelo PBPK desenvolvido e correlacionadas ao efeito do fármaco através de um modelo de resposta indireta classe I. O modelo PBPK/PD em ratos diabéticos foi descrito para as doses efetivas de metformina (100 e 150 mg/kg) apresentando menor potência $CI_{50} = 44,68 \mu\text{g}$ e similar eficácia $I_{m\acute{a}x} = 82\%$ quando comparado aos resultados do modelo PBPK/PD em indivíduos saudáveis após a administração oral do fármaco, o qual apresentou $CI_{50} = 1,51 \mu\text{g}$ e $I_{m\acute{a}x} = 100\%$. Esta tese demonstrou que a concentração de metformina em um tecido de fácil acesso (músculo) apresenta similaridade com a concentração livre no seu tecido alvo. Além disso, os modelos baseados na fisiologia desenvolvidos podem ser utilizados como ponto de partida para simular cenários clínicos, de forma a auxiliar na terapia e evitar o efeito adverso de acidose láctica nesses pacientes, bem como contribuir na investigação da interação medicamentosa da metformina com outros fármacos.

Palavras-chave: farmacocinética ; metformina; microdiálise; modelo PBPK/PD; ratos diabéticos.

ABSTRACT

Metformin physiological based pharmacokinetic-pharmacodynamic model (PBPK/PD) in diabetic rats induced by streptozotocin/nicotinamide

Metformin has been used as first-line therapy for type II diabetic patients (DM II), but there are some pharmacokinetics/pharmacodynamics (PK/PD) features not fully clear, for instance, the target tissue distribution in diabetic patients and its mechanism of action. The goal for this study is to understand the metformin free fraction distribution in an accessible tissue (muscle) and its target tissue (liver), as well as the impact of this pharmacokinetic process in an experimental diabetes model in rats. Additionally, we evaluate the correlation between free metformin concentration on the target tissue and metformin antihyperglycemic effect using a physiologically based pharmacokinetic/pharmacodynamic (PBPK/PD) model. We have adjusted a published experimental DM model resulting in rats with no kidney or liver injury in order to reproduce the clinical condition of DM II patients with no kidney injury. Metformin quantification in diabetic rats was performed in two biological matrixes: tissue's microdialysate (liver and muscle) by HPLC/UV, and plasma by HPLC-MS/MS. The bioanalytical methods were validated according to the international guidelines and showed to be sensitive and suitable to characterize the metformin pharmacokinetics in control and diabetic animals up to 12 hours. The metformin non-compartmental pharmacokinetics analysis (NCA) was performed in Phoenix[®] software, while the compartmental PK/PD analyses were performed in GastroPlus[®]. The NCA showed rats (diabetic and control group) treated with metformin (50 mg/kg; i.v.) had similar free concentration in liver and muscle with no statistical difference on pharmacokinetics parameters in plasma or tissues between both groups. It has been identified an increase of drug tissue exposition when compared to unbound plasma concentration from the control group: AUC₀₋₁₂ in liver vs plasma ($116.39 \pm 39.71 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ vs $42.73 \pm 22.33 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$) and in muscle ($106.26 \pm 43.34 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ vs $42.73 \pm 22.33 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$). While for the diabetic group has been observed an upward trend of muscle exposition when compared to the unbound plasma concentration (100.69 ± 60.72 vs $44.31 \pm 24.11 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$). Due to the similar tissue and plasma NCA for both groups, the data was merged to build the physiologically based pharmacokinetic (PBPK) model in rats.

Metformin is a biological membrane permeability limited drug, and it was possible to describe the mean plasma and tissue (liver and muscle) profiles in the PBPK model by including the OCT (organic cation transporters) as influx transporter in the liver (OCT-1) and kidney (OCT-2), and the efflux transporter MATE-1 (multidrug and toxin extrusion protein-1) in the renal tubular lumen. The model developed was applied to healthy subjects, which received metformin by intravenous or oral route (389.93 mg), using data extracted from published studies. The PBPK model simulation described the metformin mean plasma profile after an intravenous administration. The extended model for oral route administration includes an adjustment of transit time and inclusion of PMAT (plasma membrane monoamine transporter) as influx transporter in the small intestine, which described the observed plasma concentration data and predicted the liver and muscle free interstitial concentration. Metformin antihyperglycemic effect was evaluated by a glucose oral tolerance test (OGTT) in diabetic rats that received metformin (50, 100 and 150 mg/kg; i.v.), and healthy subjects treated with metformin by oral route (389.93 mg). The interstitial hepatic concentration in both species were simulated using the PBPK model developed and correlated with the drug effect using class I indirect drug response model. The PBPK/PD metformin model in diabetic rats was developed using the effective doses in the OGTT (100 and 150 mg/kg) showing lower potency ($IC_{50} = 44.68 \mu\text{g}$) and similar efficacy ($I_{\text{max}} = 82\%$) when compared to the PBPK/PD metformin model in healthy subjects that received drug by oral route and showed $IC_{50} = 1.51 \mu\text{g}$ and $I_{\text{max}} = 100\%$. The results presented on this work showed that metformin concentration in a feasible tissue (muscle) is similar to the drug's target tissue concentration. The physiological based model proposed is a starting point to simulate clinical scenarios to support drug therapy and avoid the adverse effect of lactic acidosis in patients, as well as contribute to drug-drug interaction studies.

Keywords: diabetic rats; metformin; microdialysis; pharmacokinetics; PBPK/PD model.

LISTA DE TABELAS

Revisão da Literatura

Tabela 1. Critérios diagnósticos para diabetes *mellitus*.....32

Tabela 2. Parâmetros farmacocinéticos da metformina em ratos.....42

Capítulo 1

Table 1. Metformin bioanalytical method validation in microdialysate samples.....80

Table 2. Biochemical parameters in diabetic rats.....81

Capítulo 2

Table 1. Physicochemical metformin properties used in PBPK model.....102

Table 2. Metformin non-compartmental pharmacokinetic parameters in rats.....103

Table 3. Observed and simulated pharmacokinetics metformin parameters in PBPK model.....104

Capítulo 3

Tabela 1. Parâmetros do modelo PBPK/PD da metformina em ratos.....127

Tabela 2. Parâmetros do modelo PBPK/PD da metformina em humanos.....130

LISTA DE FIGURAS

Revisão da Literatura

Figura 1. Estrutura química aloxano e estreptozotocina.....	34
Figura 2. Efeitos citotóxicos da estreptozotocina.....	36
Figura 3. Estrutura química da metformina.....	39
Figura 4. Ação da metformina na inibição do complexo I mitocondrial.....	47
Figura 5. Ação da metformina na inibição de glicerol fosfato desidrogenase.....	48
Figura 6. Calibração das sondas de microdiálise <i>in vitro</i>	52
Figura 7. Estrutura de um modelo farmacocinético baseado na fisiologia.....	56
Figura 8. Modelo de absorção e compartimento de trânsito avançado.....	57

Capítulo 1

Figure 1. Chromatograms of metformin in rats' microdialysate samples.....	70
Figure 2. Mean metformin free interstitial free concentration in rats.....	71

Capítulo 2

Figure 1. Representative metformin full PBPK model in rats and humans	96
Figure 2 Metformin concentration in tissue and plasma of rats.....	97
Figure 3. Metformin observed and simulated concentration in rats and humans.....	98
Figure B 1 Metformin PBPK model without transporters and gastrointestinal transit modification.....	112

Capítulo 3

Figura 1. Esquema representativo do teste de tolerância oral à glicose.....	119
Figura 2. Perfil do percentual de redução glicêmica em ratos diabéticos.....	121
Figura 3. Glicemia de ratos diabéticos após o teste de tolerância oral à glicose.....	123
Figura 4. Percentual de efeito da metformina em diferentes doses.....	125
Figura 5. Modelo PBPK/PD em ratos diabéticos.....	128
Figura 6. Modelo PBPK/PD em indivíduos saudáveis.....	129

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	17
OBJETIVOS	23
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
1.1 Diabetes <i>mellitus</i>	29
1.2 Modelos animais de diabetes <i>mellitus</i>	33
1.3 Alterações farmacocinéticas em humanos com diabetes	38
1.4 Características farmacocinéticas da metformina em humanos e roedores.....	39
1.5 Transportadores envolvidos no processo ADME da metformina	43
1.6 Mecanismo de ação da metformina	44
1.7 Microdiálise	49
1.8 Modelagem PBPK	53
1.9 Modelagem PK/PD	59
CAPÍTULO 1 – Free interstitial levels of metformin in the liver of healthy and diabetic Wistar rats	65
CAPÍTULO 2 - Prediction of human metformin hepatic target site concentrations using a physiologically-based animal to human scaling approach	85
CAPÍTULO 3 - Modelo PBPK/PD da metformina: uma abordagem translacional de roedores para humanos	113
3.1 Introdução	Erro! Indicador não definido.
3.2 Materiais e métodos.....	Erro! Indicador não definido.
3.2.1 Fármacos e reagentes	Erro! Indicador não definido.
3.2.2 Animais	Erro! Indicador não definido.
3.2.3 Indução da diabetes mellitus em ratos Wistar.....	Erro! Indicador não definido.
3.2.4 Experimento de tolerância oral à glicose.....	Erro! Indicador não definido.
3.2.5 Efeito da metformina em ratos diabéticos.....	Erro! Indicador não definido.
3.2.6 Efeito da metformina em seres humanos saudáveis.....	Erro! Indicador não definido.
3.2.7 Modelo PBPK/PD	Erro! Indicador não definido.
3.2.8 Análise estatística	Erro! Indicador não definido.
3.3 Resultados e discussão	Erro! Indicador não definido.
3.4 Referências.....	Erro! Indicador não definido.
DISCUSSÃO GERAL	133
CONCLUSÕES	141
REFERÊNCIAS GERAIS	145

ANEXOS	155
--------------	-----

A metformina é o antidiabético oral mais prescrito para o tratamento da diabetes *mellitus* tipo II (DM II) como monoterapia ou em associação a outros antidiabéticos. Os estudos acerca das características farmacocinéticas e, principalmente, da farmacodinâmica desse fármaco tem se intensificado. Ainda assim, algumas propriedades permanecem sem completa elucidação, como a distribuição tecidual e o seu mecanismo de ação em nível molecular, bem como a ausência de estudos acerca da sua janela terapêutica (PERNICOVA & KORBONITS, 2014; KAJBAF, DE BROE & LALAU, 2016).

A metformina é um fármaco pertencente a classe III no Sistema de Classificação Biofarmacêutica, apresentando alta solubilidade e baixa permeabilidade a membranas biológicas, o que faz com que os processos farmacocinéticos de absorção, distribuição e eliminação sejam governados por transportadores, permitindo o seu carreamento e eliminação do espaço intracelular. A literatura reporta um comportamento farmacocinético linear quando analisadas as concentrações plasmáticas de metformina no cenário pré-clínico e clínico, baixa ou negligenciável ligação às proteínas plasmáticas e eliminação pela via renal na sua forma inalterada, envolvendo os processos de filtração glomerular e secreção tubular ativa (CHOI, KIM & LEE, 2006; GRAHAM *et al.*, 2011).

Apesar do seu uso bem estabelecido na clínica, 30% dos pacientes não respondem ao tratamento com a metformina (GRAHAM *et al.*, 2011). É também reportada uma alta variabilidade interindividual da concentração plasmática desse fármaco em pacientes DM II, o que pode refletir na resposta farmacodinâmica. Este resultado pode ser advindo de características intrínsecas do indivíduo (GRAHAM *et al.*, 2011; KAJBAF, DE BROE & LALAU, 2016), bem como o estágio de progressão do diabetes que pode produzir alterações em processos fisiológicos, impactando na farmacocinética da metformina (GAITONDE *et al.*, 2016).

A falta de controle glicêmico nos pacientes DM II pode levar a complicações micro e macrovasculares, as quais são responsáveis por alterações dos processos farmacocinéticos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) de fármacos, os quais já foram relatados em pacientes DM II (DOSTALEK, AKHLAGHI & PUZANOVOVA, 2012), bem como em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina

e aloxano (LEE *et al.*, 2010; SRINIVAS, 2015).

Os estudos disponíveis acerca da farmacocinética da metformina consideram os dados relativos a sua disposição, empregando exclusivamente as concentrações plasmáticas. Entretanto, os fármacos antidiabéticos para exercer o efeito farmacológico precisam difundir do compartimento central para o tecido alvo, onde a sua fração livre exercerá a redução dos níveis glicêmicos observados (LANDERSDORFER; JUSKO, William J, 2008), o que evidencia a importância da investigação da concentração livre do fármaco antidiabético no seu tecido alvo e o impacto da doença no processo de distribuição tecidual. Em contrapartida, estudos nesse contexto ainda não foram abordados na literatura para a metformina.

Uma maneira de estudar a concentração de fármaco livre no seu tecido alvo é através da técnica de microdiálise (PLOCK & KLOFT, 2005; CHAURASIA *et al.*, 2007; AZEREDO, DALLA COSTA & DERENDORF, 2014), a qual tem sido amplamente utilizada em nosso grupo de pesquisa para a investigação da farmacocinética de fármacos antimicrobianos (ARAUJO *et al.*, 2008; HURTADO *et al.*, 2014; ZIMMERMANN *et al.*, 2016; TORRES *et al.*, 2017) antitumorais (PIGATTO *et al.*, 2017), anti-psicóticos (CARREÑO *et al.*, 2016) e antidiabéticos (ANDRADE *et al.*, 2014), demonstrando que a microdiálise é uma técnica útil para a investigação da concentração livre de fármacos, sendo possível investigar no cenário pré-clínico o tecido alvo. Estes dados podem ser utilizados para construção de modelos matemáticos como, o modelo farmacocinético baseado na fisiologia (PBPK) (POULIN, 2015; KUEPFER *et al.*, 2016).

Frente às outras abordagens disponíveis, o modelo PBPK possui como vantagem a representação do organismo de uma maneira fisiológica. Apesar de ter uma estrutura compartimental como as demais abordagens, cada compartimento representa um tecido, os quais são interconectados pela taxa de fluxo sanguíneo. Essa abordagem permite a construção do modelo utilizando métodos de extrapolação de dados obtidos *in vitro* para o cenário *in vivo*, previsões de processos passivos *in silico*, bem como a integração com dados experimentais *in vivo*. Sendo assim, esta abordagem permite uma extrapolação do cenário pré-clínico para o clínico de uma maneira mais fidedigna (JONES & ROWLAND-YEO, 2013; KUEPFER *et al.*, 2016). Além disso, é possível investigar a correlação da concentração livre no tecido de

interesse com o efeito do fármaco através da integração do modelo farmacocinético (PBPK) com o modelo farmacodinâmico (PD) estabelecendo o modelo PBPK/PD do fármaco (LANDERSDORFER & JUSKO, 2008; GAITONDE *et al.*, 2016; KUEPFER *et al.*, 2016).

A literatura não reporta até o momento modelo PBPK/PD da metformina. Apesar da existência de alguns estudos reportando a utilização dos modelos clássico e populacional para o estudo PK/PD da metformina no cenário clínico em indivíduos saudáveis (SHIN & KWON, 2004; CHAE *et al.*, 2012;), e pacientes DM II (HONG *et al.*, 2008), os mesmos utilizam a correlação da concentração plasmática do fármaco ao seu efeito anti-hiperglicemiante, conforme anteriormente dito.

Esta é uma abordagem frequente na literatura, onde assume-se que a concentração plasmática livre encontra-se em equilíbrio com a fração livre tecidual. No entanto, essa afirmação nem sempre é a válida para fármacos com permeabilidade limitada a membranas biológicas, como é o caso da metformina (POULIN, 2015).

A investigação da fração livre de metformina no seu tecido alvo ainda não foi abordada na literatura. Visto a sua importância na farmacoterapia da diabetes, o estudo desse fármaco utilizando uma abordagem farmacocinética mecanística permite a construção do modelo a partir do cenário pré-clínico e posterior extrapolação para o cenário clínico. Por fim, a integração dos dados farmacocinéticos ao farmacodinâmico no modelo PBPK/PD permitirá compreender melhor a relação da concentração livre no tecido alvo e seu mecanismo de ação, bem como simular cenários não testados com o intuito de avaliar a terapêutica desse antidiabético.

Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo investigar as concentrações livres de metformina no sítio de ação (fígado) e em um tecido periférico envolvido no mecanismo de ação e de fácil acesso (músculo) e correlacionar estes dados com a concentração plasmática de ratos diabéticos e controle. A construção do modelo PBPK suportado pelos dados pré-clínicos possibilitará a extrapolação para o cenário clínico e conseqüente previsão da concentração do fármaco livre no fluido intersticial hepático e muscular em humanos. O conhecimento das concentrações intersticiais hepáticas de metformina em função do tempo será correlacionado ao seu efeito anti-hiperglicemiante através do modelo PBPK/PD em ratos e humanos.

OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver um modelo PBPK/PD capaz de descrever o curso do efeito da metformina *versus* tempo, utilizando as concentrações no tecido alvo, em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina/nicotinamida.

