

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

RODRIGO VICENTINO PLACIDO

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA GLICOPROTEÍNA-P NA
FARMACOCINÉTICA DE FÁRMACOS ANTIEPILÉPTICOS EM RATOS**

**ALFENAS/MG
2021**

RODRIGO VICENTINO PLACIDO

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA GLICOPROTEÍNA-P NA
FARMACOCINÉTICA DE FÁRMACOS ANTIEPILÉPTICOS EM RATOS**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas, pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Bergamin Boralli Marques

Co-orientadora: Profa. Dra. Marília Gabriella A. G. Pereira

**ALFENAS/MG
2021**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central – Campus Sede

Placido, Rodrigo Vicentino

P698a Avaliação da influência da glicoproteína-p na farmacocinética de fármacos
antiepilépticos em ratos / Rodrigo Vicentino Placido – Alfenas, MG, 2021.
98 f.: il. –

Orientadora: Vanessa Bergamin Boralli Marques.

Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de
Alfenas, 2021.

Bibliografia.

1. Epilepsia. 2. Transportadores. 3. Antiepilépticos. 4. Farmacocinética.
I. Marques, Vanessa Bergamin Boralli. II. Título.

CDD- 615

RODRIGO VICENTINO PLACIDO

AValiação DA INFLUÊNCIA DA GLICOPROTEÍNA-P NA FARMACOCINÉTICA DE FÁRMACOS ANTIEPILÉPTICOS EM RATOS

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 27 de agosto de 2021

Profa. Dra. Vanessa Bergamin Boralli Marques
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Lívea Dornela Godoy
Instituição: Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Natália de Jesus Antunes
Instituição: Universidade Estadual de Campinas

Profa. Dra. Silvia Graciela Ruginsk Leitão
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Prof. Dr. Eduardo Costa de Figueiredo
Instituição: Universidade Federal de Alfenas



Documento assinado eletronicamente por **liveagodoy@alumni.usp.br, Usuário Externo**, em 27/08/2021, às 17:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eduardo Costa de Figueiredo, Professor do Magistério Superior**, em 27/08/2021, às 17:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Silvia Graciela Ruginsk Leitão, Professor do Magistério Superior**, em 27/08/2021, às 17:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vanessa Bergamin Boralli Marques, Professor do Magistério Superior**, em 27/08/2021, às 17:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Natália de Jesus Antunes, Usuário Externo**, em 27/08/2021, às 17:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0583137** e o código CRC **E6592F69**.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, por ter me dado saúde, sabedoria e força para a realização deste doutorado.

À minha orientadora, Vanessa, e minha co-orientadora, Marília, por terem me aceitado como orientado, pela paciência, pelos ensinamentos e pelo tempo dedicado.

Aos Laboratórios de Fisiologia e de Análise de Toxicantes e Fármacos, que abriram as portas para a realização dos experimentos. Aos professores e técnicos que sempre me ajudaram. Às alunas de iniciação científica, que em muito me ajudaram na realização deste trabalho.

À banca examinadora por aceitar o convite e pelas valiosas contribuições que certamente serão dadas para o aprimoramento deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) da Universidade Federal de Alfenas.

Por fim e não menos importante, aos meus pais Élcio e Maria Conceição por sempre acreditarem em mim e por toda a confiança depositada em mim. À minha noiva, Isabelly por estar junto comigo durante toda essa caminhada, por também acreditar nos meus sonhos e por todas as dificuldades que enfrentamos juntos. Aos meus amigos que sempre estiveram por perto durante esta etapa.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (APQ-01194-18 - FAPEMIG).

RESUMO

A epilepsia é uma patologia caracterizada por crises convulsivas recorrentes, que ocorrem em decorrência de descargas elétricas excessivas que acometem os neurônios. A doença é de incidência mundial, acometendo cerca de cinquenta milhões de pessoas, sendo de maior prevalência em países em desenvolvimento. Cerca de 30% desses pacientes não respondem ao tratamento, que pode ser devido a influência dos transportadores na farmacocinética dos fármacos antiepilépticos. O principal transportador de efluxo responsável por essa resistência é a glicoproteína-P (P-gp), presente especialmente na barreira hematoencefálica. Uma vez que os fármacos antiepilépticos são substratos da P-gp, estes sofrem ação de efluxo, ocasionando alterações farmacocinéticas, ou concentrações subterapêuticas no sistema nervoso central (SNC), já que esse é o seu principal sítio de ação farmacológica. Diante do exposto, o presente trabalho se propôs a avaliar a farmacocinética de fármacos antiepilépticos e a fexofenadina, comparando-se animais controle e ratos epilépticos induzidos pelo modelo da pilocarpina. O uso de inibidores da P-gp (verapamil), como possível alternativa terapêutica, também foi avaliado. Para o grupo tratado com fexofenadina com inibidor da P-gp, observou-se no AUC^{0-3h} que houve uma redução no grupo controle (223,9 vs. 154,9ng.h/mL) e no grupo epiléptico (136,4 vs. 71,3ng.h/mL). Para a farmacocinética da carbamazepina não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos controle e epiléptico, tampouco no uso do inibidor da P-gp, o que pode ser explicado pelo fato da carbamazepina não ser um substrato ideal da P-gp em ratos. Para a farmacocinética do fenobarbital foi observado aumento do $AUC^{0-\infty}$ no grupo epiléptico em relação ao controle (20804 vs. 8789,5ng.h/mL), porém, ao se administrar o inibidor da P-gp para o grupo epiléptico esse parâmetro foi reduzido (20804 vs. 11713ng.h/mL). Para a farmacocinética da fenitoína também foi observado aumento do $AUC^{0-\infty}$ para o grupo epiléptico frente ao controle (9860,2 vs. 2393,4ng.h/mL) e redução de $AUC^{0-\infty}$ ao se administrar o inibidor (9860,2 vs. 5823,9ng.h/mL). O aumento da disponibilidade plasmática é reflexo da redução de entrada do fármaco para o SNC, por aumento da expressão da P-gp, relacionado diretamente à indução da epilepsia e à pilocarpina na barreira hematoencefálica, acarretando maior quantidade de fármaco na circulação. Porém, ao se administrar o inibidor, a atividade de efluxo do transportador é bloqueada, permitindo maior distribuição do fármaco e assim reduzindo sua concentração plasmática. Esses resultados apontam o uso do inibidor da P-gp como alternativa promissora para o tratamento da epilepsia refratária; ressalta-se que a refratariedade ao tratamento é um mecanismo complexo e multifatorial.

Palavras-chave: Epilepsia; Transportadores; Antiepilépticos; Farmacocinética.

ABSTRACT

Epilepsy is a pathology characterized by recurrent seizures that occur as a result of excessive electrical discharges that affect brain cells. The disease has a worldwide incidence, affecting about fifty million people, being more prevalent in developing countries. About 30% of these patients do not respond to treatment, which may be due to the influence of transporters on the pharmacokinetics of antiepileptic drugs. The main efflux transporter responsible for this resistance is the P-glycoprotein (P-gp), especially present in the blood-brain barrier. Since antiepileptic drugs are P-gp substrates, they undergo efflux action, causing pharmacokinetic changes, or subtherapeutic concentrations in the central nervous system (CNS), since this is their main site of pharmacological action. Given the above, the present study aimed to evaluate the pharmacokinetics of antiepileptic drugs and fexofenadine, comparing control animals and epileptic rats induced by the pilocarpine model. The use of P-gp inhibitors (verapamil), as a possible therapeutic alternative, was also evaluated. For the group treated with fexofenadine with P-gp inhibitor, it was observed in the AUC^{0-3h} that there was a reduction in the control group (223.9 vs. 154.9ng.h/mL) and in the epileptic group (136.4 vs. 71.3ng.h/mL). For carbamazepine pharmacokinetics, no statistical differences were observed between the control and epileptic groups, nor in the use of P-gp inhibitor, which can be explained by the fact that carbamazepine is not an ideal substrate for P-gp in rats. For the pharmacokinetics of phenobarbital, an increase in $AUC^{0-\infty}$ was observed in the epileptic group compared to the control (20804 vs. 8789.5ng.h/mL), however, when administering the P-gp inhibitor to the epileptic group, this parameter was reduced (20804 vs. 11713ng.h/mL). For the pharmacokinetics of phenytoin, an increase in $AUC^{0-\infty}$ was also observed for the epileptic group compared to the control (9860.2 vs. 2393.4ng.h/mL) and a reduction in $AUC_{0-\infty}$ when administering the inhibitor (9860.2 vs. 5823.9ng.h/mL). The increase in plasma availability reflects the reduction in drug entry into the CNS, due to increased P-gp expression, directly related to the induction of epilepsy and pilocarpine in the blood-brain barrier, causing a greater amount of drug in the circulation. However, when the inhibitor is administered, the efflux activity of the transporter is blocked, allowing greater distribution of the drug and thus reducing its plasma concentration. These results point to the use of P-gp inhibitor as a promising alternative for the treatment of refractory epilepsy; it is noteworthy that treatment refractoriness is a complex and multifactorial mechanism.

Keywords: Epilepsy; Transporters; Antiepileptics; Pharmacokinetics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Hipóteses dos mecanismos da epilepsia refratária.	21
Figura 2 – Os transportadores atuando nos tecidos do organismo humano.	29
Figura 3 – Estrutura molecular de fexofenadina.....	32
Figura 4 – Estratificação dos grupos experimentais para cada fármaco analisado (n=8 por grupo).	39
Figura 5 - Cromatogramas obtidos na análise do fenobarbital em plasma de rato por UHPLC-MS/MS.	55
Figura 6 – Curva analítica para o fenobarbital em plasma de rato.	57
Figura 7 - Efeito residual no método bioanalítico desenvolvido para quantificação de fenobarbital em plasma de rato por UHPLC- MS/MS.....	60
Figura 8 – Cromatogramas obtidos na análise da fenitoína em plasma de rato por UHPLC-MS/MS.	61
Figura 9 – Curva analítica para a fenitoína em plasma de rato.	63
Figura 10 - Efeito residual para o método bioanalítico desenvolvido para quantificação de fenitoína em plasma de rato por UHPLC- MS/MS.....	66
Figura 11 – Curvas médias de concentração plasmática para fexofenadina (FX) em função do tempo para os grupos controle FX, controle FX com inibidor, epiléptico FX e epiléptico FX com inibidor. ...	68
Figura 12 – Curvas médias para concentração plasmática de carbamazepina (CB) em função do tempo para os grupos controle CB, controle CB com inibidor da P-gp, epiléptico CB e epiléptico CB com inibidor da P-gp.....	70
Figura 13 – Curvas médias para concentração plasmática de fenobarbital (FB) em função do tempo para os grupos controle FB, controle FB com inibidor da P-gp, epiléptico FB e epiléptico FB com inibidor da P-gp.	72
Figura 14 – Curvas médias para concentração plasmática de fenitoína (FN) em função do tempo para os grupos controle FN, controle FN com inibidor da P-gp, epiléptico FN e epiléptico FN com inibidor da P-gp.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Gravidade da crise límbica ou crises que mimetizam a epilepsia do lobo temporal.....	40
Tabela 2 - Fármacos utilizados para o protocolo de indução da epilepsia, ação e tempo de administração.	41
Tabela 3 - Dados obtidos da equação linear do fenobarbital.....	56
Tabela 4 - Valores de DPR (CV) (%) e EPR (inexatidão) (%) intra-dia e interdias para precisão e exatidão para fenobarbital em plasma de ratos.	58
Tabela 5 - Dados referentes aos testes de estabilidade de curta duração e pós-processamento.....	59
Tabela 6 - Dados obtidos da equação linear da fenitoína.....	62
Tabela 7 - Valores de DPR (CV) (%) e EPR (inexatidão) (%) intra-dia e interdias para precisão e exatidão para fenitoína em plasma de ratos.	64
Tabela 8 - Dados referentes aos testes de estabilidade de curta duração e pós-processamento.	65
Tabela 9 – Parâmetros farmacocinéticos da fexofenadina (FX) para os grupos controle FX, controle FX com inibidor, epilético FX e epilético FX com inibidor (n= 8, por grupo), após a administração de fexofenadina (10mg/kg, via oral) e inibidor verapamil administrado 2 horas antes da fexofenadina (10mg/kg, via oral).....	67
Tabela 10 – Parâmetros farmacocinéticos da carbamazepina (CB) para os grupos controle CB, controle CB com inibidor, epilético CB e epilético CB com inibidor (n=8, por grupo), após administração de carbamazepina (25mg/kg, via oral) e inibidor verapamil administrado 2 horas antes da carbamazepina (10mg/kg, via oral).	69
Tabela 11 - Parâmetros farmacocinéticos do fenobarbital (FB) para os grupos controle FB, controle FB com inibidor, epilético FB e epilético FB com inibidor (n=8, por grupo), após administração de fenobarbital (40mg/kg, via oral) e inibidor verapamil administrado 2 horas antes do fenobarbital (10mg/kg, via oral).	71