Para alcançar esse objetivo geral, os seguintes objetivos específicos foram delineados:

- Desenvolver e validar uma metodologia analítica para o doseamento de metformina em plasma e microdialisado de tecido muscular e hepático;
- Adaptar o modelo animal de diabetes induzido por estreptozotocina e nicotinamida a ratos Wistar machos;
- Determinar a concentração de metformina em tecido hepático e muscular através da técnica de microdialise, bem como a concentração plasmática em ratos controle e diabéticos induzidos por estreptozotocina e nicotinamida após administração de dose intravenosa *in bolus* de 50 mg/kg.;
- Modelar os dados farmacocinéticos plasmáticos e teciduais, obtidos após a administração intravenosa de metformina utilizando um software de modelagem farmacocinética baseado na fisiologia (PBPK);
- Aplicar o modelo PBPK desenvolvido no cenário pré-clínico para a administração de metformina pela via oral em humanos, utilizando dados extraídos da literatura;
- Avaliar o efeito de redução da glicemia produzido pela metformina após administração intravenosa das doses de 50, 100 e 150 mg/kg através do teste de tolerância oral a glicose e modelar o curso do efeito da metformina em função do tempo, utilizando um modelo PBPK/PD em ratos diabéticos.
- Modelar o curso do efeito da metformina em função do tempo através de um modelo PBPK/PD em humanos, utilizando o modelo desenvolvido em roedores e dados extraídos da literatura, para fins de translação das informações obtidas em animais para humanos.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Diabetes *mellitus*

Devido ao grande aumento do número de casos, a diabetes *mellitus* tornou-se a nova epidemia global. Em 2015 mais de 400 milhões de indivíduos foram acometidos pela doença mundialmente e estima-se que até 2040 o número de casos aumente mais do que 50%, sendo que os países em desenvolvimento são os mais afetados. O Brasil é o quarto país com maior número de indivíduos acometidos por essa doença (14,3 milhões), sendo que os gastos na saúde pública superam 21 bilhões de dólares americanos, o que representa o maior gasto anual quando comparado aos demais países da América do Sul e Central. As complicações microvasculares (nefropatia, retinopatia e neuropatia) e em especial as complicações macrovasculares (doenças cardíacas) são responsáveis por 1,5 milhões de mortes prematuras em pacientes diabéticos anualmente (FEDERAÇÃO INTERNACIONAL DE DIABETES, 2015).

Os principais tipos de diabetes, são: diabetes *mellitus* tipo I (DM I), diabetes *mellitus* tipo II (DM II) e a diabetes *mellitus* gestacional (DMG). As principais características das diferentes expressões da doença, serão descritas a seguir.

A DM I pode ser mediada pelo sistema imune ou ser de causa idiopática. Com relação à DM I mediada pelo sistema imune, essa afeta predominantemente crianças e adolescentes e, em menor número, indivíduos adultos. Essa expressão da doença caracteriza-se pela destruição das células β -pancreáticas devido a uma resposta autoimune do indivíduo. A etiologia da DM I autoimune ocorre devido principalmente a fatores genéticos e em menor magnitude a fatores ambientais. Em geral, o primeiro sintoma em crianças é a cetoacidose, devido à rápida destruição das células β -pancreáticas e consequente insulinoopenia. Característica esta que difere em indivíduos adultos que expressam a DM I, em geral nesta idade a destruição das células β -pancreáticas ocorre de forma lenta (ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE DIABETES, 2016).

Em menor frequência, a DM I de causa idiopática acomete indivíduos que apresentam insulinoopenia permanente e alta incidência a cetoacidose diabética. No entanto, essa forma de expressão não possui evidência de resposta autoimune às células β -pancreáticas (ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE DIABETES, 2016).

No momento do diagnóstico da DM I, em geral, os indivíduos apresentam altos

níveis de glicose sanguínea e aproximadamente um terço apresenta níveis críticos de cetoacidose diabética. O tratamento destes pacientes é realizado através da insulinoterapia (ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE DIABETES, 2016).

A diabetes *mellitus* gestacional, caracteriza-se por um quadro de intolerância à glicose diagnosticado durante o segundo ou terceiro trimestre da gestação, tais níveis glicêmicos não se enquadram nos critérios diagnósticos de DM I ou DM II, sendo caracterizado como um estado de pré-diabetes. Podendo esse quadro evoluir à DM II após a gestação ou retornar aos níveis glicêmicos ideais (ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE DIABETES, 2016).

A diabetes *mellitus* tipo II representa 90% dos casos diagnosticados da doença (FEDERAÇÃO INTERNACIONAL DE DIABETES, 2015; ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE DIABETES, 2016). Possui etiologia decorrente de características genéticas e ambientais, como o estilo de vida sedentário, ingestão de uma dieta altamente calórica e rica em gorduras, e principalmente a obesidade como fatores de desenvolvimento da doença (FORBES & COOPER, 2013). Em geral se manifesta em indivíduos na idade adulta, mas devido aos altos índices de obesidade na população, houve um aumento no número de casos da doença em crianças, adolescentes, bem como em gestantes não diagnosticadas (ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE DIABETES, 2016).

De modo a compreender as mudanças bioquímicas relacionadas à doença, será descrito brevemente a homeostase da glicose em um estado euglicêmico e diabético tipo II.

No estado euglicêmico a homeostase da glicose sanguínea, após a ingestão de uma refeição contendo carboidratos, se dá pela secreção de insulina pelas células β -pancreáticas e inibição da secreção de glucagon. As mudanças na glicemia, na insulinemia e nos níveis de glucagon acarretam na supressão da gliconeogênese no tecido hepático, bem como na estimulação da captação de glicose pelos tecidos periféricos e inibição da lipólise. No entanto, a DM II caracteriza-se por distúrbios em todas as fases da homeostase da glicose. A glicemia em jejum é alterada, devido ao elevado nível de glucagon, somado ao aumento da produção basal de glicose hepática. Após a ingestão de alimentos, a inibição de glucagon e conseqüentemente da lipólise é prejudicada, mantendo altos níveis. Além destes parâmetros, a secreção de insulina pelas células β -pancreáticas, bem como a captação de glicose pelos

tecidos periféricos também são reduzidas (DEFRONZO *et al.*, 2015). Desta forma, a fase inicial da doença é caracterizada pela resistência à insulina nos tecidos periféricos, somado à deficiência de secreção desse hormônio pelas células β -pancreáticas, resultando em hiperglicemia crônica e distúrbios no metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas (FORBES & COOPER, 2013).

A DM II pode apresentar-se assintomática por muitos anos, devido à gradual disfunção das células β -pancreáticas. Estima-se que 30% dos indivíduos são assintomáticos. No entanto, as complicações micro e macrovasculares ocorrem igualmente neste quadro, onde o diagnóstico geralmente é realizado quando o indivíduo já apresenta hiperglicemia severa ou mesmo cetoacidose diabética (DEFRONZO *et al.*, 2015; ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE DIABETES, 2016).

O diagnóstico precoce da doença, assim como o acompanhamento dos níveis glicêmicos associadas à mudança do estilo de vida e intervenção farmacológica são essenciais para reduzir os riscos de desenvolvimento das complicações decorrentes da progressão da doença e assim aumentar a qualidade de vida do paciente diabético (ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE DIABETES, 2016).

A Tabela 1 demonstra os níveis glicêmicos utilizados como critério para o diagnóstico da DM e DMG, o qual é realizado baseado nos sintomas clínicos como perda ponderal, poliúria, polidipsia acompanhados de testes de glicemia em período eventual, glicemia em jejum e após uma carga oral de glicose (ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE DIABETES, 2016). O teste de tolerância oral à glicose é realizado geralmente administrando 75 g de glicose anidra, os níveis glicêmicos são aferidos após duas horas ou em casos mais específicos, como a investigação da DMG, os níveis glicêmicos são acompanhados 1 e 2 h após receber a carga de glicose oral (ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE DIABETES, 2016).

A glicemia em jejum reflete a resistência à insulina em nível hepático e a redução da função das células β -pancreáticas na primeira fase da secreção de insulina após a ingestão de alimentos. Já a carga oral de glicose (teste tolerância oral a glicose) representa a resistência à insulina nos tecidos periféricos, bem como a menor função das células β -pancreáticas em secretar insulina em sua fase tardia após uma refeição, caracterizando a segunda fase de secreção de insulina (ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE DIABETES, 2016).

Recentemente adicionou-se a hemoglobina glicada (HbA1C) no critério diagnóstico da DM I e DM II. Este parâmetro infere a glicemia média dos últimos 60 a 90 dias do paciente, possuindo forte correlação com o desenvolvimento de complicações micro e macrovasculares oriundas do pobre controle glicêmico do paciente diabético (ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE DIABETES, 2016).

Tabela 1. Resumo dos critérios diagnósticos para pré-diabetes, diabetes mellitus (DM), e diabetes mellitus gestacional (DMG) de acordo com a Associação Americana de Diabetes, 2016.

Critério	Pré-diabetes	DM	DMG
Glicemia eventual (mg/dL)*	≥200	≥200	-
Glicemia em jejum (mg/dL)	100 – 125	≥126	≥92
Glicemia (mg/dL) 1h após TTOG (75 g)	-	-	≥180
Glicemia (mg/dL) 2h após TTOG (75 g)	140 – 199	≥200	≥153
HbA1C	5.7 – 6.5	≥6.5%	-

*acompanhada dos sintomas clássicos: poliúria, polidipsia e perda ponderal sem causa evidente

TTOG= Teste de tolerância oral a glicose; HbA1C= Hemoglobina glicada.

Jejum refere-se a um período mínimo de 8 horas sem a ingesta calórica.

Em relação ao tratamento para a DM II, recomenda-se como intervenção primária a mudança no estilo de vida do paciente, quando este fator não for suficiente, inicia-se a farmacoterapia (ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE DIABETES, 2016).

O fármaco de primeira escolha é o anti-hiperglicemiante metformina, devido ao alto índice de tolerância e baixo índice de efeitos adversos. Quando a monoterapia com metformina não for mais eficiente no controle glicêmico, associa-se um fármaco antidiabético com mecanismo de ação distinto a esse anti-hiperglicemiante (BRIETZKE, 2015).

Visto que a DM II é uma doença de causas multifatoriais e complexa, o tratamento contínuo do paciente é realizado em diferentes frentes, a fim de controlar os níveis glicêmicos e minimizar os riscos multifatoriais como as complicações

microvasculares (retinopatia, nefropatia e neuropatia) e macrovasculares (cardíacas). O auto-cuidado contínuo e acompanhamento médico são essenciais para a manutenção dos níveis glicêmicos, lipêmicos e pressão sanguínea dos pacientes diabéticos (DEFRONZO *et al.*, 2015).

1.2 Modelos animais de diabetes *mellitus*

Os modelos animais são ferramentas úteis para a avaliação farmacocinética/farmacodinâmica (PK/PD) de fármacos ou ainda possibilitam uma melhor compreensão da doença em evidência (GHASEMI, KHALIFI & JEDI, 2014; SRINIVAS, 2015). No caso da DM, alguns animais que apresentam semelhança à patologia humana são: primatas não-humanos, porcos, cachorros, gatos, coelhos, camundongos e ratos. Considerando a facilidade da manipulação e custos, além da semelhança genética e fisiopatológica à DM desenvolvida em humanos, os roedores são o modelo animal de escolha para o estudo de fármacos antidiabéticos e compreensão da evolução da doença (ISLAM & WILSON, 2012; GHASEMI, KHALIFI & JEDI, 2014).

O modelo animal de DM em roedores pode ser classificado de duas formas: o modelo animal espontâneo, o qual o animal possui alteração genética, culminando no desenvolvimento da doença, e o modelo animal não espontâneo chamado também de modelo animal experimental de diabetes, no qual o roedor é induzido à doença através da administração de agentes químicos, alimentação baseada em uma dieta altamente calórica, pela combinação destes dois métodos ou ainda através de métodos cirúrgicos, como a pancreatectomia parcial (ISLAM & WILSON, 2012; GHASEMI, KHALIFI & JEDI, 2014).

Apesar de não existir um modelo animal que reproduza fielmente a doença humana, o modelo experimental de diabetes apresenta um ou mais fatores semelhantes, além disso, o baixo custo quando comparado ao modelo espontâneo faz desse, o modelo mais utilizado na literatura (ISLAM & WILSON, 2012; GHASEMI, KHALIFI & JEDI, 2014). Os indutores químicos mais utilizados são o aloxano (ALX) e a estreptozotocina (STZ) (GHASEMI, KHALIFI & JEDI, 2014). A estrutura química de ambos agentes químicos é ilustrada na Figura 1.

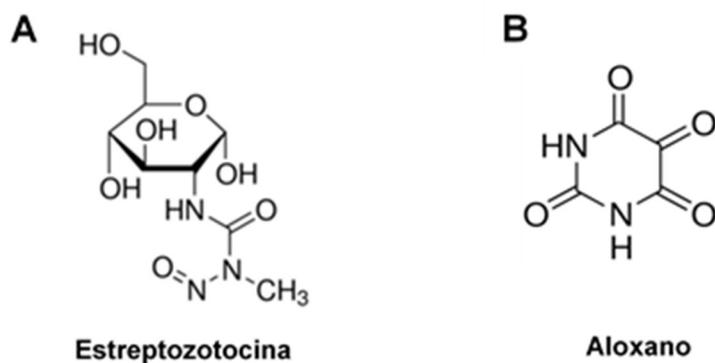


Figura 1. Estrutura química dos principais agentes químicos indutores de diabetes mellitus experimental em roedores, estreptozotocina (**A**) e aloxano (**B**).

A literatura é controversa quanto a classificação da DM induzida através da administração de ALX e STZ em roedores e, dessa forma, alguns autores classificam como DM I (KING, 2012; SZKUDELSKI, 2012), enquanto outros classificam como DM II (ISLAM & WILSON, 2012; SRINIVAS, 2015). Esta divergência é explicada pela diferença dos níveis glicêmicos dos animais, decorrente da dose administrada do agente químico, bem como a espécie animal utilizada nos estudos (ELEAZU *et al.*, 2013).

Sabe-se que o ALX apresenta uma toxicidade superior à STZ na destruição das células β -pancreáticas, devido à sua maior afinidade por essas células. Além disso, o modelo animal obtido com a administração de ALX não apresenta uma glicemia estável, em alguns casos pode haver a reversão do estado diabético, fazendo com que este modelo animal tenha aplicação em estudos de curta duração. Desta forma, a STZ possui maiores vantagens quando comparado ao ALX, resultando em animais com hiperglicemia estável. Esse modelo pode ser utilizado tanto em estudos de curta quanto de longa duração, ao que se atribui maior popularidade ao uso deste agente químico (SZKUDELSKI, 2012; GHASEMI, KHALIFI & JEDI, 2014; RADENKOVIĆ, STOJANOVIĆ & PROSTRAN, 2016).

A estreptozotocina é produzida a partir da bactéria *Streptomyces achromogenes* e um análogo nitrosouréia (N-metil-N-nitrosouréia) o qual é ligado a uma hexose. Esse agente químico possui alta afinidade às células β -pancreáticas. A hexose, presente na molécula, liga-se ao transportador de glicose 2 (GLUT-2) nas células β -pancreáticas, sendo dessa forma captada. No entanto, rins e fígado também possuem

a expressão de GLUT-2, explicando o efeito tóxico da estreptozotocina nestes órgãos.

A porção nitrosamina na molécula de STZ é responsável pelo efeito citotóxico deste agente diabetogênico. Conforme demonstrado na Figura 2, o mais importante dos efeitos tóxicos é a alquilação do DNA celular, o qual irá gerar um aumento da enzima nuclear de reparo poli (adenosina difosfato-ribose) polimerase-1 (PARP-1), levando a uma redução de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NAD) e adenosina trifosfato (ATP). A biossíntese de adenosina difosfato (ADP) é dependente de ATP, desta forma haverá uma redução energética da célula. A depleção de ATP também ocorre pela redução do consumo de oxigênio mitocondrial, culminando desta forma, na apoptose das células β -pancreáticas. Além disso, o dano no DNA irá ocasionar morte celular através do aumento do estresse oxidativo e óxido nítrico (NO) (SZKUDELSKI, 2012; ELEAZU *et al.*, 2013; GHASEMI, KHALIFI & JEDI, 2014).

Após a administração, os efeitos da STZ são definidos em três fases. A primeira fase ocorre 2 a 4 horas após a administração, na qual os animais encontram-se em estado hiperglicêmico devido principalmente à mobilização de glicogênio hepático ou mesmo à redução dos níveis séricos de insulina. A segunda fase caracteriza-se pela hipoglicemia, ocorrendo de 6 a 10 horas após a administração, decorrente do aumento dos níveis de insulina. Por fim, a terceira fase caracteriza-se por hiperglicemia permanente e ocorre 24 horas após a administração do agente, levando às manifestações de poliúria, glicosúria, hiperglicemia e redução da viabilidade das células β -pancreáticas para produção de insulina, permanecendo pelo período de 2 a 8 semanas após a administração (ELEAZU *et al.*, 2013; GHASEMI, KHALIFI & JEDI, 2014).

A administração somente de STZ ocasiona um estado de hiperglicemia muito elevado, com danos extensivos a outros tecidos. Desta forma, alguns grupos de pesquisa utilizam o protocolo da administração de um protetor das células β -pancreáticas previamente à administração de STZ, com o intuito de obter um modelo animal que apresente estado hiperglicêmico moderado (MASIELLO *et al.*, 1998; SZKUDELSKI, 2012; ELEAZU *et al.*, 2013; GHASEMI, KHALIFI & JEDI, 2014).

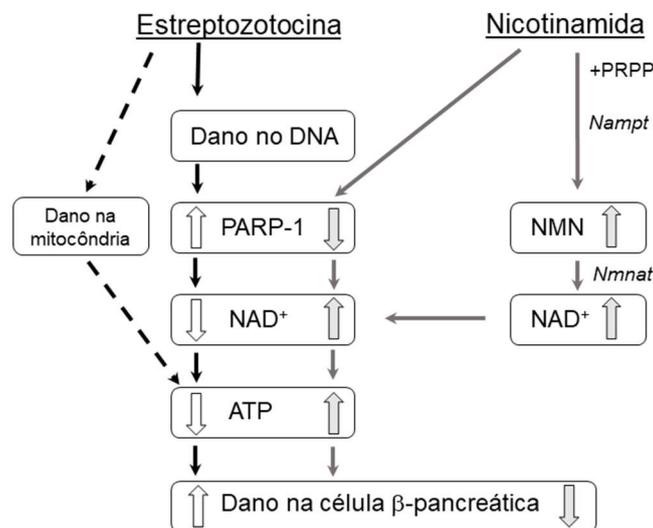


Figura 2. Representação esquemática dos efeitos citotóxicos da estreptozotocina e ações protetoras da nicotinamida nas células β-pancreáticas. PARP-1, poli (adenosina trifosfato [ADP]-ribose) polimerase-1; PRPP, 5-fosforibosilpirofosfato; NMN, mononucleotídeo de nicotinamida; Nampt, fosforibosiltransferase de nicotinamida; Nmnat, mononucleotídeo adenililtransferase de ácido nicotínico/nicotinamida; ↑, aumento/ativação; ↓, redução/inativação (Retirado de Szkudelski, 2012).