Tabela 12 - Parâmetros farmacocinéticos da fenitoína (FN) para os grupos controle FN, controle FN com inibidor, epilético FN e epilético FN com inibidor (n=8, por grupo), após administração de fenitoína (30mg/kg - via oral) e inibidor verapamil administrado 2 horas antes da fenitoína (10mg/kg – via oral). 73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP - adenosina trifosfato
ACTH - hormônio adrenocorticotrófico
AUC^{0-∞} - área sob a curva do tempo zero até o infinito
AUC^{0-3h} - área sob a curva entre 0 e 3 horas
°C - graus *Celsius*
CB - carbamazepina
Cl - *clearance*
C_{máx} - concentração máxima
COX-2 - ciclo-oxigenase 2
CQA - controle de qualidade alto
CQB - controle de qualidade baixo
CQM - controle de qualidade médio
CV - coeficiente de variação
DPR - desvio padrão relativo
ELT - epilepsia do lobo temporal
EPR - erro padrão relativo
FB - fenobarbital
FMN - Fatores de matrizes normalizados
FN - fenitoína
FX - fexofenadina
g - grama
GABA - ácido gama-aminobutírico
GEPR - *genetically epilepsy-prone rats*
H - hora
ILAE - International League against Epilepsy
i.p. - intraperitoneal
kg - quilograma
LD - limite de detecção
LIQ - limite inferior de quantificação
LSQ - limite superior de quantificação
m/z - razão massa/carga
MDR - *multi-drug resistance gene*
mg - miligrama
min - minuto
mL - mililitro
MP - ácido mercaptopropiônico
ng - nanograma
OAT - transportador de ânions orgânicos
OATP - polipeptídeo transportador de ânions orgânicos
OCT - transportador de cátions orgânicos
P-gp - glicoproteína P
PI - padrão interno
PIB - produto interno bruto
pKa - constante de ionização

RDC - Resolução da Diretoria Colegiada

SE - Status Epilepticus

SNC - sistema nervoso central

$t_{1/2}$ - meia-vida

$T_{m\acute{a}x}$ - tempo para atingir a concentração máxima

UHPLC-MS/MS - cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas (*Ultrapformance liquid chromatography tandem mass-spectrometry*)

μL - microlitro

vs. - *versus*

WAR - *Wistar Audiogenic Rats*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1	EPILEPSIA	17
2.2	MODELOS EXPERIMENTAIS DE INDUÇÃO DE EPILEPSIA EM RATOS.....	23
2.3	TRANSPORTADORES	26
2.4	FEXOFENADINA.....	31
2.5	FÁRMACOS ANTIEPILÉPTICOS	33
2.5.1	Carbamazepina	33
2.5.2	Fenitoína.....	34
2.5.3	Fenobarbital	34
3	JUSTIFICATIVA.....	36
4	OBJETIVOS	37
4.1	OBJETIVO GERAL	37
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
5	METODOLOGIA.....	38
5.1	PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	38
5.2	PROTOCOLO EXPERIMENTAL DE INDUÇÃO DE EPILEPSIA EM RATOS.....	39
5.3	PROTOCOLO DE CANULAÇÃO DA VEIA JUGULAR	41
5.4	DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS BIOANALÍTICAS DE ANÁLISE DOS FÁRMACOS EM PLASMA ..	42
5.4.1	Fexofenadina.....	42
5.4.2	Carbamazepina	43
5.4.3	Fenobarbital	44
5.4.4	Fenitoína.....	45
5.4.5	Validação dos métodos bioanalíticos para análise de fenobarbital e fenitoína em plasma de rato	46
5.5	PROTOCOLOS PARA AVALIAÇÃO FARMACOCINÉTICA	50
5.5.1	Fexofenadina.....	50
5.5.2	Carbamazepina	51
5.5.3	Fenobarbital	51

5.5.4 Fenitoína	52
5.6 ANÁLISE FARMACOCINÉTICA	52
5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	52
6 RESULTADOS	54
6.1 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS DE ANÁLISE EM PLASMA DE RATOS	54
6.1.1 Fenobarbital	54
6.1.2 Fenitoína	60
6.2 FARMACOCINÉTICA	66
6.2.1 Fexofenadina	66
6.2.2 Carbamazepina	69
6.2.3 Fenobarbital	70
6.2.4 Fenitoína	73
7 DISCUSSÃO	75
8 CONCLUSÕES	86
REFERÊNCIAS	87
ANEXO A - CERTIFICADO	98

1 INTRODUÇÃO

A epilepsia é uma patologia com incidência mundial, que afeta entre 1 a 3% da população, e é um dos transtornos neurológicos de maior prevalência. A patologia é caracterizada por crises recorrentes espontâneas, caracterizadas por breves episódios de movimento involuntário denominado crises convulsivas, e ocorrem devido à descargas elétricas excessivas, que acometem os neurônios. O tratamento é crucial para melhorar as condições de vida dos pacientes, porém, cerca de 30% dos pacientes com epilepsia não apresentam respostas ao tratamento medicamentoso (WHO, 2021).

A patologia é complexa e de difícil análise dos mecanismos envolvidos. Foram desenvolvidos modelos animais para melhor compreensão da mesma e, estes simulam sintomas, alterações bioquímicas e fisiológicas. Dentre os modelos de indução de epilepsia existem cepas geneticamente susceptíveis a epilepsia, ou seja, que possuem *background* genético para desenvolvimento da epilepsia, dentre elas o grupo WAR, e formas de indução química, com agentes que induzem a patologia, como a pilocarpina (KANDATRAVICIUS, 2014).

Os transportadores, como, por exemplo, a glicoproteína P (P-gp), que está presente na barreira hematoencefálica, intestino, rins e outros órgãos, exerce atividade de efluxo, podem alterar a farmacocinética de vários compostos, impedindo a entrada de substâncias, como os medicamentos, em órgãos e tecidos específicos. Este transportador pode alterar a farmacocinética de fármacos, como por exemplo, da digoxina, que tem sua biodisponibilidade diminuída quando administrada juntamente com a rifampicina (que é um indutor da expressão de P-gp). A expressão da P-gp também pode estar alterada em algumas patologias, como o câncer e a epilepsia (GREINER *et al.*, 1999; LUND; PETERSEN; DALHOFF, 2017).

Este estudo avaliou a influência de inibidores da P-gp frente ao medicamento fexofenadina, que é fármaco marcador da atividade da P-gp. Esta avaliação têm a finalidade de verificar uma possível alternativa terapêutica para os pacientes refratários, uma vez que a inibição deste transportador de efluxo na barreira hematoencefálica poderá permitir a entrada do fármaco ao SNC,

permitindo a sua ação farmacológica.

Além disso, realizou-se a avaliação farmacocinética de fármacos utilizados para tratamento da epilepsia, como a carbamazepina, o fenobarbital e a fenitoína. Esses fármacos utilizados no tratamento da epilepsia são substratos da P-gp. Por isso, a avaliação farmacocinética, comparando-se animais controle e epiléticos, bem como a avaliação do uso do inibidor da P-gp como alternativa terapêutica, visando compreender a disposição cinética de fármacos clinicamente utilizados no tratamento da epilepsia, e o envolvimento da P-gp e sua inibição em parâmetros farmacocinéticos, auxiliando o entendimento de mecanismos envolvidos em casos de resistência à terapia farmacológica na epilepsia.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 EPILEPSIA

A epilepsia é um grave distúrbio neurológico, sendo um dos mais comuns no mundo. A ocorrência da epilepsia é maior em pessoas idosas, porém pode acometer todas as faixas etárias, inclusive neonatos e crianças, nas quais complicações obstétricas e infecções neonatais podem levar ao desenvolvimento da doença (BRODIE; SCHACHTER; KWAN, 2012). Em suma, esta patologia afeta pacientes de todas as idades, raças, classes sociais e localizações geográficas. Ela é uma doença encefálica caracterizada pela predisposição em gerar crises convulsivas e por trazer consequência neurobiológicas, sociais, cognitivas e psicológicas, afetando a qualidade de vida dos pacientes (BEGHI, 2020).

Este distúrbio acomete cerca de cinquenta milhões de pessoas no mundo. Indivíduos acometidos necessitam de tratamento, sendo que 30% destes pacientes apresentam crises refratárias, que não tem resposta ao tratamento disponível; aproximadamente 80% destes casos ocorrem em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento. A epilepsia representa um impacto significativo na economia, visto que resulta em perdas de produtividade, além de necessitar maiores cuidados em saúde, e pode levar a morte. Nos países em desenvolvimento, onde as condições de saúde são mais precárias, a doença atinge todas as idades. Quando a patologia acomete indivíduos em idade laboral, estes ficam limitados, sem poder trabalhar em muitas áreas devido às limitações impostas pela doença. Além de todos estes problemas, a epilepsia ainda é alvo de discriminação e preconceito; algumas pessoas não procuram tratamento para que não sejam identificadas com a enfermidade (WHO, 2021).

Fiest *et al.* (2017), avaliaram a epidemiologia da doença e determinaram a taxa de prevalência desta patologia em 0,64% da população mundial, sendo que nos países em desenvolvimento apresentam maior prevalência de casos. A incidência de novos casos é de 0,06% a cada ano: a idade mais acometida são adolescentes e adultos jovens, com os homens sendo os mais acometidos,

porém o autor relata que as mulheres em alguns países podem não ter sido relatadas nos casos por questões de preconceito.

A epilepsia é uma patologia complexa e, anualmente, muitas descobertas são feitas a seu respeito. Tudo isso se reflete na dificuldade em se definir tipos e classificá-las, assim, a liga internacional contra a epilepsia (*International League Against Epilepsy* - ILAE) tenta atualizar periodicamente a definição da epilepsia. A definição vigente no momento é que esta patologia pode ser confirmada em pacientes após estes apresentarem duas crises espontâneas em um intervalo maior que 48 horas, uma crise espontânea e risco de pelo menos 60% de ocorrência de uma nova crise, desde que a segunda crise ocorra em um período máximo de 10 anos. Considera-se um indivíduo livre da patologia caso ele não tenha apresentado mais nenhuma crise em um intervalo maior que 10 anos desde a última crise e estando a pelo menos 5 anos sem usar medicamento antiepiléptico (ILAE, 2017).

As crises que acometem os pacientes com epilepsia são breves episódios de movimentos involuntários, que ocorrem de maneira espontânea. Estas crises podem comprometer uma região delimitada do cérebro (focal) ou todo o cérebro (generalizada), e são denominadas crises convulsivas. Por vezes, pode ocorrer perda de consciência e de controle da função intestinal ou da bexiga (FERNANDES, 2013; SCHEFFER *et al.*, 2017). As crises convulsivas são resultado de descargas elétricas excessivas, que acometem os neurônios, podendo ocorrer em diferentes áreas do cérebro. A frequência pode ser variável, podendo ocorrer uma vez ao ano, ou várias vezes ao dia. Podem ser caracterizadas em idiopáticas, quando a causa não é conhecida, ou em epilepsia secundária ou sintomática, quando sua causa é devido a danos cerebrais, traumas, acidentes vasculares cerebrais, tumores cerebrais, dentre outros (SCHEFFER *et al.*, 2017).

As crises convulsivas são fenômenos definidos bioquimicamente pelo desequilíbrio entre os neurotransmissores inibitórios e excitatórios, dentre eles, os principais são GABA e glutamato, respectivamente (NOMURA *et al.*, 2017).

Ao se analisar o foco epiléptico de pacientes, notou-se uma diminuição nos receptores GABA_A. Medições das concentrações extracelulares de GABA em pacientes, durante a crise, demonstraram que a concentração do neurotransmissor aumenta 84 vezes em relação ao nível basal. Porém, um

aumento nos níveis do neurotransmissor inibitório em determinadas áreas do SNC também pode ser pró-epileptogênico, originando casos de crises de ausência (NOMURA *et al.*, 2017).

O aumento do glutamato no meio extracelular do SNC pode ocorrer relacionado à problemas em enzimas e transportadores (glutamato sintetase e transportadores de glutamato/aspartato, respectivamente) pertencentes ao ciclo do glutamato/glutamina, que é a principal rota de captação e metabolização do glutamato. Este aumento na concentração de glutamato causa aumento na transmissão glutamatérgica, contribuindo para subsequente *status* epiléptico. No equilíbrio entre o neurotransmissor inibitório (GABA) e o neurotransmissor excitatório (glutamato), ocorre o predomínio da resposta excitatória do glutamato. Alguns receptores de glutamato também são mais expressos em modelos animais de indução (ALBRECHT; ZIELIŃSKA, 2017).

Devido ao desequilíbrio de estímulos excitatórios e inibitórios em neurônios de áreas específicas, pode ocorrer morte neuronal. Na tentativa de reorganização, ocorre o surgimento de novas conexões neuronais, muitas vezes desorganizadas, que podem gerar crises convulsivas espontâneas. Toda essa reorganização leva ao surgimento de acúmulo de proteínas neurodegenerativas (como a β -amiloide e proteína Tau), neurogênese, inflamações, mudanças na excitabilidade e transmissão elétrica por alterações na expressão e funcionamento de canais iônicos, mudanças nas características de liberação e captação de neurotransmissores e cascatas de sinalização celular, com consequente déficit cognitivo e motor (THIJS *et al.*, 2019).