A nicotinamida (NA) ou vitamina B3 (niacina), é geralmente administrada previamente à estreptozotocina, com o objetivo de prevenir alguns danos ocasionados pelo agente diabetogênico, obtendo um modelo de diabetes moderado. O mecanismo de ação protetor atribuído à NA, específico para as células β-pancreáticas, ocorre principalmente pela prevenção do dano ao DNA celular ocasionado pela STZ, o que levará à inibição de PARP-1, além de um aumento de NAD intracelular em diversos tecidos, prevenindo a apoptose da célula β-pancreática (Figura 2) (SZKUDELSKI, 2012; GHASEMI, KHALIFI & JEDI, 2014).

A administração de NA e STZ a roedores leva a um estado de hiperglicemia estável, causando polidipsia e polifagia, sendo responsivo a fármacos hipoglicemantes, pois ainda há células β-pancreáticas funcionantes, visto que 60% a 40% do estoque de insulina são preservados. Outra alteração bioquímica é o aumento em 40% dos triglicerídeos, sem afetar o colesterol plasmático. No entanto, este modelo não ocasiona resistência à insulina ou alteração da insulina plasmática, como

observado no modelo animal de diabetes induzido pelo fornecimento de uma dieta altamente calórica (GHASEMI, KHALIFI & JEDI, 2014). Além disso, como discutido anteriormente os efeitos tóxicos da STZ incluem outros órgãos como fígado e rins, onde a produção de radicais livres ocasiona apoptose nas células destes tecidos (MASIELLO *et al.*, 1998; SZKUDELSKI, 2012; ELEAZU *et al.*, 2013; GHASEMI, KHALIFI & JEDI, 2014).

Diante destas características descritas, a indução de diabetes em roedores não-obesos, através da administração de estreptozotocina e nicotinamida, caracteriza um modelo animal de DM II, interessante para o teste de fármacos antidiabéticos, estudo das complicações da doença (cardiovasculares, nefropatia e neuropatia) (SZKUDELSKI, 2012; GHASEMI, KHALIFI & JEDI, 2014), bem como a influência da doença na farmacocinética de fármacos, uma abordagem ainda pouco explorada que dispõe de alguns estudos utilizando antidiabéticos orais comercialmente disponíveis os quais são reportados na literatura como a metformina (PANDIT *et al.*, 2013) a pioglitazona e exenatina (NOVELLI *et al.*, 2014) e a sitagliptina (BAERTS *et al.*, 2015).

A hiperglicemia crônica, característica da diabetes, ocasiona mudanças fisiológicas em diferentes sistemas, o que pode refletir nos processos farmacocinéticos de diversos fármacos. Algumas alterações dos processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME), reportadas na literatura em modelo animal de diabetes induzido por STZ são descritas a seguir (LEE *et al.*, 2010; SRINIVAS, 2015).

A diabetes em roedores ocasiona um retardo no trânsito intestinal, podendo alterar o processo de absorção de fármacos. Já a distribuição pode estar alterada devido à desidratação intracelular ou à mudança da fração de fármaco ligado às proteínas plasmáticas. Este último fator está relacionado ao elevado nível de ácidos graxos e glicemia plasmática, levando ao aumento da fração livre de alguns fármacos (LEE *et al.*, 2010).

As alterações decorrentes da doença descritas a nível hepático são o aumento do fluxo sanguíneo neste órgão, alteração na expressão de transportadores e isoenzimas do citocromo P450. A hepatotoxicidade ocasionada pela STZ também é responsável pelo aumento da secreção biliar, fator este que poderá resultar na

alteração da farmacocinética de fármacos influenciados por este processo. A alteração do fluxo hepático é mais crítico para fármacos de intermediária e alta extração hepática, os quais são dependentes deste fator (LEE *et al.*, 2010).

Em relação à eliminação de fármacos que possuem como principal via de eliminação a renal, a DM poderá impactar a farmacocinética devido ao aumento de fluxo urinário nos animais. Por outro lado, devido a nefrotoxicidade provocada pela STZ, a eliminação de fármacos pode ser reduzida, devido aos danos renais característico desse modelo experimental de DM (LEE *et al.*, 2010).

Deste modo, é importante a compreensão do impacto das alterações ocasionadas por esta doença na resposta farmacológica de fármacos antidiabéticos, tanto a nível plasmático quanto na sua biofase.

1.3 Alterações farmacocinéticas em humanos com diabetes

Devido às complicações micro e macro vasculares ocasionadas pelo pobre controle glicêmico em pacientes DM II, algumas alterações dos processos farmacocinéticos são reportadas também em humanos.

É descrito na literatura, que a hiperglicemia crônica ocasiona redução do fluxo sanguíneo tecidual, o qual podem refletir na alteração da absorção de fármacos (DOSTALEK, AKHLAGHI & PUZANOVOVA, 2012), tais como a redução da absorção de benzilpenicilina após a administração intramuscular (LERNER & WEINSTEIN, 1964). Em relação a administração oral, a absorção pode alterar devido a mudança do pH gástrico, atraso do esvaziamento gástrico bem como alterações do trânsito intestinal (DOSTALEK, AKHLAGHI & PUZANOVOVA, 2012). A ampicilina quando administrada pela via oral em pacientes DM II demonstrou redução da sua absorção devido ao atraso no tempo de trânsito intestinal (ADITHAN *et al.*, 1989). Além disso, a hiperglicemia crônica pode ocasionar a glicação não-enzimática da albumina ocasionando uma mudança na sua conformação sem alterar os níveis séricos, resultando na alteração da fração livre de fármaco ácidos. Com relação a glicoproteína- α -1 ácida os dados na literatura são contraditórios. As alterações hepáticas envolvem a redução ou aumento na expressão de isoenzimas do citocromo P-450, ocasionando alterações na biotransformação de fármacos substratos dessas

isoenzimas. Por fim, a eliminação de fármacos pode ser alterada devido ao aumento da filtração glomerular, ocasionando a maior excreção de fármacos que possuem eliminação por esse mecanismo (DOSTALEK, AKHLAGHI & PUZANOVOVA, 2012).

1.4 Características farmacocinéticas da metformina em humanos e roedores

Aprovada na Europa em 1957 e nos Estados Unidos em 1995, a metformina (Figura 3) está disponível na forma farmacêutica de comprimido através de duas apresentações do sal cloridrato: liberação imediata ou liberação controlada. As doses recomendadas variam de 1 a 2,5 g diárias, divididas em 2 a 3 tomadas (ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE DIABETES, 2016), sendo que a biodisponibilidade oral em humanos varia de 40 – 60% (GRAHAM *et al.*, 2011). Entre os efeitos colaterais da metformina tem-se os efeitos gastrintestinais transitórios como vômito e diarreia, sendo recomendada a sua administração concomitante às refeições (BLONDE *et al.*, 2004).

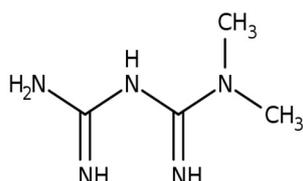


Figura 3. Estrutura química da metformina

A metformina apresenta um comportamento farmacocinético linear tanto em humanos (GRAHAM *et al.*, 2011) quanto em roedores (CHOI, KIM & LEE, 2006), a ligação às proteínas plasmáticas é negligenciável em humanos (GRAHAM *et al.*, 2011). Em ratos também apresenta ligação baixa, em torno de 9 -15% (CHOI, KIM & LEE, 2006; CHOI *et al.*, 2008).

Por se tratar de um fármaco altamente polar, de elevada fração livre e extensivamente eliminado através de secreção tubular, a fração de metformina eliminada de forma inalterada na urina em humanos é de 78 a 99% e em ratos de 65 a 77,8% (CHOI, KIM & LEE, 2006; GRAHAM *et al.*, 2011). Desta forma, é importante que a dose para indivíduos com função renal alterada apresentando *clearance* da creatinina (CL_{cr}) < 60 mL/min, seja revista bem como o prosseguimento dessa terapia,

tendo em vista que a função renal reduzida irá levar ao acúmulo do fármaco no organismo, podendo culminar na acidose láctica, efeito adverso mais temido na terapia da metformina, visto que 50% dos casos podem levar ao óbito (GRAHAM *et al.*, 2011).

Há uma grande variabilidade interindividual clínica nos parâmetros farmacocinéticos deste fármaco quando administrado pelas vias intravenosa e oral (GRAHAM *et al.*, 2011). Em indivíduos saudáveis observa-se uma faixa de meia vida ($t_{1/2}$) de 1,74 à 4,5 h, volume de distribuição (Vd) de 63 à 276 L e *clearance* total aparente (CL) de 441 à 706 mL/min (GRAHAM *et al.*, 2011). Essa grande variabilidade em indivíduos que apresentam a função renal normal poderia explicar a não responsividade de um terço dos pacientes ao tratamento com metformina (GRAHAM *et al.*, 2011; PERNICOVA & KORBONITS, 2014; KAJBAF, DE BROE & LALAU, 2016). Apesar de não estar elucidado o mecanismo atrelado a este fenômeno, uma das hipóteses seria a alteração genética na expressão dos transportadores localizados no tecido alvo, acarretando no menor transporte de fármaco para os hepatócitos (GRAHAM *et al.*, 2011).

A compreensão da farmacocinética de fármacos envolve procedimentos que são difíceis ou eticamente inviáveis de serem realizados em humanos. Desta forma, o estudo em espécies pré-clínicas torna-se uma alternativa para a melhor compreensão de processos como elucidação do efeito de primeira passagem e distribuição tecidual.

Em um estudo em ratos saudáveis, após a administração de três doses de metformina (50, 100 e 200 mg/kg) pela via intravenosa, observou-se eliminação da forma inalterada na urina superior a 74%, confirmando que esta é a principal via de eliminação da metformina. A fração restante corresponde a eliminação pela via não-renal (CL_{NR}), onde 24% pode ser atribuído a metabolização da metformina pelas CYPs 2C11, 2D1 e 3A1/2 e uma pequena parte desta (0,343% da dose) correspondendo a <2% do CL_{NR} é realizada pelo ducto biliar (CHOI, KIM & LEE, 2006).

Em ratos, a administração pela via oral na dose de 100 mg/kg, resultou em uma biodisponibilidade de 29,9%. Este baixo percentual, 53,8% foi atribuído ao metabolismo intestinal ou acúmulo do fármaco nas células intestinais, 11,3% ao efeito de primeira passagem hepática, uma pequena fração é eliminada inalterada nas fezes (4,39%), já a excreção biliar é negligenciável, representando 0,392% da dose (CHOI,

KIM & LEE, 2006; PROCTOR, BOURDET & THAKKER, 2008).

A farmacocinética da metformina também tem sido estudada em diferentes modelos animais de diabetes. A indução do diabetes em ratos, através da administração de aloxano, causou alterações dos parâmetros farmacocinéticos da metformina (100 mg/kg, i.v.), observados 4 e 25 dias após a indução da DM. Resultando em aumento na área sob a curva (ASC_{0-inf}) em consequência da redução do *clearance* renal (CL_R) (LEE, CHOI & LEE, 2008).

Por outro lado, quando a DM é induzida em ratos pela administração de estreptozotocina (45 mg/kg, i.v.), a avaliação da farmacocinética da metformina (100 mg/kg, i.v.) 7 ou 29 dias após a indução, acarretou no aumento do CL_R com consequente redução da ASC_{0-inf} . Este resultado pode ser explicado devido a poliúria ocasionada pela DM nos animais, visto que a eliminação da metformina é predominantemente pela via renal, o aumento do fluxo de urina nos animais diabéticos refletiu no aumento do CL_R da metformina (CHOI *et al.*, 2008).

Apesar dos autores justificarem que a alteração dos parâmetros farmacocinéticos da metformina em animais diabéticos induzidos por estreptozotocina não ter sido decorrente da toxicidade do agente indutor, pois as alterações nos níveis de transaminases (AST e ALT) foram observados tanto em 7 quanto em 29 dias após a indução da diabetes (CHOI *et al.*, 2008), o aumento nos níveis destas transaminases é um indicativo de dano hepático e/ou renal.

Outro parâmetro bioquímico alterado em ambos os modelos animais foi o nitrogênio ureico, o qual apresentou aumento dos níveis, indicando dano renal. É importante levar em consideração esse fator, visto que a metformina possui eliminação por esta via. A literatura descreve que modelos animais de DM utilizando estreptozotocina e aloxano causam danos renais e hepáticos, devido a afinidade destes agentes químicos pelos transportadores GLUT-2 localizados nestes órgãos e células β -pancreáticas (LEE *et al.*, 2010).

A metformina é um fármaco de baixa extração hepática (CHOI *et al.*, 2006), cujo depuração é dependente do *clearance* intrínseco, uma vez que sua ligação a proteínas plasmáticas é muito baixa (10-15%), o que resulta em um padrão de fármaco proteína-plasmática insensível. A Tabela 2 resume os principais parâmetros farmacocinéticos da metformina em ratos após a indução da DM utilizando aloxano e

estreptozotocina (CHOI *et al.*, 2008; LEE, CHOI & LEE, 2008).

Tabela 2. Resumo dos principais parâmetros farmacocinéticos da metformina (100 mg/kg, i.v.) em ratos saudáveis e diabéticos induzidos por diferentes agentes químicos: aloxano (ALX) e estreptozotocina (STZ).

Parâmetro	Ratos controles ^a (n = 9)	Ratos diabéticos ^b ALX (n = 6)	Ratos diabéticos ^c STZ (n = 11)
$t_{1/2}$ (h)	2,38 ± 0,49	3,16 ± 0,67	3,7 ± 1,13
ASC (ug.min/mL)	4080 ± 720	6920 ± 1160	3460 ± 565
CL (mL/min/kg)	24,5 ± 3,96	14,1 ± 3,14	28,1 ± 2,58
Ae _{0-24h} (% da dose)	77,8 ± 11,1	77,3 ± 5,87	75,1 ± 5,50
Vd (mL/Kg)	586 ± 161	573 ± 147	1090 ± 402
f _u (%)	85	84,4 ± 6,58	88 ± 0,868
F (%)	29,9	35,1	33,5

$t_{1/2}$, tempo de meia vida; ASC, área sob a curva; CL, clearance; Ae_{0-24h} Percentual da dose de metformina excretada na forma inalterada na urina; Vd, volume de distribuição; f_u, fração de metformina não ligada às proteínas plasmáticas; F, biodisponibilidade. ^aDados referentes ao estudo conduzido por Choi *et al.*, 2006; ^bALX= animais diabéticos após 25 dias de indução por aloxano (40 mg/kg, i.v.), Choi *et al.*, 2008; ^cSTZ= animais diabéticos após 29 dias de indução por estreptozotocina (65 mg/kg, i.v.), Lee *et al.*, 2008.

Estudos quanto à distribuição tecidual da metformina são escassos na literatura. O primeiro estudo publicado, foi realizado em camundongos após a administração oral de metformina na dose de 150 mg/kg por BECKMANN (1969) e verificou que os tecidos de maior concentração total deste fármaco foram: rins, pâncreas, fígado e em menor quantidade, o músculo e o tecido adiposo, indicando ainda que as concentrações teciduais totais de metformina foram superiores à encontrada no soro de camundongos. Estudos mais atuais corroboraram essas observações e demonstraram maior distribuição tecidual da metformina quando analisado somente o homogenato do tecido hepático, demonstrando a elevada distribuição do fármaco nesse tecido quando comparado a concentração em plasma de roedores (SOGAME *et al.*, 2011; HIGGINS, BEDWELL & ZAMEK-GLISZCZYNSKI, 2012; MADIRAJU *et*

al., 2014).

1.5 Transportadores envolvidos no processo ADME da metformina

As características físico-químicas da metformina a definem como uma molécula polar (logP -0,82) e base forte (pKa de 11,5). Portanto, no pH sanguíneo o fármaco encontrando-se minimamente não ionizado (< 0,01%), formando espécies catiônicas (GRAHAM *et al.*, 2011). Desta forma, a metformina não consegue difundir passivamente as membranas celulares, necessitando de carreadores para ser transportada para o meio intracelular, bem como para ser excretada. Os transportadores de influxo descritos na literatura, que desempenham essa função são pertencentes à família OCT (transportadores de cátions orgânicos), já os transportadores de efluxo são as proteínas extrusoras de fármacos e toxinas (MATE-1 e MATE-2K) e o transportador de monoamina da membrana plasmática PMAT (PERNICOVA & KORBONITS, 2014; LIANG & GIACOMINI, 2017). A seguir, será descrita a expressão nos diferentes tecidos dos transportadores de influxo e efluxo envolvidos na farmacocinética da metformina.

Após a administração oral, 90% da fração da absorção da metformina ocorre via paracelular e os 10% restantes são absorvidos por transportadores como OCT-3 e PMAT, expressos na membrana apical dos enterócitos (SLITT *et al.*, 2002a; ZHOU, XIA & WANG, 2007; PROCTOR, BOURDET & THAKKER, 2008). Experimentos *in vitro* avaliando a atividade destes dois transportadores em uma ampla faixa de pH demonstram que em ambiente levemente ácido, como intestino delgado (pH = 6), a atividade de PMAT é superior à OCT-3, o que sugere que PMAT seja o transportador responsável pela absorção da metformina neste sítio (ZHOU, XIA & WANG, 2007). Já o tecido hepático, principal envolvido no mecanismo de ação da metformina, possui a expressão de OCT-1 na membrana basolateral dos hepatócitos. Esse transportador de influxo é responsável por aproximadamente 76% da captação hepática da metformina (SLITT *et al.*, 2002b; PERNICOVA & KORBONITS, 2014). Além disso, este tecido também expressa OCT-3 o qual possivelmente é responsável pela captação da fração restante do fármaco (HIGGINS *et al.*, 2012). Apesar de MATE-1 ser expressa no tecido hepático humano e em ratos (WANG *et al.*, 2015), a excreção de metformina na bile é negligenciável em ambas as espécies (GRAHAM *et al.*, 2011;

ZAMEK-GLISZCZYNSKI *et al.*, 2013) demonstrando que a metformina não é secretada na bile através de MATE-1, presente na membrana apical dos hepatócitos.