Outras causas recorrentes que podem levar ao desenvolvimento de epilepsia são: anomalia cerebral durante o desenvolvimento, traumatismo craniano, hemorragia, anóxia durante o parto, tumores, infecção cerebral, crises febris prolongadas (FERNANDES, 2013).

O tratamento da epilepsia é crucial para melhorar a qualidade de vida dos pacientes, pois simples atos como dirigir, apresentam restrição para estes indivíduos. O início do tratamento é conflitante, havendo recomendações distintas: para início após a primeira crise convulsiva, enquanto há grupos que defendem que só se pode considerar que a epilepsia foi instalada e deve ser tratada após a segunda crise convulsiva. O medicamento antiepiléptico a ser utilizado deve combinar segurança e eficácia no tratamento, com o mínimo de

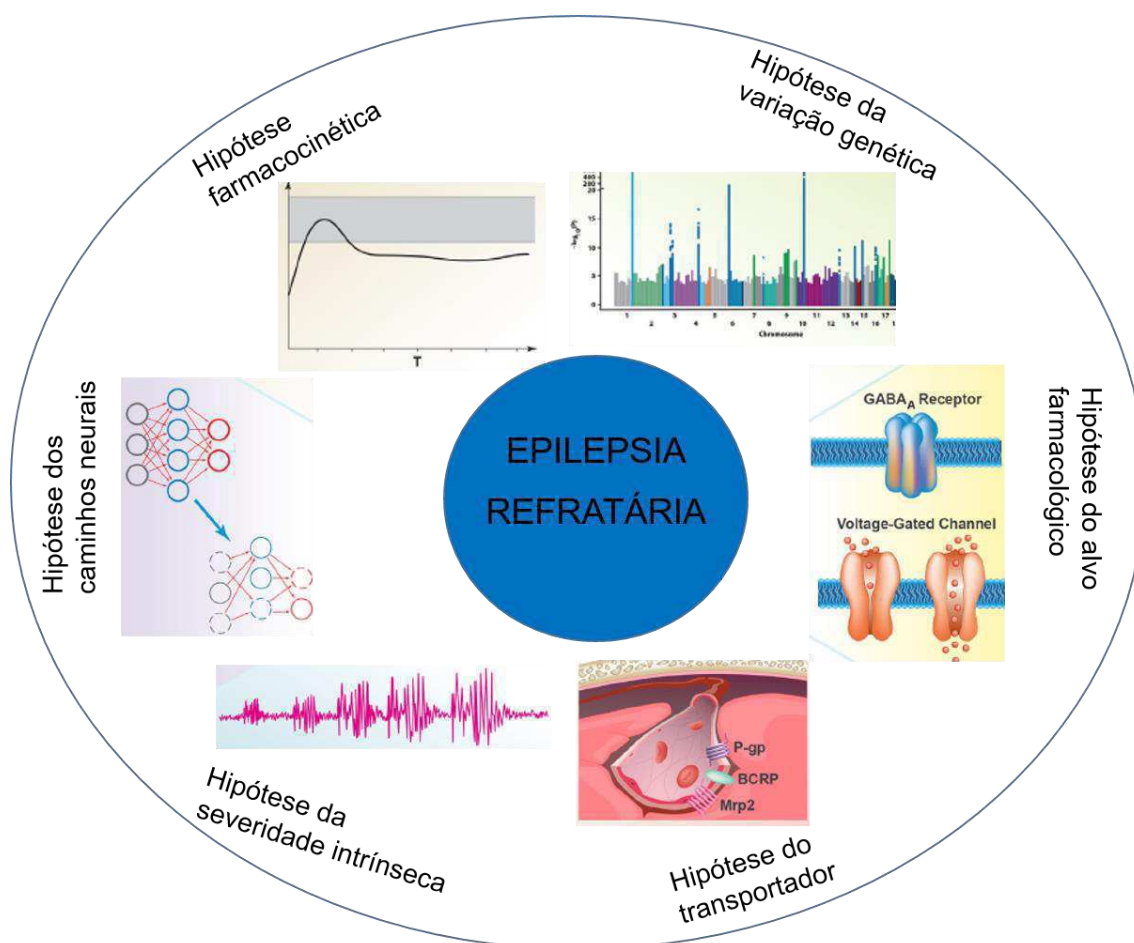
efeitos colaterais (PERUCCA; TOMSON, 2011).

Existem diversos fármacos para o tratamento da epilepsia; nem todos apresentam a eficácia desejada, e alguns apresentam muitos efeitos adversos. A escolha é feita pelo tipo e frequência da crise, idade e estilo de vida. Os fármacos mais utilizados no tratamento são: carbamazepina, fenobarbital, fenitoína e lamotrigina. Em casos em que o paciente não responde ao tratamento, a primeira alternativa é o aumento da dose, que pode gerar efeitos adversos, principalmente em idosos. A segunda alternativa é utilizar politerapia; ainda assim pode haver insucesso. Nas crises refratárias, a remoção cirúrgica do foco epiléptico é uma alternativa ao tratamento (PERUCCA; TOMSON, 2011; FERNANDES, 2013). O paciente pode ser considerado refratário após dois anticonvulsivantes falharem no tratamento das crises convulsivas (LE *et al.*, 2021).

Outros tratamentos com anti-inflamatórios, corticoides e imunoglobulinas foram testados e apresentaram resultados variáveis, como no caso do estudo de Brunson *et al.* (2001), que avaliou o tratamento por corticotrofina (ACTH), e este mostrou-se protetor, pois inativou hormônios que são indutores da epilepsia. Porém, no estudo de Verhelst *et al.* (2005), foi demonstrado que o tratamento com corticoides e imunoglobulinas não foi eficaz no controle de crises convulsivas em crianças com resistência ao tratamento medicamentoso, além de não demonstrar ser seguro (VEZZANI *et al.*, 2011).

A compreensão dos mecanismos envolvidos na refratariedade do tratamento é primordial para o desenvolvimento de alternativas terapêuticas para a melhora da qualidade de vida dos pacientes. Existem diversas hipóteses para a refratariedade, como as hipóteses dos transportadores de membrana, farmacocinética, variação genética, vias neurais e a do alvo farmacológico (Figura 1). Porém, é importante salientar que esses mecanismos não ocorrem de maneira individual, ou seja, pode coexistir mais de uma hipótese/condição em um mesmo paciente (TANG, HARTZ, BAUER, 2017; JANMOHAMED, BRODIE, KWAN, 2019; LÖSCHER *et al.*, 2020; LUKAWSKI, CZUCZWARB, 2021).