Após a administração da metformina, os tecidos periféricos são sensibilizados à insulina. Esses tecidos expressam OCT-3 como transportador de influxo da metformina, sendo o principal meio de captação do fármaco pelos músculos esqueléticos (OSHIMA *et al.*, 2015).

A eliminação renal da metformina se dá pela sua distribuição aos rins, através dos transportadores de influxo OCT-1 e OCT-2 em ratos, e OCT-2 em humanos, enquanto que os transportadores de efluxo responsáveis pela secreção tubular ativa de metformina são MATE-1 em ratos e MATE-1 e MATE-2K em humanos (PERNICOVA & KORBONITS, 2014).

Desta forma a expressão dos carreadores de metformina nos seus tecidos alvos demonstra o complexo envolvimento na absorção, distribuição e eliminação desse fármaco (GRAHAM *et al.*, 2011)

1.6 Mecanismo de ação da metformina

Como descrito anteriormente, a metformina é transportada da circulação sanguínea para o espaço intracelular dos tecidos de interesse através da família de transportadores OCTs ou ainda, após a administração pela via oral, 10% do fármaco absorvido é dependente do transportador de influxo PMAT, presente na membrana apical dos enterócitos (PROCTOR, BOURDET & THAKKER, 2008; GRAHAM *et al.*, 2011). Após alcançar o espaço intracelular do tecido alvo, devido a ionização em pH fisiológico, a metformina acumulará no interior da mitocôndria, a qual possui ambiente com carga negativa (PERNICOVA & KORBONITS, 2014; RENA, HARDIE & PEARSON, 2017).

O efeito de redução glicêmica da metformina é devido principalmente à inibição da gliconeogênese e da lipólise hepática, bem como a redução da função do hormônio glucagon. Em menor extensão, ocasiona a sensibilização do músculo esquelético à insulina, levando a captação da glicose neste tecido (PERNICOVA & KORBONITS, 2014). Também é relatado que este fármaco aumenta a secreção do peptídeo glucagon-símile (GLP-1) (PREISS *et al.*, 2017) além de retardar o processo de

absorção de glicose intestinal (PERNICOVA & KORBONITS, 2014).

A metformina possui como vantagem frente às outras classes de antidiabéticos, a manutenção do peso corporal do paciente ou mesmo a sua redução, além de possuir efeitos benéficos em relação às complicações macrovasculares (FORBES & COOPER, 2013).

Apesar de ter seu uso regulamentado há mais de 65 anos, o mecanismo de ação ainda não foi totalmente elucidado. Na última década os estudos relacionados ao mecanismo molecular foram intensificados, os quais estabelecem que a metformina age de forma dependente ou independente da proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK). A via pelo qual a metformina age dependerá da forma de administração, concentração intracelular e duração do tratamento, os quais serão discutidos abaixo (PERNICOVA & KORBONITS, 2014; AN & HE, 2016a; RENA, HARDIE & PEARSON, 2017).

Um dos fatores de risco para o desenvolvimento da DM II, como já relatado anteriormente é a obesidade. Essa comorbidade em roedores leva à alteração da microbiota intestinal, o que desencadeia um aumento dos níveis de um agente pró-inflamatório na circulação, o lipopolissacarídeo (LPS). O tratamento com metformina via oral modula a flora intestinal de roedores diabéticos e obesos reduzindo os níveis de LPS séricos. Nessa forma de administração é crucial o eixo sistema gastrointestinal – sistema nervoso central (GTI-SNC). O efeito inicia-se pela ativação de GLP-1 nos enterócitos, este neuropeptídeo irá ativar a proteína quinase A (PKA) e consequentemente AMPK localizada na mitocôndria das células intestinais. Após a ativação dessa última, a metformina possuirá ação hepática através do eixo GTI-SNC (AN & HE, 2016).

No tecido hepático, duas teorias são relatadas quanto a ação da metformina na mitocôndria: através da inibição do complexo I da cadeia de respiração celular, resultando em redução da energia celular e inibição da enzima glicerol-3 fosfato, sem alteração da energia celular (RENA, HARDIE & PEARSON, 2017).

A teoria mais estudada relata que em altas concentrações, a metformina inibe o complexo I da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, resultando na redução da produção de adenosina trifosfato (ATP) e aumento dos níveis de adenosina monofosfato (AMP). A ação do fármaco é obtida através de duas rotas: AMP irá ligar-

se ao sítio “P” da enzima adenilato ciclase, reduzindo a sinalização do glucagon e consequentemente a síntese de adenosina monofosfato cíclico (AMPc), sinalizador celular para gliconeogênese. Esta via é responsável pelo efeito anti-hiperglicemiante da metformina após administração por período prolongado ou ainda após o tratamento em dose única do fármaco. A segunda via de ação da metformina é a ativação de AMPK, o qual é responsável por fosforilar e aumentar a atividade dos receptores de insulina, resultando no deslocamento dos transportadores de glicose. Outro efeito desencadeado pela metformina via AMPK é a redução da síntese de ácidos graxos, os quais estão envolvidos na sensibilização à insulina. Devido a esta segunda via abranger transcrição gênica, ela só é observado no tratamento por um período superior a 14 dias (Figura 4) (PERNICOVA & KORBONITS, 2014; RENA, HARDIE & PEARSON, 2017).

Corroborando a hipótese de inibição da cadeia mitocondrial, um ensaio realizado com hepatócitos humanos descreveu que a concentração de metformina necessária para produzir 50% da inibição da cadeia respiratória mitocondrial (CI_{50}) deve ser de 58-155 mg/L, o que corresponderia a uma possível toxicidade deste fármaco, já que a concentração máxima ($C_{máx}$) de metformina no plasma de indivíduos saudáveis é de 1-2 mg/L e casos de sobredosagem correspondem a concentração sérica de 267 mg/L, 2h após a ingestão pela via oral (KAJBAF, DE BROE & LALAU, 2016).

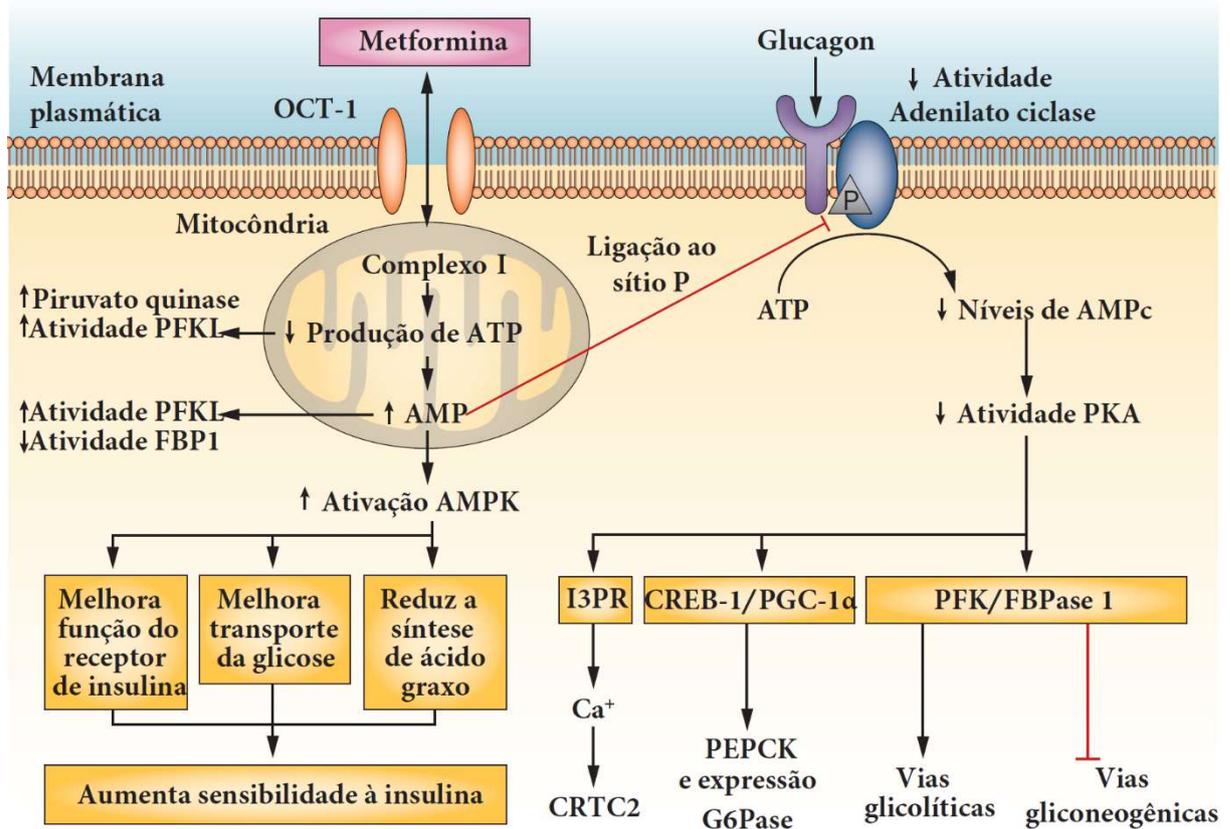


Figura 4. Modelo da ação da metformina no hepatócito. A metformina entra no espaço intracelular através dos transportadores como o OCT-1 e inibe o complexo I mitocondrial. A inibição do complexo I resulta na redução dos níveis de ATP e uma acumulação de AMP. O AMP liga-se ao sítio “P” da enzima adenilato ciclase e inibe a sua atividade, levando a diminuição da geração de AMPc sob estimulação do receptor de glucagon. Como resultado, a ativação de PKA e sua cascata de sinalização são inibidos. A gliconeogênese é suprimida como o resultado da atividade reduzida das enzimas envolvidas no fluxo da gliconeogênese (por exemplo, devido à ausência da fosforilação do fator de transcrição de CREB-1). A metformina induz mudança na carga energética, também ativa AMPK, o qual suprime o metabolismo lipídico e possivelmente também contribui para a redução da expressão gênica da gliconeogênese. Além disso, AMP e ATP tem um papel modulatório independente destas vias. Abreviações: AMPK, 5'-AMP-proteína quinase ativada; CREB-1, AMPc proteína de resposta a ligação elementar; CRTC2, CREB co-ativador 2 da regulação de transcrição; G6Pase, glicose-6-fosfatase; I3PR, Receptor inositol 1,4,5-trifosfato; PEPCK carboxiquinase fosfoenolpiruvato; PFK/FBPase 1,6-fosfofruto-2-quinase/frutose-2,6-bifosfatase 1; PGC-1 α , peroxissoma proliferador ativado receptor- γ coativador-1 α ; PKA, proteína quinase A; OCT-1, transportador orgânico de cátion-1 (Retirado de PERNIKOVA & KORBONITS, 2014).

Mais recentemente, estudos conduzidos por MADIRAJU e colaboradores (2014), demonstraram através de ensaios *in vivo* e *in vitro* que o mecanismo de ação da metformina não envolve a ativação de AMPK. Neste estudo, a metformina quando administrada na dose de 50 mg/kg em regime agudo (*i.v.*) ou crônico (administração

i.p. pelo período de 30 dias) em ratos, possui como alvo molecular a redução de atividade redox a nível mitocondrial e aumento do estado redox citosólico devido à inibição da enzima glicerol-3-fosfato-desidrogenase, impedindo o transporte de NADH do citoplasma para a mitocôndria. Esta modulação do estado redox resulta na redução da gliconeogênese sem modificar a carga energética celular após a administração aguda. Desta forma, o lactato e o glicerol, utilizados como precursores da gliconeogênese, encontram-se em excesso no interior na mitocôndria, este excesso será transportado ao plasma resultando no aumento de seus níveis plasmático (Figura 5).

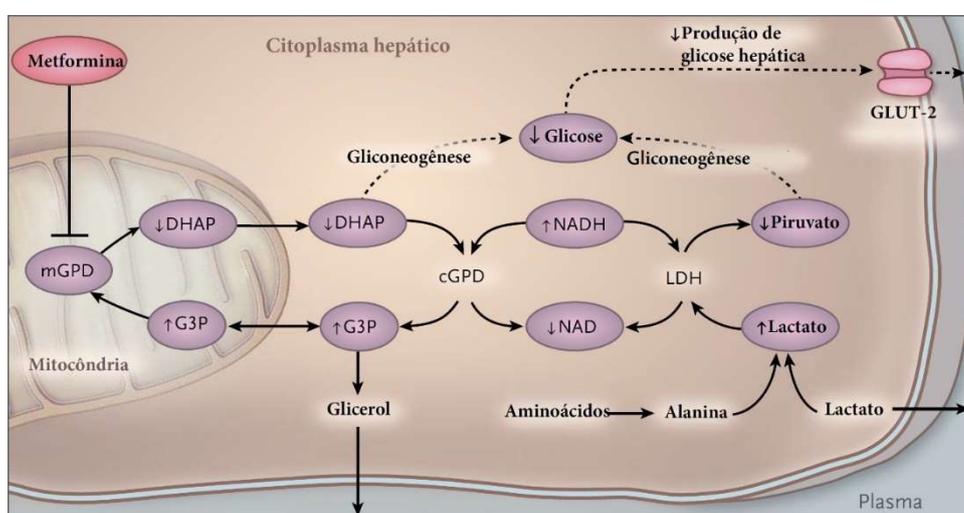


Figura 5. Modelo de supressão da gliconeogênese hepática ocasionado pela metformina. A metformina suprime a gliconeogênese através da inibição de uma isoforma de glicerol fosfato desidrogenase (mGPD) mitocôndria específica. Esta inibição reduz a velocidade da fosfato de di-hidroacetona (DHAP) – da cascata de sinalização de glicerol fosfato (glicerol fosfato é também chamado de glicerol-3-fosfato (G3P)) como resultado a razão de G3P:DHAP, NADH:NAD, e lactato:piruvato irá aumentar no citoplasma. A gliconeogênese irá reduzir e conseqüentemente, a secreção de glicose através dos hepatócitos. Portanto, níveis excedentes de glicerol e lactato são secretados no plasma. O termo cGPD refere-se a isoforma citoplasmática do glicerol fosfato desidrogenase e LDH lactato desidrogenase (Retirado de FERRANNINI (2014)).

Com relação ao efeito da captação de glicose pelo músculo esquelético, esse efeito é observado em regime de administração por período prolongado do fármaco. Onde AMPK irá aumentar a atividade de tirosina quinase do receptor de insulina, bem como da translocação de receptores de glicose (GLUT-4). A metformina ocasiona também um aumento na expressão de receptores de insulina, assim como um aumento nas enzimas envolvidas na sinalização deste hormônio (PERNICOVA &

KORBONITS, 2014).

A crítica acerca da hipótese de inibição do complexo I da cadeia respiratória, refere-se as altas concentrações necessárias para se observar o efeito, não correspondendo à concentração de metformina encontrada na clínica (AN & HE, 2016; RENA, HARDIE & PEARSON, 2017).

Em contrapartida, a crítica à teoria de inibição da enzima glicerol-3-fosfato é de que somente esta via de inibição não seria suficiente para explicar o efeito anti-hiperglicemiante, pois existem mecanismos compensatórios, como o *shuttle* aspartato/malato (RENA, HARDIE & PEARSON, 2017). Portanto, até o momento a questão do mecanismo molecular pelo qual a metformina exerce seu efeito não foi elucidado, este aspecto é importante visando novos alvos moleculares no desenvolvimento de fármacos antidiabéticos.

1.7 Microdiálise

Embora a metformina possua diversos relatos acerca das suas propriedades farmacocinética e farmacodinâmica, ainda não há um consenso acerca da sua concentração plasmática terapêutica, assim como não se conhece a diferença de distribuição tecidual em indivíduos diabéticos e saudáveis. Desta forma, são necessários estudos que avaliem a concentração de metformina nos tecidos envolvidos com o seu mecanismo de ação, como o fígado e músculo para que se estabeleça uma relação concentração-resposta deste fármaco (KAJBAF, DE BROE & LALAU, 2016).

Estudos a respeito da distribuição tecidual da metformina, são escassos na literatura. Há relatos da maior distribuição tecidual hepática de metformina em homogenato hepático de roedores (WILCOCK, WYRE & BAILEY, 1991; SOGAME *et al.*, 2011; HIGGINS, BEDWELL & ZAMEK-GLISZCZYNSKI, 2012). No entanto, esta técnica possui como desvantagem a quantificação do fármaco presente em diversos componentes do tecido, como os capilares sanguíneos que irrigam o órgão, o fluido intersticial e o espaço intracelular, o que pode gerar uma interpretação errônea dos resultados. Além disso, a quantificação do fármaco deste *mix* tecidual é relacionado a concentração total do fármaco (fração ligada as proteínas plasmáticas + fração livre).

No entanto é bem estabelecido que a fração do fármaco farmacologicamente ativa é somente a fração livre (MOUTON *et al.*, 2008). Outro ponto limitante desta técnica, não há como obter um perfil concentração tecidual por tempo completo de um mesmo animal, para atender esse objetivo seria necessário obter o homogenato de diferentes animais a cada tempo estipulado (MOUTON *et al.*, 2008).

A técnica de microdiálise possibilita obter a fração livre do fármaco, sem a necessidade de tratamento prévio das amostras para análise quantitativa, além de permitir a coleta de múltiplas amostras do mesmo animal, resultando no perfil completo de concentração tecidual do fármaco em função do tempo para cada animal utilizado no estudo (PLOCK & KLOFT, 2005; CHAURASIA *et al.*, 2007; AZEREDO, DALLA COSTA & DERENDORF, 2014).

Esta técnica consiste na inserção de uma sonda no tecido animal ou humano de interesse, mimetizando o vaso sanguíneo. A sonda de microdiálise é constantemente perfundida por uma solução fisiológica que mimetiza as características do fluido intersticial, geralmente representado pela solução Ringer ou tampão fosfato. Na extremidade desta sonda há uma membrana semipermeável com tamanho de poro que permite somente a passagem de moléculas de baixo peso molecular através do processo de difusão. Impossibilitando, portanto, a passagem de substâncias ligadas às proteínas plasmáticas e permitindo a coleta do fármaco livre na outra extremidade da sonda (PLOCK & KLOFT, 2005; CHAURASIA *et al.*, 2007; AZEREDO, DALLA COSTA & DERENDORF, 2014). Desta forma, é possível a quantificação de fármaco livre na biofase de interesse, sendo esta a fração de fármaco passível de desempenhar o efeito farmacológico.

Devido ao constante fluxo da solução fisiológica na sonda de microdiálise inserida no tecido de interesse, não há o estabelecimento de uma condição de equilíbrio, a qual é denominada de condição *sink*. Desta forma, as amostras de microdialisado tecidual coletadas não refletem diretamente a concentração do fármaco no tecido investigado, sendo necessário o estabelecimento das melhores condições para a realização do experimento através de métodos de calibração *in vitro* das sondas (LANGE, 2013; HAMMARLUND-UDENAES, 2017).

A determinação das taxas de recuperação relativa do fármaco *in vitro* visam verificar a influência de alguns fatores como: velocidade do fluxo de perfusão,

temperatura e a presença/ausência de interação físico-químicas do fármaco com o material de composição da sonda (LANGE, 2013). Para a determinação da recuperação relativa através da técnica de diálise (RD), a sonda de microdiálise é imersa em uma solução com fármaco de concentração conhecida, a qual é mantida a temperatura constante de 37°C. A sonda é constantemente perfundida pela solução fisiológica na sua extremidade de entrada. O dialisado coletado na extremidade de saída da sonda é utilizado para a determinação do “ganho” de fármaco em função do tempo (Figura 6), o qual é calculado através da Equação 1 (PLOCK & KLOFT, 2005).

$$RD(\%) = \left(\frac{C_{dial}}{C_{ext}} \right) \cdot 100$$

Eq. 1

Onde C_{dial} é a concentração presente na amostra de dialisado e C_{ext} é a solução na qual a sonda encontra-se imersa.

A recuperação relativa (RR) determinada através da técnica de retrodiálise, consiste na imersão da sonda de microdiálise na solução fisiológica, a qual é mantida a temperatura constante de 37°C. Na extremidade de entrada da sonda é constantemente perfundida a solução do fármaco em uma concentração conhecida. A amostra coletada na extremidade de saída da sonda reflete a “perda” do fármaco para solução fisiológica (Figura 6). A RR *in vitro* é calculada utilizando a Equação 2 (PLOCK; KLOFT, 2005; LANGE, 2013).

$$RR(\%) = \left(\frac{C_{perf} - C_{dial}}{C_{perf}} \right) \cdot 100$$

Eq. 2

Onde C_{perf} é a concentração de fármaco na solução de perfusão, C_{dial} é a concentração presente na amostra de dialisado

Determinadas a melhores condições de fluxo e estabelecida a influência da concentração e do efeito de ligação (se houver) do fármaco sobre as taxas de recuperação, a etapa seguinte da técnica consiste na determinação da recuperação relativa *in vivo* (RR *in vivo*). Esse parâmetro é dependente das características do tecido, não sendo possível a substituição do valor estabelecido no método *in vitro* para corrigir o valor das concentrações das amostras coletadas no experimento de microdiálise

(LANGE, 2013). Desta forma, a sonda de microdiálise é inserida no tecido de interesse, sendo constantemente perfundida por uma concentração conhecida do fármaco na extremidade de entrada da sonda. A amostra coletada na extremidade de saída reflete a “perda” de fármaco para o tecido, e pode ser calculada utilizando a Equação 2. O valor determinado pela $RR_{in vivo}$ é utilizado para corrigir os valores de concentração do fármaco efetivamente presentes nos tecidos, a partir dos dados quantificados nas amostras coletadas no experimento de microdiálise (PLOCK & KLOFT, 2005).

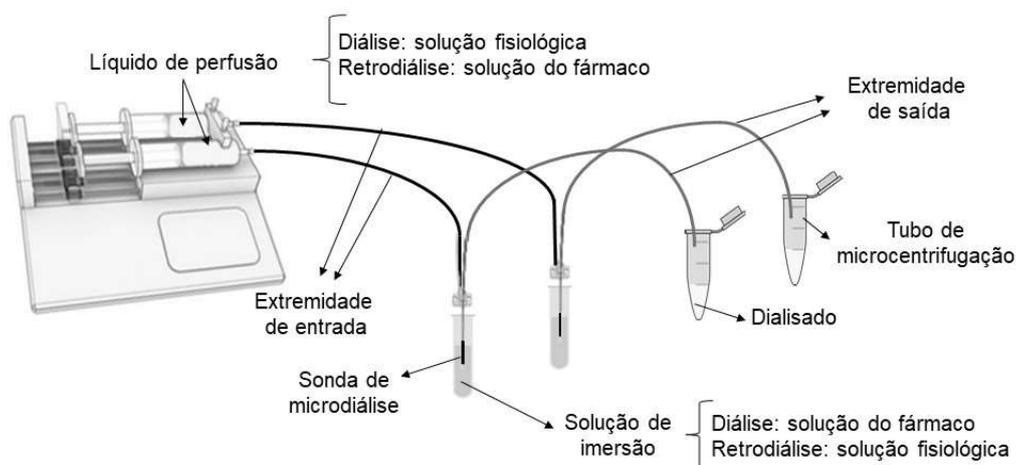


Figura 6. Esquema da calibração da sonda de microdiálise *in vitro* realizada pelos métodos de diálise e retrodiálise. O fluido de perfusão é infundido com uma velocidade constante pela extremidade de entrada, a sonda de microdiálise faz a troca de fluídos através do processo de difusão com a solução de imersão, o dialisado resultante é coletado da extremidade de saída pelo tubo de microcentrifugação para posterior análise quantitativa.

A microdiálise possui como vantagem a quantificação da concentração farmacologicamente ativa do fármaco no tecido de interesse, a qual pode diferir da concentração plasmática. Essa informação quando incorporada a modelos matemáticos auxilia na compreensão da relação entre exposição (PK) no tecido alvo e resposta (PD) (DERENDORF & MEIBOHM, 1999; MOULD & UPTON, 2012; HAMMARLUND-UDENAES, 2017).

1.8 Modelagem PBPK

Os modelos matemáticos auxiliam na compreensão da relação farmacocinética e farmacodinâmica de um fármaco, permitindo descrever os dados experimentais obtidos *in vivo* e/ou *in vitro* possibilitando a construção de modelos com coerência fisiológica e a partir deste cenário realizar previsão de situações não testadas (GAITONDE et al., 2016, MOULD & UPTON, 2012). Diversas abordagens são propostas na literatura para avaliações farmacocinéticas: empregando modelos farmacocinéticos clássicos, populacionais (PopPK) e mais recentemente baseados na fisiologia (PBPK) (DERENDORF & MEIBOHM, 1999; MOULD & UPTON, 2012).

Na abordagem compartimental clássica, o organismo é representado por compartimentos teóricos, onde os tecidos que apresentam concentrações homogêneas do fármaco compõem um compartimento, podendo possuir adicionalmente outros compartimentos interligados. Ainda que permita uma adequada simplificação da realidade, este modelo é considerado um modelo mais abstrato, pois, em geral, não representa o organismo de maneira fidedigna (MOULD & UPTON, 2012).

O modelo PopPK é uma ferramenta útil para descrever a variabilidade interindividual (idade, peso, presença de doença, entre outros) na resposta de um fármaco em uma determinada população estudada. Este modelo possui como vantagem o uso de dados esparsos, possibilitando a comparação dos parâmetros farmacocinéticos obtidos de um único indivíduo com de uma população que recebeu o mesmo tratamento (MOULD & UPTON, 2012).

No entanto, esses modelos representam o sistema de forma empírica, o que limita a extrapolação em populações que possuam condições fisiológicas diferente da estudada (JONES & ROWLAND-YEO, 2013).

A representação do organismo de uma forma mecanística é a abordagem adotada pelos modelos farmacocinéticos baseados na fisiologia (PBPK), apesar da estrutura do modelo compartimental ser semelhante as outras abordagens, os modelos PBPK são mais complexos à medida que consideram o organismo como um todo onde cada órgão é considerado um compartimento conectado pelo fluxo sanguíneo característico da espécie estudada. O sistema multicompartmental é descrito por uma série de equações diferenciais parametrizadas baseada nos dados

fisiológicos para a construção do modelo (JONES & ROWLAND-YEO, 2013; KUEPFER *et al.*, 2016).

Devido à alta complexidade na série de equações diferenciais e a necessidade de inserir dados experimentais fisiológicos, fez com que esta abordagem introduzida em 1937 tivesse o uso limitado pela indústria farmacêutica. A medida que softwares foram desenvolvidos incluindo as equações para descrição dos processos ADME e de dados fisiológicos de diversas espécies, além da implementação de métodos de extrapolação e predição de parâmetros, fez com que o interesse nesta abordagem crescesse na última década, levando à discussão de critérios a serem adotados na construção do modelo pelas agências regulatórias dos EUA (FDA) e Europa (EMA) (JONES & ROWLAND-YEO, 2013; JAMEI, 2016).

Um dos maiores avanços na abordagem PBPK refere-se aos métodos de predição *in silico* e extrapolação de dados experimentais obtidos *in vitro* para o cenário *in vivo* (IVIVE), reduzindo a quantidade de experimentos laborosos (KUEPFER *et al.*, 2016). Para processos farmacocinéticos passivos, como o cálculo da distribuição tecidual é possível realizar a predição *in silico* para os diferentes tecidos que compõem o modelo, utilizando equações baseadas em características dependentes do fármaco e da composição do tecido. Já para os processos como metabolismo e transporte ativo do fármaco, é possível realizar a IVIVE utilizando equações que levam em conta os dados experimentais *in vitro*, a composição do tecido e as características do fármaco ou ainda é possível realizar a extrapolação através do ajuste dos dados experimentais *in vitro* utilizando o perfil farmacocinético obtido *in vivo* (KUEPFER *et al.*, 2016).

A maior vantagem desta abordagem é a representação estrutural do organismo de uma forma fisiológica, possibilitando o conhecimento da concentração do fármaco no seu tecido alvo a partir do perfil de concentração no plasma, permitindo a extrapolação entre espécies de forma mais fidedigna (JONES & ROWLAND-YEO, 2013; KUEPFER *et al.*, 2016).

Os modelos PBPK tem aplicação ao longo de todo processo de desenvolvimento de fármacos, inclusive na extrapolação do modelo desenvolvido no cenário pré-clínico para previsão de dose a ser testada na primeira fase do ensaio clínico. Agências regulatórias como o FDA e EMA sugerem o uso dessa abordagem para o estudo de interação entre fármacos e comportamento farmacocinético de fármacos em

populações especiais (pediátrica, idosa e portadores de doenças crônicas). Outras aplicações são: estudo de novas formulações, farmacogenética e avaliação da concentração de fármaco no tecido alvo e seu efeito (PBPK/PD) (JONES & ROWLAND-YEO, 2013; JAMEI, 2016; KUEPFER *et al.*, 2016).

Os modelos fisiológicos são estruturados em três categorias: parâmetros fisiológicos, características do fármaco e delineamento experimental/características da forma farmacêutica (JONES & ROWLAND-YEO, 2013; KUEPFER *et al.*, 2016). O componente fisiológico corresponde as características específicas para a espécie utilizada na construção do modelo: peso, sexo, idade. Estas informações serão utilizadas para compor as informações dos tecidos tais como o peso, volume, fluxo sanguíneo, número de células. O modelo PBPK pode ser construído utilizando os principais tecidos (fígado, rins, pulmão, coração, cérebro, tecido adiposo, baço, pele, órgão reprodutor e intestino) constituindo um modelo completo, o qual é considerado mais informativo (Figura 7). No entanto, dependendo do propósito do modelo, o organismo pode ser simplificado através da representação de órgãos com fluxo sanguíneo semelhante agrupados em um único tecido de modo a reduzir os parâmetros simulados (KUEPFER *et al.*, 2016).

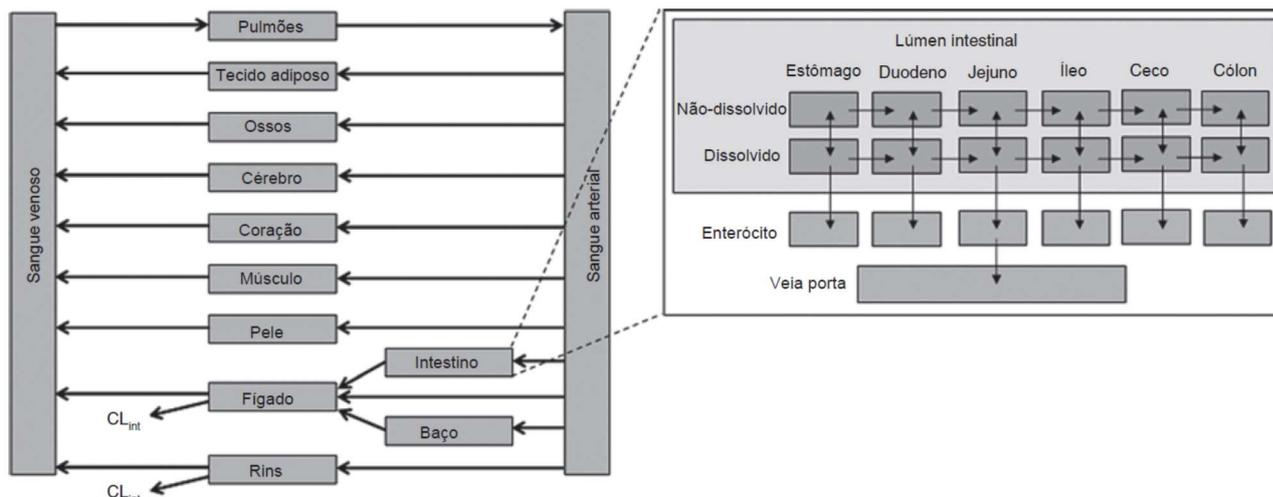


Figura 7. Esquema do modelo PBPK completo, com representação detalhada do compartimento intestinal. CL_{int} (*clearance* intrínseco); PBPK (modelo farmacocinético baseado na fisiologia) (Retirado de JONES & ROWLAND-YEO, (2013)).

Os parâmetros governados pelas características do fármaco como peso molecular, pKa, Log P e solubilidade são dependentes dessas propriedades físico-químicas, já os parâmetros como ligação a proteínas plasmática, ligação aos eritrócitos, permeabilidade, coeficiente de partição tecido/plasma e afinidade por enzimas e transportadores, apesar de serem característicos do fármaco, também são relacionados com o componente fisiológico do modelo (KUEPFER *et al.*, 2016).

O desenho experimental e propriedades da formulação irão integrar o modelo através de informações como a via de administração e dose utilizada no estudo, estado alimentar do indivíduo (jejum ou alimentado), forma farmacêutica utilizada bem como as características da formulação. Softwares específicos para o desenvolvimento de modelos PBPK como SimCyp, GastroPlus e PK-Sim possuem os componentes descritos incorporados. De forma a caracterizar os processos de distribuição e eliminação do fármaco, recomenda-se em um primeiro momento a construção do modelo PBPK utilizando a via intravenosa, após o estabelecimento desses processos farmacocinéticos relevantes, realiza-se a caracterização da absorção do fármaco, a qual é uma etapa mais complexa (KUEPFER *et al.*, 2016).

Considerando que a maioria dos medicamentos antidiabéticos utilizados para o tratamento da DM II são administrados pela via oral, a descrição do sistema gastrointestinal mais próximo da realidade é implementado pelo GastroPlus™ através do modelo de absorção e compartimento de trânsito avançado (ACAT). Esse modelo divide o trânsito gastrointestinal em nove compartimentos (estômago, duodeno, jejuno

1, jejuno 2, íleo 1, íleo 2, íleo 3, ceco e cólon ascendente) com descrição de pH, tempo de trânsito e área superficial específica para cada compartimento, levando em conta a condição alimentar (jejum ou alimentado) da espécie em estudo. As equações diferenciais incluem a quantidade de fármaco não degradado, dissolvido e não-dissolvido para cada compartimento (Figura 8). Integrado ao componente físico-químico, a absorção do fármaco dissolvido no lúmen intestinal é descrita por equações específicas ao processo (paracelular, transcelular), disponíveis no software (AGORAM, WOLTOSZ & BOLGER, 2001).