Figura 1 - Hipóteses dos mecanismos da epilepsia refratária.



Fonte: adaptado de TANG; HARTZ; BAUER, 2017.

A hipótese farmacocinética propõe que ocorre superexpressão de transportadores de efluxo em órgãos periféricos como: intestino, fígado e rins, diminuindo a concentração plasmática de anticonvulsivantes, reduzindo a quantidade de fármaco disponível para atravessar a barreira hematoencefálica e realizar a atividade farmacológica. Essa superexpressão dos transportadores de efluxo também ocorre na barreira hematoencefálica, reduzindo a entrada dos anticonvulsivantes no SNC (LAZAROWSKI *et al.*, 2007; JANMOHAMED, BRODIE, KWAN, 2019).

A hipótese das vias neurais propõe que as crises convulsivas ocasionam uma degeneração nos neurônios, com um consequente rearranjo das sinapses, prejudicando o acesso dos fármacos ao alvo farmacológico, e a formação de ligações neuronais excitatórias (FANG *et al.*, 2011). A hipótese da variação

genética associa a mutação de genes à alterações na farmacocinética e farmacodinâmica que levam à farmacoresistência (SCHMIDT; LOSCHER, 2011; LUKAWSKI, CZUCZWARB, 2021). Muitas destas mutações ocorrem em genes responsáveis pelas subunidades de canais iônicos, causando hiperexcitabilidade, ou redução nos mecanismos inibitórios, causando a recorrência das crises convulsivas. Por isso, o diagnóstico genético da epilepsia pode auxiliar os pacientes a terem um tratamento personalizado, melhorando o tratamento (ORSINI; ZARA; STRIANO, 2018).

A hipótese do alvo farmacológico sugere que ocorram alterações nos canais iônicos e receptores de neurotransmissores que resultam em uma menor sensibilidade do fármaco pelo sítio de ação, levando a refratariedade (REMY, BECK, 2006; LÖSCHER *et al.*, 2020).

Por fim, a hipótese do transportador é a causa mais aceita atualmente, em que a superexpressão da glicoproteína-P na barreira hematoencefálica reduz a entrada dos anticonvulsivantes ao SNC, levando à refratariedade ao tratamento da epilepsia, à medida que os fármacos utilizados sejam substratos da P-gp (KWAN; BRODIE, 2005; ZAVALA-TECUAPETLA *et al.*, 2019). Ressalta-se que os medicamentos utilizados no tratamento para epilepsia são substratos destes transportadores, e alguns são até mesmo indutores desses transportadores (ILAE, 2017; REMY *et al.*, 2003). Os estudos genéticos têm sido realizados para auxiliar no entendimento da causa da refratariedade. Alguns estudos demonstraram a correlação entre variações no gene ABCB1 (gene responsável pela expressão da P-gp) com a refratariedade ao tratamento: porém, essa relação ainda não está bem definida (LI; LIU; WANG, 2015; BALESTRINI; SISODIYA, 2018; LE *et al.*, 2021).

Outra teoria estudada recentemente sobre a farmacoresistência correlaciona o aumento da expressão da P-gp a efeitos inflamatórios, uma vez que o glutamato liberado durante as crises convulsivas é capaz de ativar a via da COX-2, que leva a uma superexpressão da P-gp (ENRIQUE, *et al.*, 2019).

A ineficácia de alguns fármacos no tratamento acaba causando dificuldades em funções psicossociais do paciente, trazendo restrições ao estilo de vida, baixo desempenho acadêmico e declínio na autoestima, além de apresentar uma maior mortalidade (STEPIEN *et al.*, 2012).

Uma alternativa para os pacientes refratários é a remoção cirúrgica do

foco epiléptico. A remoção cirúrgica pode fazer com que os pacientes fiquem livres de crises convulsivas, sendo que aproximadamente 60% não voltam a apresentar quadros convulsivos, enquanto os pacientes tratados com medicamento, apenas 10% não voltam a apresentar o quadro no período de 1 ano (ENGEL *et al.*, 2003).

2.2 MODELOS EXPERIMENTAIS DE INDUÇÃO DE EPILEPSIA EM RATOS

A epilepsia é uma patologia complexa e de difícil análise, uma vez que estudos em humanos são limitados. Devido à dificuldade destes estudos serem realizados em humanos, foram desenvolvidos modelos animais para o estudo da epilepsia. Esses modelos animais simulam sintomas, alterações bioquímicas e fisiológicas que acometem os pacientes com epilepsia. Os modelos experimentais também são úteis para a realização de testes com novos candidatos a fármacos anticonvulsivantes, para avaliar sua segurança e eficácia em estágios pré-clínicos (KANDATRAVICIUS *et al.*, 2014).

Um dos modelos animais capazes de induzir o *status epilepticus* em roedores, utilizam os quimioconvulsivantes pilocarpina ou ácido caínico. Estes modelos produziram lesões no hipocampo, que são semelhantes às que ocorrem em humanos com epilepsia do lobo temporal (ELT). O ácido caínico é um análogo do L-glutamato é um agonista dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos: quando administrado sistemicamente, ou via intracerebral, causa despolarização neuronal e, conseqüentemente, o desenvolvimento de crises convulsivas (BEN-ARI *et al.*, 1979). Observou-se que a administração intracerebral do ácido caínico causou menor mortalidade em ratos, quando comparada à administração sistêmica; este modelo é de difícil execução na prática. Notou-se também que, ao se administrar 9mg/kg de ácido caínico aos ratos, dentre os sobreviventes, cerca de 93% deles desenvolveram *status epilepticus* e destes, 80% desenvolveram crises espontâneas (TAUCK, NADLER, 1985; HELLIER *et al.*, 1998; SHARMA *et al.*, 2007). A pilocarpina, utilizada para indução de epilepsia em ratos e camundongos, é um agonista dos

receptores muscarínicos. A administração de pilorcapina ativa receptores muscarínicos, inicialmente, mas a propagação/manutenção da crise é causada pelo desequilíbrio de neurotransmissores excitatórios e inibitórios do SNC, incluindo glutamato e GABA, respectivamente (TURSKI *et al.*, 1984; CAVALHEIRO, 1995). Este processo de indução da epilepsia com a pilocarpina culmina em alterações histopatológicas no cérebro, principalmente no neocórtex, que mimetizam as características histopatológicas de humanos que possuem a patologia (TURSKI *et al.*, 1984; CAVALHEIRO, 1995). Tanto o ácido caínico, quanto a pilorcapina apresentam como desvantagem a alta mortalidade em animais, que pode ser reduzida com: redução da dose, redução de intervalos e/ou administração por via intracerebral (TURSKI *et al.*, 1984; HELLIER *et al.*, 1998; SHARMA *et al.*, 2007, CASTRO *et al.*, 2011). Estes modelos de indução por quimioconvulsivantes se mostraram bem eficazes para avaliação de fármacos anticonvulsivantes, como benzodiazepínicos e barbitúricos durante o *status epilepticus*. (LEITE, GARCIA-CAIRASCO, CAVALHEIRO, 2002). Enrique *et al.* (2017), desenvolveram um modelo animal de epilepsia farmacoresistente, por meio da administração de ácido mercaptopropiônico durante 23 dias consecutivos em camundongos. Nesse modelo foi observado o aumento da expressão da P-gp na barreira hematoencefálica, principalmente ao redor de vasos sanguíneos.