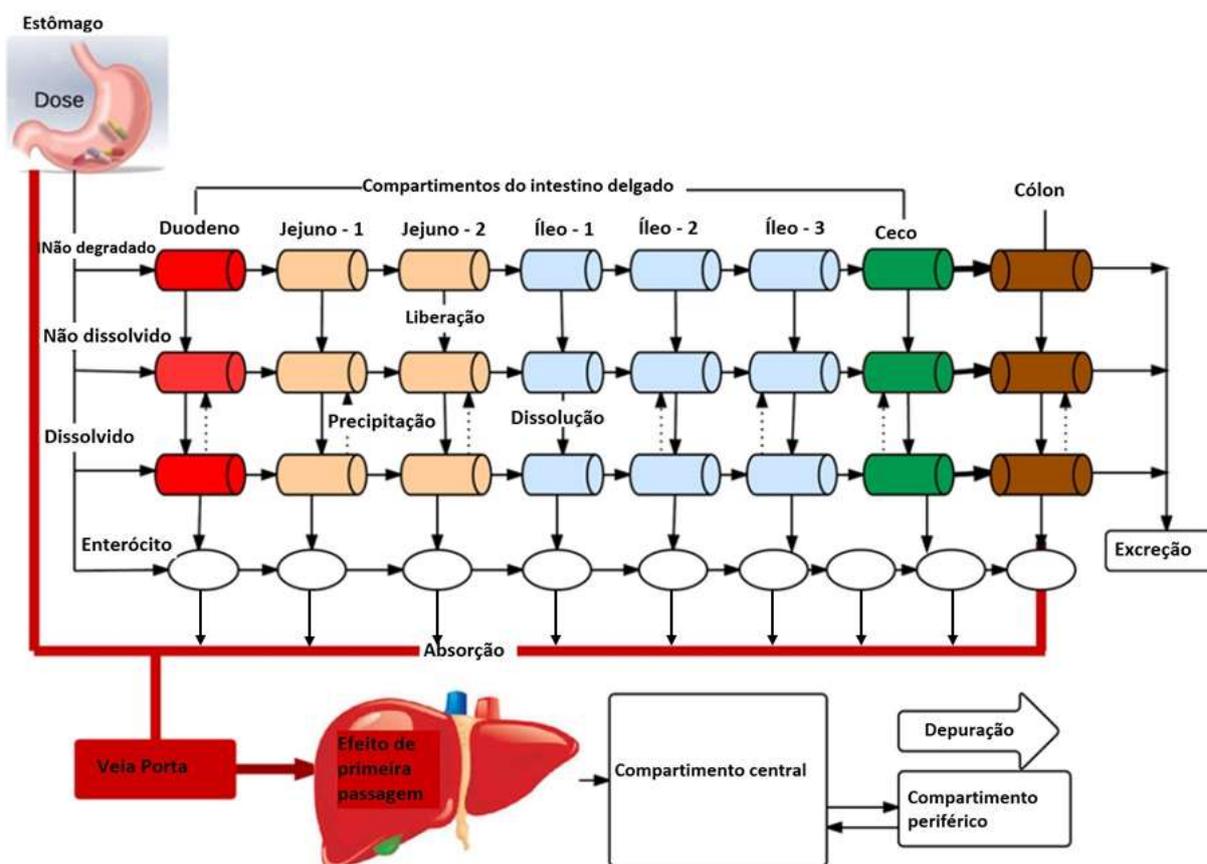


Figura 8. Modelo de absorção e compartimento de trânsito avançado (ACAT) implementado no software Gastroplus™ (Adaptado de ALMUKAINZI *et al.* (2017)).

A estrutura do modelo PBPK auxilia na compreensão do comportamento farmacocinético do fármaco, com um significado mais próximo da realidade quando comparado as abordagens farmacocinéticas clássica e populacional.

Há na literatura alguns estudos que descrevem modelos PBPK desenvolvidos para a metformina com diversos propósitos. ALMUKAINZI e colaboradores (2014) desenvolveram um modelo PBPK da metformina para caracterizar a absorção da

metformina em pacientes que submeteram-se a cirurgia bariátrica, este modelo considera a presença de transportadores de influxo hepático (OCT-1), renal (OCT-2) e intestinal (PMAT), além dos transportadores de efluxo hepático (MATE-1) e responsáveis pela secreção tubular renal da metformina (MATE-1 e MATE-2K). O modelo ACAT foi ajustado para que após a cirurgia a área superficial e os poros do íleo correspondesse a intervenção cirúrgica nestes pacientes, sendo possível caracterizar razoavelmente a absorção da metformina nessa população (ALMUKAINZI, LUKACOVA & LÖBENBERG, 2014).

O mesmo grupo de pesquisa investigou o efeito adverso mais severo observado para a metformina em pacientes DM II, a acidose láctica, o qual é relacionado a piora da função renal dos pacientes. Utilizando as informações adquiridas no estudo anterior em relação aos transportadores envolvidos na farmacocinética da metformina (ALMUKAINZI, LUKACOVA & LÖBENBERG, 2014), os autores caracterizaram a absorção oral da metformina em indivíduos saudáveis e com a função renal comprometida após a administração oral de metformina na dose de 850 mg (ALMUKAINZI *et al.*, 2017).

Um modelo PBPK desenvolvido para caracterizar sete medicamentos antidiabéticos frente às mudanças fisiológicas da doença em pacientes DM II foi desenvolvido por LI e colaboradores (2015). O modelo desenvolvido foi capaz de simular o comportamento farmacocinético de fármacos antidiabéticos em indivíduos saudáveis, com função renal comprometida e pacientes DM II. Os perfis simulados para administração oral de metformina nas doses de 850 e 1700 mg foram semelhantes aos dados clínicos disponíveis na literatura para pacientes nas mesmas condições das simulações. A simulação virtual utilizando Monte Carlo para este fármaco foi capaz de simular o perfil farmacocinético na dose de 850 mg para indivíduos virtuais saudáveis e com a função renal comprometida, demonstrando a aplicabilidade do modelo PBPK desenvolvido, o qual incluía alterações características da diabetes como atividade enzimática, tempo de esvaziamento gástrico e função renal bem como as características físico químicas do fármaco incorporados ao modelo (LI *et al.*, 2015).

Recentemente, em estudo da interação medicamentosa entre a metformina e cimetidina, BURT e colaboradores (2016) desenvolveram um modelo PBPK com o

ênfoque nos transportadores de influxo hepático (OCT1) e renal (OCT2), e transportadores de êfluxo renais (MATE 1 e MATE2), os quais tem como substrato a metformina e inibidor a cimetidina. Foram incorporados ao modelo dados de permeabilidade hepática limitada e a força eletroquímica envolvida no funcionamento dos transportadores OCT1 e OCT2, utilizando informações disponíveis na literatura tanto em experimentos *in vitro* quanto *in vivo*. O modelo PBPK foi capaz de prever adequadamente as concentrações de metformina após administração oral na faixa de doses 500 – 1500 mg a indivíduos saudáveis. No entanto, não foi possível descrever adequadamente o processo de permeabilidade limitada, relacionado à interação entre os fármacos cimetidina e metformina, importante questão a ser levantada em virtude da interação medicamentosa. Os autores destacam a relevância de dados farmacodinâmicos para ser incorporada ao modelo, o que possibilitaria uma melhor compreensão deste processo (BURT *et al.*, 2016).

1.9 Modelagem PK/PD

Em relação ao estudo da farmacodinâmica de fármacos antidiabéticos, a escolha de biomarcadores é uma etapa crucial para a correta avaliação de seu efeito. O critério deve ser baseado na relação fisiológica com a patologia investigada, o mecanismo de ação do fármaco, o propósito e a duração do estudo, para que possam obter uma capacidade preditiva adequada quando integrado ao modelo farmacocinético (GAITONDE *et al.*, 2016;GARHYAN *et al.*, 2016).

Da mesma forma que a observada em humanos, a manutenção da homeostase da glicose em roedores é determinada pelo equilíbrio fisiológico entre a insulina e glicose circulantes. Para a melhor compreensão desta regulação, deve-se fornecer o maior número de informações experimentalmente possíveis, tais como: a quantificação da insulina secretada pelas células β -pancreáticas em resposta a glicose circulante e a sensibilidade dos tecidos à insulina, quando estes são dependentes desse hormônio para a captação de glicose. Outra avaliação importante é a tolerância à glicose, o qual reflete a combinação da funcionalidade das células β -pancreáticas em resposta à exposição a glicose circulante e a sensibilidade à insulina nos tecidos alvos deste hormônio (BOWE *et al.*, 2014).

Quando a investigação possui curta duração, como em geral acontece para estudos pré-clínicos, alguns testes utilizados para avaliar a homeostase da glicose são: *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico, teste tolerância à insulina intravenosa e teste tolerância à glicose. Os biomarcadores aferidos neste teste são a glicose sanguínea e a insulina, refletindo a resposta do tratamento ao metabolismo da glicose (KOWALSKI & BRUCE, 2014; GARHYAN *et al.*, 2016).

O teste da tolerância à glicose é um teste simples, muito utilizado na investigação de fármacos antidiabéticos em roedores, o qual avalia a resposta fisiológica do tratamento à homeostase da glicose. Embora o protocolo para a realização deste teste seja divergente na literatura quanto à dose e via de administração, esta avaliação basicamente consiste na coleta de soro no estado de jejum para a determinação dos níveis basais de glicemia e insulinemia seguido da administração de glicose pela via oral ou intraperitoneal. Após a carga glicêmica, as coletas são realizadas em tempos pré-determinados possibilitando descrever a mudança glicêmica em função do tempo. O resultado deste teste pode ser representado como a mudança glicêmica absoluta em função do tempo ou através da área sobre a curva da mudança glicêmica (BOWE *et al.*, 2014).

As duas principais vias descritas para a realização deste teste são a oral e a intraperitoneal. Apesar de apresentar um menor pico glicêmico quando comparada à via intraperitoneal, a sobrecarga de glicose oral reduz a possibilidade da administração errônea, além de gerar uma resposta fisiológica mais fidedigna à homeostase da glicose conforme ocorre após a ingestão alimentar (BOWE *et al.*, 2014; KOWALSKI & BRUCE, 2014).

O efeito da glicose quando administrado pela via oral, resulta em um estado hiperglicêmico e hiperinsulinêmico na veia porta, o que desencadeia um forte estímulo para a captação de glicose hepática e consequente armazenamento na forma de glicogênio. Além disso, esta via é descrita por duplicar o estímulo secretório à insulina quando comparado com outras vias de administração, devido ao fato da glicose estimular a secreção de incretinas como o GLP1, pelas células L-intestinais. Estes neuropeptídeos são responsáveis, dentre outras funções, pelo estímulo à secreção de insulina através da ação nas células β -pancreáticas e consequentemente, redução glicêmica. Este estado hiperglicêmico e hiperinsulinêmico ocasionado pela sobrecarga

de glicose via oral, ocasionam um estímulo a captação de glicose pelos tecidos, a supressão da produção endógena de glicose bem como estimula os tecidos periféricos (músculo, coração e tecido adiposo) a captarem a glicose circulante (BOWE *et al.*, 2014; KOWALSKI & BRUCE, 2014).

Para exercer o efeito farmacológico, os fármacos antidiabéticos precisam difundir do compartimento central para o tecido periférico, onde a fração livre do fármaco exercerá a redução dos níveis glicêmicos observados (LANDERSDORFER & JUSKO, 2008; GAITONDE *et al.*, 2016).

O modelo de resposta indireta classe I e classe IV descrito por DAYNEKA, GARG & JUSKO, (1993) pode ser utilizado para caracterizar o efeito antihiper-glicemiante da metformina, o qual é governado pela produção e degradação da glicose sanguínea. No modelo de classe I (Eq. 3) o efeito caracteriza-se pela inibição máxima ($I_{m\acute{a}x}$) da produção de glicose (K_{in}), e o modelo classe IV (Eq. 4) o efeito caracteriza-se pela estimulação máxima ($E_{m\acute{a}x}$) da degradação de glicose (K_{out}), processo que caracteriza a disposição deste componente endógeno.

$$\frac{dR}{dt} = K_{in} \left(1 - \frac{C_p}{CE_{50} + C_p} \right) - K_{out} \cdot R$$

Eq. 3

$$\frac{dR}{dt} = K_{in} - K_{out} \left(1 + \frac{E_{m\acute{a}x} \cdot C_p}{CE_{50} + C_p} \right) \cdot R$$

Eq. 4

Onde K_{in} representa a constante de produção de glicose, CE_{50} representa a concentração máxima para produzir 50% do efeito máximo, C_p é a concentração plasmática, K_{out} é a constante de degradação de glicose, $E_{m\acute{a}x}$ é o efeito máximo e R representa a resposta (DAYNEKA, GARG & JUSKO, 1993; MEIBOHM & DERENDORF, 1997).

Desta forma, o modelo farmacodinâmico de resposta indireta pode ser integrado aos modelos de farmacocinética clássica, populacional (PopPK) ou baseados na fisiologia (PBPK), possibilitando a compreensão da relação concentração-efeito do fármaco de modo que pode ser utilizada para a otimização da farmacoterapia (MOULD & UPTON, 2012).

Os modelos PK/PD descritos na literatura para a metformina são de resposta indireta com inibição da produção de glicose hepática em indivíduos saudáveis (SHIN & KWON, 2004) e pacientes DM II (HONG *et al.*, 2008), assim como em ratos diabéticos o efeito da metformina pode ser caracterizada pela resposta indireta com inibição máxima da produção de glicose hepática ou estimulação máxima da disposição da glicose (STEPENSKY *et al.*, 2002) ou ainda um modelo de transdução de sinal (CHAE *et al.*, 2012). Os quais serão discutidos a seguir.

Em um estudo de modelagem PK/PD após a administração oral de cloridrato de metformina 500 mg em indivíduos saudáveis, o perfil farmacocinético pode ser descrito como um modelo de dois compartimentos. Adicionalmente foi avaliado o percentual de redução da glicemia em função do tempo após a administração oral de 12 g de glicose, o modelo PK/PD foi descrito através da resposta indireta com inibição da concentração da glicose (Eq. 3), este modelo pode ser explicado pela ação da metformina ocorrer nos tecidos hepático e periférico. Os parâmetros determinados neste estudo foram: $CI_{50} = 2,26 \mu\text{g/mL}$, $K_{in} = 83,26 \text{ h}^{-1}$ e $K_{out} = 0,68 \text{ h}^{-1}$ (SHIN & KWON, 2004).

Abordando os efeitos farmacológico e adverso da metformina administrada pela via oral (500 e 850 mg) pelo período de 10 dias em pacientes DM II, HONG e colaboradores (2008) desenvolveram um modelo PopPK/PD integrando os dados de farmacocinética com os dados de resposta da metformina à redução da glicemia em jejum e ao efeito adverso de acidose láctica. O perfil farmacocinético foi descrito por um modelo de um compartimento, onde a variabilidade interindividual do parâmetro CL pode ser explicada através da covariável CL_{cr} , enquanto que os dados de redução da glicemia em jejum caracterizaram-se pelo modelo de resposta indireta (Eq. 3), demonstrando um CI_{50} de $4,23 \mu\text{g/mL}$ e K_{out} de 0.8 h^{-1} para a glicose sanguínea (HONG *et al.*, 2008).

Recentemente em um estudo utilizando a modelagem PopPK/PD para a administração única de metformina (500 mg) em indivíduos saudáveis, o perfil farmacocinético pode ser descrito pelo modelo de um compartimento. O efeito anti-hiperglicemiante da metformina avaliado após a ingestão de 12 g de glicose, pode ser descrito através de um modelo de transdução de sinal, o qual leva em conta a interação fármaco-receptor e cascata de sinalização intracelular culminando na

redução glicêmica:

$$FR = \left(\frac{E_{m\acute{a}x} \cdot C_p^r}{CE_{50}^r - C_p^r} \right) \quad (\text{Eq. 5})$$

$$\frac{dM1}{dt} = \left(\frac{FR - M1}{\tau} \right) \quad (\text{Eq.5a})$$

$$\frac{dM2}{dt} = \left(\frac{M1 - M2}{\tau} \right) \quad (\text{Eq.5b})$$

$$\frac{dM}{dt} = \left(\frac{M2 - M3}{\tau} \right) \quad (\text{Eq.5c})$$

Onde FR é interação hipotética entre o complexo fármaco/receptor o qual gera M1, um mensageiro secundário, $E_{m\acute{a}x}$ é a produção máxima de M1 e CE_{50} representa a concentração de fármaco necessária para produzir 50% de $E_{m\acute{a}x}$, r é o coeficiente de Hill e τ representa o tempo de trânsito médio. Esta equação representa a cascata de sinalização onde M1 transforma-se no mensageiro secundário M2 o qual é transformado em M3, responsável pelo efeito da metformina. O modelo PK/PD estimou parâmetro EC_{50} de 3,68 $\mu\text{g/mL}$. Assim como no estudo anterior, os autores conseguiram explicar a variabilidade interindividual através da normalização do CL_{cr} . Através de simulações de Monte Carlo, este modelo foi capaz de prever a glicemia em jejum em pacientes DM II (CHAE *et al.*, 2012).

Estes dois últimos estudos, utilizaram a abordagem populacional para descrever a exposição/resposta da metformina, tanto em indivíduos saudáveis quanto em DM II, a variabilidade interindividual do parâmetro CL, foi em parte explicada pelo CL_{cr} . Como descrito anteriormente, a metformina é eliminada principalmente pela via renal, desta forma, quanto menor o CL_{cr} , menor a função renal e conseqüentemente maior a exposição do fármaco no organismo.

A literatura é escassa com relação a estudos que avaliem a modelagem PK/PD

da metformina no cenário pré-clínico, somente um estudo é reportado em ratos diabéticos. A metformina foi descrita em um estudo de exposição/ resposta da metformina, onde avaliou-se a contribuição de diferentes vias de administração em ratos diabéticos induzidos por STZ, após a administração de doses que produziram a mesma exposição em três diferentes vias: intravenosa, intraportal e intraduodenal. O efeito pode ser descrito por um modelo de resposta indireta com inibição da produção de glicose hepática (Eq. 3) quando correlacionada a quantidade de metformina presente na veia porta. Já para a quantidade de fármaco presente no compartimento central e no duodeno a disposição da glicose pode ser descrita através da resposta indireta com estimulação da degradação da resposta (Eq. 4). A via de administração que apresentou maior contribuição para o efeito anti-hiperglicemiante foi a administração na via intraduodenal seguido da via intraportal e, por fim, a menos efetiva foi a via intravenosa. Este resultado deve-se a presença de transportadores nos tecidos envolvidos com o seu efeito anti-hiperglicemiante. No entanto, este estudo adota uma abordagem diferente ao comumente relatado na literatura, de forma a reduzir os parâmetros a serem estimados, os autores correlacionaram o efeito anti-hiperglicemiante da metformina com a quantidade de fármaco presente nos tecidos investigados ao invés da concentração (STEPENSKY *et al.*, 2002).

Apesar da metformina ser extensamente estudada, até o momento ainda permanecem questões em aberto quanto a sua concentração no sítio de ação, bem como a relação com o efeito anti-hiperglicemiante. Desta forma, este trabalho objetiva o desenvolvimento de um modelo PBPK/PD da metformina em ratos diabéticos possibilitando uma melhor compreensão desta relação.

CAPÍTULO 1 – Free interstitial levels of metformin in the liver of healthy and diabetic Wistar rats

Free interstitial levels of metformin in the liver of healthy and diabetic Wistar rats

Andressa Braga¹; Jaqueline Schneider Izolan ¹; Teresa Cristina Dalla Costa¹;
Bibiana Verlindo de Araújo^{1*}

¹Pharmaceutical Sciences Graduate Program, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

ABSTRACT

In the present study, free interstitial levels reached by metformin in the liver were investigated in control and diabetic rats by microdialysis. Firstly, a bioanalytical method using an HPLC-UV system to determine the drug concentration in microdialysis samples was validated. The blood glucose levels and biochemical parameters were investigated in control and diabetic animals. Following, both groups received a dose of 50 mg/kg of metformin iv *bolus* and the free interstitial levels reached in the liver were assessed by microdialysis. The method was validated according to FDA guidelines being suitable to quantify free concentrations of metformin in the liver of control and diabetics rats. Free exposure to metformin was similar in control and diabetic animals: $AUC_{0-\infty}$ 118.50 ± 40.18 vs 112.93 ± 50.25 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$, respectively. The half-life in tissue was similar to that described in the literature for plasma. Hence diabetes induced by streptozotocin after administration of nicotinamide in our study did not damage the renal and hepatic function of the animals. The levels reached in the liver were 1.6 times higher than the free plasma concentrations, demonstrating higher liver penetration of metformin. This is the first investigation in liver interstitial levels of metformin in control and diabetic rats.

O **capítulo 1**, que no texto integral da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as **páginas 68 – 83**, foi suprimido por tratar-se de manuscrito publicado em periódico científico. O artigo reporta o modelo experimental de diabetes em ratos Wistar, o desenvolvimento de método bioanalítico para a quantificação de metformina em microdialisado em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina e

nicotinamida, bem como a análise farmacocinética da fração livre de metformina nas biofases de ação do fármaco: fígado e músculo.

**CAPÍTULO 2 - Prediction of human metformin hepatic target site concentrations
using a physiologically-based animal to human scaling approach**

Prediction of Human Metformin Hepatic Target Site Concentrations Using a Physiologically-Based Animal to Human Scaling Approach

Braga, A.¹; Nakatani, Y.^{2,3}; Barreto, F.⁴; Izolan, J.S.¹; Dalla Costa, T.C.¹; Schmidt, S.³; Araujo, B.V.^{1*}

¹Pharmaceutical Sciences Graduate Program, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

²Tsukuba Research Laboratories, Eisai Co, Ltd, Japan

³Center for Pharmacometrics and Systems Pharmacology, Department of Pharmaceutics, College of Pharmacy, University of Florida at Lake Nona (Orlando)

⁴Laboratório Nacional Agropecuário do Rio Grande do Sul (LANAGRO/RS), Porto Alegre, RS, Brazil

ABSTRACT

In this study, we developed a physiologically-based pharmacokinetic (PBPK) model for metformin in control and diabetic rats without kidney injury. The model was developed using experimental data from total plasma drug concentration and free drug concentration in liver and muscle assessed by microdialysis. The experiments showed a high free, unbound interstitial space fluid (ISF) concentration of metformin in liver and muscle (tissue partition coefficient of ~2.4) when compared to free plasma concentration with no impact of diabetes on drug pharmacokinetics parameters. The PBPK model developed in rats was applied to predict metformin free tissue concentrations in humans after metformin administration by intravenous route using drug concentration in plasma. The model was then extended to characterize drug absorption in healthy subjects. The metformin PBPK model could describe the drug profile after oral administration in healthy humans which increased our confidence in being able to predict interstitial concentration in clinically relevant target sites liver and muscle. This study is a first step to better understanding the correlation between metformin plasma concentration and free drug concentration in the target tissue. In addition, the animal to human model scaling approach will be helpful to explore drug's efficacy and safety in several clinical scenarios and inform optimal dosing.

O **capítulo 2**, que no texto integral da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as **páginas 88– 111**, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para submissão em periódico científico. Descreve o desenvolvimento de um modelo farmacocinético baseado na fisiológico da metformina após a

administração intravenosa em ratos saudáveis e diabéticos, o modelo foi capaz de descrever as concentrações do fármaco no fluido intersticial dos tecidos alvos: fígado e músculo em ratos diabéticos, após realizou-se a translação do modelo para humanos com dados provenientes da literatura, descrevendo as concentrações do antidiabético após a administração pelas vias intravenosa e oral

**CAPÍTULO 3 - Modelo PBPK/PD da metformina: uma abordagem translacional
de roedores para humanos**

O **capítulo 3**, que no texto integral da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as **páginas 115– 132**, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para submissão em periódico científico.

O capítulo descreve a avaliação do efeito antihiperlicemiante da metformina utilizando o teste de tolerância oral à glicose em ratos diabéticos que receberam a administração de metformina em três doses pela via intravenosa. Utilizando o modelo PBPK da metformina desenvolvido foi possível correlacionar o seu efeito farmacodinâmico através de um modelo de resposta indireta em ratos, o modelo foi capaz de ser extrapolado para indivíduos saudáveis utilizando dados reportados na literatura. Através do modelo PBPK/PD desenvolvido foi possível correlacionar as concentrações de metformina no sítio de ação farmacológica para as duas espécies, Esse modelo permitiu ainda que se observasse que em indivíduos saudáveis quando utilizada a concentração livre de metformina no fluido intersticial hepático, o parâmetro indicativo de potência do fármaco (IC_{50}) apresenta 33% de redução quando comparado as concentrações plasmáticas.

Apesar de ter seu uso regulamentado há mais de 65 anos, algumas características farmacocinéticas/farmacodinâmicas da metformina como a sua distribuição no tecido alvo (fígado) em pacientes diabéticos e o mecanismo de ação ainda não foram totalmente esclarecidos. Tendo em vista o aumento alarmante do número de casos de DM II, a melhor compreensão desses fatores farmacológicos pode auxiliar na terapia dos pacientes. Desta forma, esta tese se propôs a compreender a relação entre a concentração livre de metformina no seu tecido alvo (fígado) e seu efeito anti-hiperglicemiante em ratos diabéticos através de um modelo farmacocinético/farmacodinâmico baseado na fisiologia (PBPK/PD).

A prescrição da metformina é realizada a pacientes que não possuam dano renal, devido ao risco do efeito adverso de acidose láctica. Para reproduzir este cenário, utilizamos um modelo experimental de diabetes *mellitus* (DM) descrito na literatura (Masiello *et al.*, 1998) o qual resulta em ratos com dano moderado às células β -pancreáticas e ausência de injúria hepática e renal. O protocolo foi adequado as condições do laboratório em ratos Wistar e confirmou a ausência de danos teciduais. Para avaliar as concentrações de metformina no plasma e tecidos de animais diabéticos foi necessário, a validação de métodos bioanalíticos capazes de quantificar o fármaco até 12 h em ambas as matrizes de acordo com as diretrizes internacionais. A quantificação de metformina nas amostras de microdialisado obtidas do tecido hepático e muscular foram analisadas, sem a necessidade de tratamento prévio, por CLAE com detecção UV (capítulo 1). Para a quantificação do fármaco em plasma, as amostras foram processadas por precipitação de proteínas e diluídas em pareador iônico para posterior quantificação em CLAE acoplado ao detector massas/massas (capítulo 2). Ambos os métodos bioanalíticos foram sensíveis para a quantificação de metformina até 12 h em amostras de plasma e microdialisados teciduais, sendo possível caracterizar os perfis farmacocinéticos da metformina em animais diabéticos e controle.

A avaliação da distribuição tecidual da fração livre de metformina demonstrou que as concentrações de fármaco no fígado e músculo foram semelhantes para ambos os grupos. Esses resultados demonstram que a quantificação de fármaco em um tecido de fácil acesso (músculo) é capaz de prever a concentração no tecido alvo (fígado) tanto em animais controle quanto em animais diabéticos. Os estudos da farmacocinética de fármacos no cenário clínico utilizam concentrações do fármaco

presentes no plasma. Desta forma, avaliamos a correlação entre as concentrações de metformina no plasma e tecidos (fígado e músculo) de animais diabéticos e controle utilizando um modelo PBPK. A análise farmacocinética não-compartimental da metformina demonstrou que ambos os grupos (controle e diabético) não apresentaram diferença nos parâmetros farmacocinéticos tanto no plasma quanto nos tecidos. Estes resultados podem ser explicados devido ao modelo experimental de DM utilizado não apresentar dano renal nos animais, visto que a eliminação da metformina ocorre por esta via. Contudo, observou-se para ambos os grupos uma elevada exposição do fármaco nos tecidos quando comparado as concentrações no plasma. A metformina pertence à classe III do Sistema de Classificação Biofarmacêutica, portanto, é um fármaco de alta solubilidade e baixa permeabilidade à membranas biológicas. Uma hipótese para a maior exposição de fármaco livre no fluido intersticial dos tecidos em comparação ao plasma é a expressão do transportador de influxo OCT-3 no endotélio do capilar sanguíneo (SLITT *et al.*, 2002), que carregaria a metformina da circulação sanguínea para o fluido intersticial. A análise da concentração nesse espaço demonstra, portanto, a quantidade de fármaco disponível a ser carregada pelos transportadores de influxo para o espaço intracelular e esta informação é relevante nos tecidos envolvidos na farmacocinética e farmacodinâmica do fármaco, como o fígado, onde a metformina exerce o seu efeito no espaço intracelular.

Tendo em vista que a doença não impacta nos parâmetros farmacocinéticos, os dados de concentração do fármaco nos tecidos e plasma de ambos os grupos foram agrupados para o desenvolvimento do modelo PBPK, discutido no capítulo 2. O modelo PBPK da metformina desenvolvido em ratos permitiu compreender a relação dos transportadores na farmacocinética da metformina. Esse modelo envolveu a inclusão dos transportadores de influxo OCT-1 (hepatócitos), OCT-2 (células renais) e de efluxo MATE-1 (células do túbulo renal) utilizando o método IVIVE e a predição *in silico* do valor de K_p tecidual calculado pelo método Lukacova. De forma a caracterizar o processo de distribuição da metformina, os dados experimentais permitiram suportar a otimização dos valores de K_p no fígado (1,8) e músculo (2,0), bem como a otimização do parâmetro de ligação aos eritrócitos (1,07). O modelo PBPK descreveu razoavelmente bem as concentrações de metformina total plasmática e livres intersticiais (fígado e músculo) em ratos (diabéticos e controle) após a administração do fármaco pela via intravenosa. A verificação da conformidade

do modelo foi possível através da análise do gráfico do perfil de concentração em função do tempo, onde o perfil simulado foi semelhante ao observado e através da comparação de parâmetros como $C_{m\acute{a}x}$ e ASC_{0-inf} .

Após construir o modelo PBPK capaz de descrever os processos de distribuição e eliminação da metformina utilizando dados pré-clínicos, aplicou-se esse mesmo modelo PBPK desenvolvido no cenário clínico. A literatura demonstra que a farmacocinética da metformina não altera quando comparado indivíduos saudáveis e pacientes DM II com função renal normal (TUCKER *et al.*, 1981). Desta forma, o modelo foi aplicado em indivíduos saudáveis que receberam a administração de metformina pela via intravenosa. Assumindo que a distribuição tecidual da metformina é semelhante entre ratos e humanos, os valores de K_p (fígado e músculo) e ligação aos eritrócitos foram mantidos de acordo com o modelo pré-clínico. A simulação foi comparada aos dados de concentração de metformina no plasma de indivíduos saudáveis obtido de estudo publicado na literatura (Tucker *et al.*, 1981). A aplicação do modelo PBPK da metformina a dados de humanos descreveu adequadamente as concentrações plasmáticas, resultando em um perfil concentração por tempo simulado semelhante ao observado, além de apresentar $C_{m\acute{a}x}$ e ASC_{0-inf} similares. Após caracterizar a eliminação e a distribuição da metformina na administração intravenosa, estendeu-se o modelo PBPK da metformina, de forma a caracterizar a absorção oral do fármaco, visto que esta é a via de administração na clínica. A literatura reporta que a sua absorção ocorre em até 6 horas (MARATHE *et al.*, 2000) através do processo passivo paracelular com uma menor contribuição do transporte ativo por influxo (PROCTOR, BOURDET & THAKKER, 2008). Desta forma, o compartimento de trânsito intestinal do modelo ACAT do GastroPlus™ foi ajustado para que caracterizasse o tempo de residência nesse sítio, além da inclusão de transportador de influxo, conforme descrito no capítulo 2 da presente tese. A simulação do modelo foi comparada com dados de concentração plasmática de indivíduos saudáveis reportados na literatura (CHAE *et al.*, 2012), onde os dados observados foram descritos, obtendo valores adequados de $C_{m\acute{a}x}$ e ASC_{0-inf} .

De posse do modelo PBPK da metformina desenvolvido para ratos diabéticos e em humanos, a previsão da concentração intersticial hepática e muscular da metformina foram realizadas para inclusão no modelo PBPK/PD, nas doses 100 e 150 mg/kg, (i.v.) em ratos e 389,93 mg (vo.) em humanos. Os dados de PK e PD da

metformina em humanos foram retirados da literatura (SHIN & KWON, 2004). As concentrações intersticiais foram correlacionadas com o seu efeito anti-hiperglicemiante, mensurado após o TTOG em ratos e indivíduos saudáveis através do modelo PBPK/PD. Apesar de utilizarmos a concentração livre no fluido intersticial hepático para a construção do modelo PBPK/PD, foi observado um descompasso entre o efeito observado e a concentração intersticial hepática da metformina para ambas as espécies, caracterizando histerese quando plota-se o efeito do fármaco em função da sua concentração no fluido intersticial hepático. Esta observação pode ser explicada pelo mecanismo de ação da metformina, o qual ocorre através do desencadeamento de uma cascata de sinalização celular na mitocôndria.

Um modelo de $I_{\text{máx}}$ modificado de resposta indireta com inibição máxima da produção de glicose endógena hepática descreveu a correlação do efeito com a concentração intersticial de metformina hepática, para ambas as espécies. A análise do modelo PBPK/PD utilizando a administração oral em indivíduos saudáveis demonstrou que o CI_{50} 1.51 $\mu\text{g/mL}$, parâmetro indicativo de potência do fármaco, é 33% menor quando utilizada a concentração livre de metformina no fluido intersticial, enquanto o compartimento central indica que a concentração necessária para a inibição da gliconeogênese é superior (CI_{50} 2.26 $\mu\text{g/mL}$). Demonstrando que o compartimento central pode não representar fidedignamente os resultados observados para o efeito que ocorre no espaço intracelular.

Neste trabalho demonstrou-se pela primeira vez que a fração livre de metformina no seu tecido alvo é semelhante a um tecido de fácil acesso. Igualmente, a alta penetração tecidual da metformina não é influenciada pela presença da diabetes. O modelo PBPK desenvolvido auxiliou na compreensão dos fatores envolvidos na distribuição tecidual da metformina em ratos diabéticos sem dano renal, bem como em indivíduos saudáveis, possibilitando a previsão da concentração livre de metformina no tecido alvo a partir da sua concentração plasmática. E por fim, o modelo PBPK/PD utilizando as concentrações intersticiais do tecido hepático correlacionadas com o efeito anti-hiperglicemiante da metformina foi descrito utilizando um modelo de resposta indireta com inibição da produção da glicose endógena hepática. Os modelos baseados na fisiologia desenvolvidos nesta tese podem ser utilizados como ponto de partida para simular cenários clínicos de forma a

auxiliar na terapia e evitar o efeito adverso de acidose láctica nesses pacientes, assim como investigar a interação medicamentosa da metformina com outros fármacos.

- Os métodos bioanalíticos desenvolvidos para a quantificação da metformina em amostras de microdialisado teciduais (fígado e músculo) e plasma de animais controle e diabéticos demonstraram-se sensíveis para a quantificação das amostras, possibilitando a caracterização do perfil farmacocinético da metformina em ambas as matrizes.
- O modelo experimental de diabetes *mellitus* induzido por estreptozotocina e nicotinamida, sem causar dano hepático e renal, foi adaptado às condições laboratoriais. Este modelo mimetiza a condição encontrada em pacientes em tratamento com metformina, os quais não possuem danos extensos no tecido renal. O modelo experimental de DM possibilitou a investigação da farmacocinética da metformina 14 dias após a indução da doença
- A técnica de microdiálise permitiu o estudo das concentrações livres de metformina no tecido hepático e muscular de ratos controle e diabéticos. A análise farmacocinética não-compartimental demonstrou que a concentração desse fármaco é similar em ambos os tecidos, sem impacto da doença, possibilitando inferir a concentração no tecido alvo (fígado) a partir da concentração mensurada em um tecido de fácil acesso (músculo).
- A investigação da farmacocinética da metformina demonstrou uma elevada exposição hepática e muscular do fármaco quando comparado à exposição plasmática, sem impacto da diabetes. Este resultado demonstra a quantidade de metformina disponível para ser transportada ao espaço intracelular tecidual.
- O modelo farmacocinético baseado na fisiologia desenvolvido descreveu as concentrações de metformina no plasma e no fluído intersticial hepático e muscular de ratos (diabéticos e controle) após a administração pela via intravenosa. Este modelo desenvolvido foi aplicado em indivíduos saudáveis após a administração de metformina na mesma via e estendido para a administração oral. O modelo desenvolvido permite prever as concentrações intersticiais livre de metformina no seu tecido alvo utilizando as concentrações plasmáticas, demonstrando potencial aplicação clínica.

- O efeito anti-hiperglicemiante da metformina após administração em dose única a ratos Wistar diabéticos foi observado para as maiores doses testadas (100 e 150 mg/kg; i.v.), demonstrando que somente altas concentrações do fármaco conseguem inibir a produção endógena de glicose após a administração aguda nesse modelo experimental.
- O modelo farmacocinético-farmacodinâmico baseado na fisiologia desenvolvido descreveu adequadamente o efeito em função do tempo em ratos diabéticos após a dose única de 100 e 150 mg/kg, i.v. assim como em indivíduos saudáveis após a administração de metformina 389,93 mg (v.o.).