A estimulação elétrica é um modelo de indução de epilepsia em animais que possui a vantagem de apresentar uma baixa mortalidade e alta reprodutibilidade da indução, além de possuir uma fácil aplicação no caso da indução de epilepsia aguda, quando comparado aos quimioconvulsivantes, porém esta metodologia é trabalhosa e de alto custo para o estudo da epilepsia crônica (KANDATRAVICIUS *et al.*, 2014). Dentre os modelos por estimulação elétrica, está a indução por eletrochoque, que consiste na utilização de eletrodos, que são introduzidos no rato (orelha ou intracerebral, por exemplo), e produzem uma descarga elétrica capaz de desencadear a crise. Foi demonstrado que a colocação dos eletrodos nas orelhas dos ratos produz melhores resultados (BROWNING, NELSON, 1985). Outro modelo elétrico de indução de epilepsia é o *kindling* ou abrasamento, que se refere a um fenômeno de estimulação de crise por repetidas estimulações elétricas em uma região do cérebro, sendo este o modelo de estimulação elétrica mais utilizado atualmente (RACINE, ROSE,

BURNHAN, 1977; PINEL, ROVNER, 1978; SLOVITER *et al.*, 2007). Os danos causados pela crise epiléptica podem ser ocasionados por morte celular e danos aos neurônios e sinapses, podendo causar além da atrofia, um quadro de epilepsia intratável. Portanto o progresso da doença pode causar a deterioração intelectual (AVANZINI *et al.*, 2013).

Ainda, existe o modelo por injúria/trauma de indução de epilepsia; neste, os animais são submetidos a situações como: impacto traumático no cérebro, hipóxia, hipertermia, AVC, neurocisticercose, dentre outros. Após esta exposição, o animal desenvolve crises convulsivas. É o modelo menos utilizado atualmente (SIMONATO *et al.*, 2017).

Além dos modelos citados acima, outro modelo experimental bem descrito na literatura é formado por cepas geneticamente susceptíveis a epilepsia, ou seja, que possuem *background* genético para desenvolvimento da epilepsia, quando ativado por um estímulo, que na maioria das vezes são estímulos sonoros, feitos por som de alta intensidade (120dB e 60Hz). Inicialmente, a indução das crises audiogênicas leva à crises do tipo tônico-clônicas, com origem no tronco encefálico. O som de alta intensidade passa de estímulo mecânico a estímulo elétrico nas células cocleares; o estímulo elétrico chega ao colículo inferior, onde a crise é iniciada, culminando na ativação do tronco encefálico. Quando esses estímulos sonoros são feitos de forma repetida também se configura o *kindling* audiogênico. As crises deixam de apresentar características mesencefálicas, devido ao recrutamento de áreas límbicas, como hipocampo e amígdala e, assim, os animais passam a ter crises típicas da ELT (MORAES, GALVIS-ALONSO, GARCIA-CAIRASCO, 2000; DORETTO *et al.*, 2003; GALVIS-ALONSO, OLIVEIRA, GARCIA-CAIRASCO, 2004). Estudos com esse modelo tem aumentado nos últimos tempos, já que as alterações moleculares ocorrem desde seu nascimento e, portanto, são susceptíveis ao desenvolvimento da epilepsia. A limitação deste grupo é a necessidade de um gatilho para ativar as crises, pois não ocorrem crises espontâneas. Por outro lado, a vantagem é que esse estímulo pode ser sonoro, e neste grupo são facilmente avaliadas alterações comportamentais, celulares, moleculares, hormonais e metabólicas. No Brasil, este modelo de animais com susceptibilidade ao desenvolvimento da epilepsia foi criado pelo grupo do Prof. Dr. Norberto García-Cairasco e denomina-se a *Wistar Audiogenic Rats* (WARs)

(DORETTO *et al.*, 2003; ROMCY-PEREIRA, GARCIA-CAIRASCO, 2003; UMEOKA *et al.*, 2011).

2.3 TRANSPORTADORES

Dentre os transportadores de influxo está o polipeptídeo transportador de ânions orgânicos (OATP); este é subdividido em 11 membros da família e localizam-se nos mais variados tecidos, como rins, fígado, intestino e barreira hematoencefálica.

Os OATP apresentam grande importância na absorção intestinal, no metabolismo e *clearance* hepático (pela entrada e saída dos hepatócitos), na distribuição para tecidos e na excreção renal. Os transportadores irão determinar o efeito farmacológico ou tóxico das substâncias, pela entrada do fármaco no tecido e caso ocorra seu acúmulo no organismo (GIACOMINI; SUGIYAMA, 2010).

Outros transportadores de influxo são o transportador de cátions orgânicos (OCT) e o transportador de ânions orgânicos (OAT). O OCT é dividido em OCT 1 OCT 2 e OCT 3, sendo que os OCT 1 e 2 estão mais expressos em órgãos excretores (fígado e rins, respectivamente), o OCT 3 está mais presente no epitélio intestinal, além de fígado e rins. Os substratos dos OCT são os cátions, porém os substratos destes e dos OATP são bem semelhantes e sobrepõem-se aos outros. Os OATs são divididos em OAT 1, OAT 2, OAT 3 e OAT 4. O OAT 1 é mais expresso nos rins, OAT 2 no fígado, OAT 3 e 4 no fígado e rins. Eles apresentam como substratos as moléculas aniônicas (GIACOMINI *et al.*, 2010).