ADITHAN, C. *et al.* Differential effect of type I and type II diabetes mellitus on antipyrine elimination. **Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology**, 1989. v. 11, n. 12, p. 755–758.

AGORAM, B.; WOLTOSZ, W. S.; BOLGER, M. B. Predicting the impact of physiological and biochemical processes on oral drug bioavailability. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2001. v. 50 Suppl 1, p. S41-67.

ALMUKAINZI, M. *et al.* Mechanistic understanding of the effect of renal impairment on metformin oral absorption using computer simulations. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, 2017. v. 47, n. 2, p. 151–161.

ALMUKAINZI, M.; LUKACOVA, V.; LÖBENBERG, R. Modelling the Absorption of Metformin with Patients Post Gastric Bypass Surgery. **Journal of Diabetes & Metabolism**, 2014. p. 1–7.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. 2016 American Diabetes Association (ADA) Diabetes Guidelines Summary Recommendation from NDEI. **National Diabetes Education Initiative**, 2016. v. 39, n. 1, p. 1–46.

AN, H.; HE, L. Current Understanding of Metformin Effect on the Control of Hyperglycemia in Diabetes. **J Endocrinol.**, 2016. p. 1–25.

ANDRADE, C. D. *et al.* Validation of LC-MS / MS method applied to evaluation of free tissue concentrations of vildagliptin in diabetic rats by microdialysis. 2014. p. 1722–1727.

ARAUJO, B. V. *et al.* Microdialysis as a tool to determine free kidney levels of voriconazole in rodents: A model to study the technique feasibility for a moderately lipophilic drug. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 2008. v. 47, n. 4–5, p. 876–881.

AZEREDO, F. J.; DALLA COSTA, T.; DERENDORF, H. Role of microdialysis in pharmacokinetics and pharmacodynamics: Current status and future directions. **Clinical Pharmacokinetics**, 2014. v. 53, n. 3, p. 205–212.

BAERTS, L. *et al.* Potential impact of sitagliptin on collagen-derived dipeptides in diabetic osteoporosis. PMID: 26342756: **Pharmacological Research**, 2015. v. 100, p. 336–340.

BECKMANN, R. [Absorption, distribution in the organism and elimination of metformin]. PMID: 5360810: **Diabetologia**, 1969. v. 5, n. 5, p. 318–324.

BLONDE, L. *et al.* Gastrointestinal tolerability of extended-release metformin tablets compared to immediate-release metformin tablets: results of a retrospective cohort study. PMID: 15119994: **Current Medical Research and Opinion**, 2004. v. 20, n. 4, p. 565–572.

BOWE, J. E. *et al.* Assessing glucose homeostasis in rodent models. **Journal of Endocrinology**, 2014. v. 222, n. 3, p. 13–25.

BRIETZKE, S. A. Oral Antihyperglycemic Treatment Options for Type 2 Diabetes Mellitus. **Medical Clinics of North America**, 2015. v. 99, n. 1, p. 87–106.

BURT, H. J. *et al.* Metformin and cimetidine: Physiologically based pharmacokinetic modelling to investigate transporter mediated drug-drug interactions. PMID: 27019345: **European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences**, 2016. v. 88, p. 70–82.

CARREÑO, F. *et al.* Pharmacokinetic Investigation of Quetiapine Transport across Blood-Brain Barrier Mediated by Lipid Core Nanocapsules Using Brain Microdialysis in Rats. **Molecular Pharmaceutics**, 2016. v. 13, n. 4, p. 1289–1297.

CEDERSUND, G.; STRÅLFORS, P. Putting the pieces together in diabetes research: towards a hierarchical model of whole-body glucose homeostasis. PMID: 19056492: **European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences**, 2009. v. 36, n. 1, p. 91–104.

CHAE, J. W. *et al.* Population PK/PD analysis of metformin using the signal transduction model. **British Journal of Clinical Pharmacology**, 2012. v. 74, n. 5, p. 815–823.

CHAURASIA, C. S. *et al.* AAPS-FDA workshop white paper: microdialysis principles, application and regulatory perspectives. PMID: 17458685: **Pharmaceutical Research**, 2007. v. 24, n. 5, p. 1014–1025.

CHOI, Y. H. *et al.* Changes in metformin pharmacokinetics after intravenous and oral administration to rats with short-term and long-term diabetes induced by streptozotocin. PMID: 18393297: **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2008. v. 97, n. 12, p. 5363–5375.

CHOI, Y. H.; KIM, S. G.; LEE, M. G. Dose-independent pharmacokinetics of metformin in rats: Hepatic and gastrointestinal first-pass effects. PMID: 16937336: **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2006. v. 95, n. 11, p. 2543–2552.

DAYNEKA, N. L.; GARG, V.; JUSKO, W. J. Comparison of four basic models of indirect pharmacodynamic responses. **Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics**, 1993. v. 21, n. 4, p. 457–478.

DEFRONZO, R. A. *et al.* Type 2 diabetes mellitus. PMID: 27189025: **Nature Reviews. Disease Primers**, 2015. v. 1, p. 15019.

DERENDORF, H.; MEIBOHM, B. Modeling of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) relationships: Concepts and perspectives. **Pharmaceutical Research**, 1999. v. 16, n. 2, p. 176–185.

GARHYAN, *et al.* Drug-disease model-based development of therapeutic agents for treatment of diabetes *in: Applied Pharmacometrics*. Springer, New York, 2015, 570p.

DOSTALEK, M.; AKHLAGHI, F.; PUZANOVOVA, M. Effect of diabetes mellitus on pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of drugs. **Clinical Pharmacokinetics**, 2012. v. 51, n. 8, p. 481–499.

ELEAZU, C. O. *et al.* Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans. **Journal of diabetes and metabolic disorders**, 2013. v. 12, n. 1, p. 60–60.

FERRANNINI, E. The target of metformin in type 2 diabetes. **The New England Journal of Medicine**, 2014. v. 371, n. 16, p. 1547–1548.

FORBES, J. M.; COOPER, M. E. Mechanisms of diabetic complications. **Physiological reviews**, 2013. v. 93, n. 1, p. 137–88.

GAITONDE, P. *et al.* A Comprehensive Review of Novel Drug-Disease Models in Diabetes Drug Development. PMID: 26798033: **Clinical Pharmacokinetics**, 2016. v. 55, n. 7, p. 769–788.

GHASEMI, A.; KHALIFI, S.; JEDI, S. Streptozotocin-nicotinamide-induced rat model of type 2 diabetes (review). PMID: 25532953: **Acta Physiologica Hungarica**, 2014. v. 101, n. 4, p. 408–420.

GRAHAM, G. G. *et al.* Clinical pharmacokinetics of metformin. PMID: 21241070: **Clinical Pharmacokinetics**, 2011. v. 50, n. 2, p. 81–98.

HAMMARLUND-UDENAES, M. Microdialysis as an Important Technique in Systems Pharmacology-a Historical and Methodological Review. **The AAPS journal**, 2017.

HIGGINS, J. W.; BEDWELL, D. W.; ZAMEK-GLISZCZYNSKI, M. J. Ablation of Both Organic Cation Transporter (Oct) 1 and Oct2 Alters Metformin Pharmacokinetics but Has No Effect on Tissue Drug Exposure and Pharmacodynamics. **Drug Metabolism and Disposition**, 2012. v. 40, n. 6, p. 1170–1177.

HONG, Y. *et al.* Population exposure-response modeling of metformin in patients with type 2 diabetes mellitus. **Journal of clinical pharmacology**, 2008. v. 48, n. 6, p. 696–707.

FEDERAÇÃO INTERNACIONAL DE DIABETES. *FID DIABETES ATLAS*, 7ed. Bruxelas, Bélgica: *International Diabetes Federation*, 2015. Disponível em: <<http://www.diabetesatlas.org/>>. Acesso em: 16 nov. 2016.

ISLAM, M. S.; WILSON, R. D. Experimentally induced rodent models of type 2 diabetes. PMID: 22893406: **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, 2012. v. 933, p. 161–174.

JAMEI, M. Recent Advances in Development and Application of Physiologically-Based Pharmacokinetic (PBPK) Models: a Transition from Academic Curiosity to Regulatory Acceptance. **Current Pharmacology Reports**, 2016. v. 2, p. 161–169.

JONES, H.; ROWLAND-YEO, K. Basic concepts in physiologically based pharmacokinetic modeling in drug discovery and development. **CPT: pharmacometrics & systems pharmacology**, 2013. v. 2, p. e63.

K HURTADO, F. *et al.* Enhanced penetration of moxifloxacin into rat prostate tissue evidenced by microdialysis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 2014. v. 44, n. 4, p. 327–333.

KAJBAF, F.; DE BROE, M. E.; LALAU, J.-D. Therapeutic Concentrations of Metformin: A Systematic Review. PMID: 26330026: **Clinical Pharmacokinetics**, 2016. v. 55, n. 4, p. 439–459.

KING, A. J. F. The use of animal models in diabetes research. PMID: 22352879PMCID: PMC3417415: **British Journal of Pharmacology**, 2012. v. 166, n. 3, p. 877–894.

KOWALSKI, G. M.; BRUCE, C. R. The regulation of glucose metabolism: implications and considerations for the assessment of glucose homeostasis in rodents. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, 2014. v. 307, n. 10, p. E859-71.

KUEPFER, L. *et al.* Applied Concepts in PBPK Modeling: How to Build a PBPK/PD Model. **CPT: pharmacometrics & systems pharmacology**, 2016. v. 5, n. 10, p. 516–531.

LANDERSDORFER, C. B.; JUSKO, W. J. Pharmacokinetic/ pharmacodynamic modelling in diabetes mellitus. **Clinical Pharmacokinetics**, 2008. v. 47, n. 7, p. 417–448.

LEE, J. H. *et al.* Pharmacokinetics of drugs in rats with diabetes mellitus induced by alloxan or streptozocin: comparison with those in patients with type I diabetes mellitus. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, 2010. v. 62, n. 1, p. 1–23.

LEE, M. G.; CHOI, Y. H.; LEE, I. Effects of diabetes mellitus induced by alloxan on the pharmacokinetics of metformin in rats: restoration of pharmacokinetic parameters to the control state by insulin treatment. **Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Société canadienne des sciences pharmaceutiques**, 2008. v. 11, n. 1, p. 88–103.

LERNER, P. I.; WEINSTEIN, L. ABNORMALITIES OF ABSORPTION OF BENZYL PENICILLIN G AND SULFISOXAZOLE IN PATIENTS WITH DIABETES MELLITUS. **The American Journal of the Medical Sciences**, 1964. v. 248, p. 37–51.

LI, J. *et al.* Prediction of Drug Disposition in Diabetic Patients by Means of a Physiologically Based Pharmacokinetic Model. **Clinical pharmacokinetics**, 2015. v. 54, p. 179–193.

LIANG, X.; GIACOMINI, K. M. Transporters Involved in Metformin Pharmacokinetics and Treatment Response. PMID: 28495567: **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2017.

MADIRAJU, A. K. *et al.* Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. **Nature**, 2014. v. 510, n. 7506, p. 542–6.

MARATHE, P. H. *et al.* Effect of altered gastric emptying and gastrointestinal motility on metformin absorption. **British Journal of Clinical Pharmacology**, 2000. v. 50, n. 4, p. 325–332.

MASIELLO, P. *et al.* Development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide. **Diabetes**, 1998. v. 47, p. 224–229.

MEIBOHM, B.; DERENDORF, H. Basic concepts of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) modelling. **International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics**, 1997. v. 35, n. 10, p. 401–413.

LANGE, E. C. M. Recovery and calibration techniques: toward quantitative microdialysis. *In: Microdialysis in Drug Development*, Springer, New York, 2013, 338p.

MOULD, D. R.; UPTON, R. N. Basic concepts in population modeling, simulation, and model-based drug development. PMID: 23835886PMCID: PMC3606044: **CPT: pharmacometrics & systems pharmacology**, 2012. v. 1, p. e6.

MOUTON, J. W. *et al.* Tissue concentrations: do we ever learn? PMID: 18065413: **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2008. v. 61, n. 2, p. 235–237.

NOVELLI, M. *et al.* Anti-diabetic properties of a non-conventional radical scavenger, as compared to pioglitazone and exendin-4, in streptozotocin-nicotinamide diabetic mice. PMID: 24530416: **European Journal of Pharmacology**, 2014. v. 729, p. 37–44.

OSHIMA, R. *et al.* Evidence for organic cation transporter-mediated metformin transport and 5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase activation in rat skeletal muscles. **Metabolism: Clinical and Experimental**, 2015. v. 64, n. 2, p. 296–304.

PANDIT, V. *et al.* Pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of floating microspheres of metformin hydrochloride. PMID: 22372865: **Drug Development and Industrial Pharmacy**, 2013. v. 39, n. 1, p. 117–127.

PERNICOVA, I.; KORBONITS, M. Metformin—mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. **Nature Reviews Endocrinology**, 2014. v. 10, n. 3, p. 143–156.

PIGATTO, M. C. *et al.* Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling of etoposide tumor growth inhibitory effect in Walker-256 tumor-bearing rat model using free intratumoral drug concentrations. **European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences**, 2017. v. 97, p. 70–78.

PLOCK, N.; KLOFT, C. Microdialysis - Theoretical background and recent implementation in applied life-sciences. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2005. v. 25, n. 1, p. 1–24.

POULIN, P. A paradigm shift in pharmacokinetic-pharmacodynamic (PKPD) modeling: rule of thumb for estimating free drug level in tissue compared with plasma to guide drug design. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2015. v. 104, n. 7, p. 2359–2368.

PREISS, D. *et al.* Sustained influence of metformin therapy on circulating glucagon-like peptide-1 levels in individuals with and without type 2 diabetes. **Diabetes, Obesity & Metabolism**, 2017. v. 19, n. 3, p. 356–363.

PROCTOR, W. R.; BOURDET, D. L.; THAKKER, D. R. Mechanisms underlying saturable intestinal absorption of metformin. **Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals**, 2008. v. 36, n. 8, p. 1650–1658.

RADENKOVIĆ, M.; STOJANOVIĆ, M.; PROSTRAN, M. Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: The current state of the art. PMID: 26596652: **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, 2016. v. 78, p. 13–31.

RENA, G.; HARDIE, D. G.; PEARSON, E. R. The mechanisms of action of metformin. **Diabetologia**, 2017.

ROGLIC, G.; WORLD HEALTH ORGANIZATION (Org.). **Global report on diabetes**. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2016.

SHIN, H. L.; KWON, K. I. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling for the relationship between glucose-lowering effect and plasma concentration of metformin in volunteers. **Archives of Pharmacal Research**, 2004. v. 27, n. 7, p. 806–810.

SLITT, A L. *et al.* Tissue distribution and renal developmental changes in rat organic cation transporter mRNA levels. **Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals**, 2002. v. 30, n. 2, p. 212–219.

SOGAME, Y. *et al.* Liver uptake of Biguanides in rats. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, 2011. v. 65, n. 6, p. 451–455.

SRINIVAS, N. R. Strategies for preclinical pharmacokinetic investigation in streptozotocin-induced diabetes mellitus (DMIS) and alloxan-induced diabetes mellitus (DMIA) rat models: case studies and perspectives. PMID: 24596068: **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, 2015. v. 40, n. 1, p. 1–12.

STEPENSKY, D. *et al.* Pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis of the glucose-lowering effect of metformin in diabetic rats reveals first-pass pharmacodynamic effect. **Drug Metabolism and Disposition**, 2002. v. 30, n. 8, p. 861–868.

SZKUDELSKI, T. Streptozotocin-nicotinamide-induced diabetes in the rat. Characteristics of the experimental model. **Experimental Biology and Medicine**, 2012. v. 237, p. 481–490.

TORRES, B. G. S. *et al.* Population Pharmacokinetic Modeling as a Tool To Characterize the Decrease in Ciprofloxacin Free Interstitial Levels Caused by *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Lung Infection in Wistar Rats. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2017. v. 61, n. 7.

TUCKER, G. T. *et al.* Metformin kinetics in healthy subjects and in patients with diabetes mellitus. **British Journal of Clinical Pharmacology**, 1981. v. 12, n. 2, p. 235–246.

WANG, L. *et al.* Interspecies variability in expression of hepatobiliary transporters across human, dog, monkey, and rat as determined by quantitative proteomics. **Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals**, 2015. v. 43, n. 3, p. 367–374.

WILCOCK, C.; WYRE, N. D.; BAILEY, C. J. Subcellular distribution of metformin in rat liver. PMID: 1681061: **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 1991. v. 43, n. 6, p. 442–444.

ZAMEK-GLISZCZYNSKI, M. J. *et al.* Metformin sinusoidal efflux from the liver is consistent with negligible biliary excretion and absence of enterohepatic cycling. **Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals**, 2013. v. 41, n. 11, p. 1967–1971.

ZHOU, M.; XIA, L.; WANG, J. Metformin transport by a newly cloned proton-stimulated organic cation transporter (plasma membrane monoamine transporter) expressed in human intestine. **Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals**, 2007. v. 35, n. 10, p. 1956–1962.

ZIMMERMANN, E. S. *et al.* Simultaneous Semimechanistic Population Analyses of Levofloxacin in Plasma, Lung, and Prostate To Describe the Influence of Efflux Transporters on Drug Distribution following Intravenous and Intratracheal Administration. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2016. v. 60, n. 2, p. 946–954.

PARECER COMITÊ DE ETICA



U F R G S
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 26736

Título: MODELAGEM PK-PD DA ASSOCIAÇÃO DE SITAGLIPTINA E METFORMINA EM RATOS DIABÉTICOS INDUZIDOS POR ESTREPTOZOTOCINA

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

BIBIANA VERLINDO DE ARAUJO - coordenador desde 10/04/2014
Andressa Braga - Aluno de Doutorado desde 10/04/2014

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 385 ratos Wistar machos e adultos, de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, Quinta-Feira, 10 de Julho de 2014

STELA MARIS KUZE RATES
Coordenador da comissão de ética