Dentre os transportadores de efluxo, está a glicoproteína-P (P-gp), inicialmente descoberta na década de 1970 quando se observou a resistência ao tratamento ao câncer (JULIANO; LING, 1976). Esta é uma proteína transmembrana de 170 kDa, codificada pelos genes MDR1 e MDR2 (*multi-drug resistance*). Para seu funcionamento, utiliza o ATP como fonte de energia, fazendo a expulsão das moléculas contra gradiente de concentração (o fármaco

se liga ao sítio ativo da P-gp, na sequência o ATP se liga a enzima, onde é clivado pela ATPase e isso promove a mudança conformacional da enzima, e liberação da substância na parte extracelular). A P-gp está presente no fígado, intestino, rins, barreira hematoencefálica e placenta. Devido à sua função de efluxo e, por estar presente em várias partes do organismo, a P-gp faz um papel protetor do organismo, promovendo a excreção de fármacos na urina, bile e trato gastrointestinal, também diminuindo a absorção, além de impedir o acesso a compartimentos como o sistema nervoso central, protegendo-o da entrada de substâncias diversas (ALLER *et al.*, 2009; O'BRIEN *et al.*, 2012).

Os fármacos administrados por vias extra ou intravasculares passam por vários mecanismos de transporte dentro do organismo, desde a absorção (quando em via extracelular) até a eliminação. Alguns dos responsáveis por estes movimentos são os transportadores, que são proteínas presentes em membranas celulares e realizam o transporte de substâncias, sendo estes divididos em transportadores de influxo (levam as substâncias para dentro das células) e transportadores de efluxo (expulsam as substâncias para fora das células), sendo então importantes em processos de absorção, distribuição e eliminação de diversos fármacos. Por estarem presentes em vários órgãos e tecidos do corpo humano, como intestino delgado, fígado e rins, estes podem alterar a biodisponibilidade dos fármacos. Ainda, estão presentes em outros locais, como a barreira hematoencefálica e placenta, onde desempenham função protetora, controlando o acesso das substâncias e toxicantes ao SNC e ao feto, respectivamente (KÖNIG; MÜLLER; FROMM, 2013).

No fígado, alguns transportadores desempenham o papel de carregar as substâncias para dentro do hepatócito, para que possam ser metabolizadas e auxiliam na secreção para a bile, enquanto nos rins auxiliam na secreção das substâncias à favor da eliminação, para a urina em formação. Nestes transportadores podem ocorrer interações, como por exemplo, competição entre dois fármacos pelo transportador e interações entre fármacos e alimentos. Estas interações podem causar a inibição do transportador e impedir que um fármaco, que é substrato do transportador, adentre na célula via transportador (influxo), ou que seja expulso pelo transportador (efluxo). Também pode ocorrer a indução da atividade do transportador que conseqüentemente aumentará a absorção (influxo) ou a excreção (efluxo) (MÜLLER; FROMM, 2011). Dresser *et al.* (2002),

avaliaram que o suco de toranja (*grapefruit*) é capaz de causar a inibição de transportadores no intestino, como a P-gp, resultando em aumento da biodisponibilidade oral da fexofenadina.

A farmacologia clínica durante muitos anos focou em metabolismo de fase I e fase II para prever a eliminação de xenobióticos e variabilidade na resposta. Entretanto, recentemente passou a reconhecer que a disposição cinética de fármacos é também dependente da expressão e atividade de proteínas transportadoras de fármacos nas células (DE MORAES; LAURETTI; LANCHOTE, 2014).

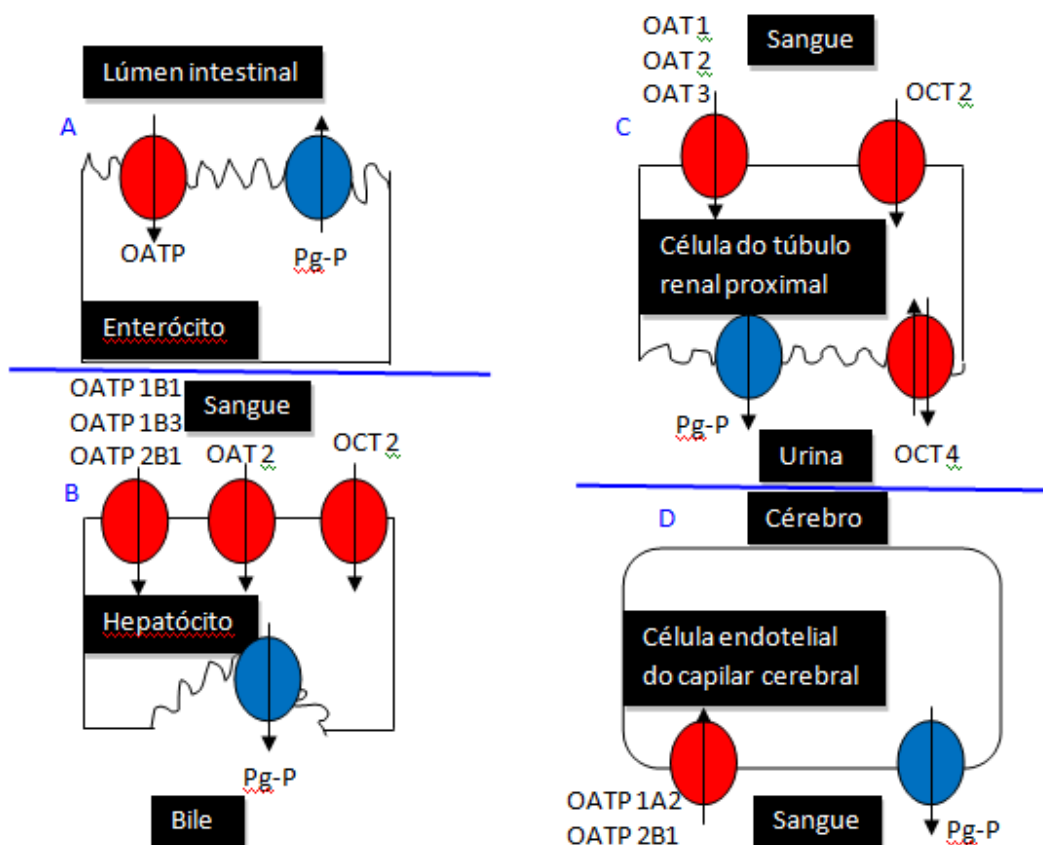
Diversas substâncias são substratos da P-gp, e, algumas ainda podem ser inibidores ou indutores da atividade do transportador. Quando ocorre a inibição da P-gp no intestino e rins (a inibição pode ser competitiva no sítio ou impedindo a hidrólise do ATP), esta deixa de atuar na proteção do organismo em eliminar o fármaco (xenobiótico) e assim pode ser observado aumento em concentrações plasmáticas de substâncias por ela transportadas. Uma maior concentração plasmática pode causar toxicidade ao indivíduo; já quando ocorre a indução, haverá aumento em sua expressão e/ou atividade. Caso a indução ocorra em intestino e rins, haverá diminuição da concentração plasmática da substância. A P-gp pode causar a resistência ao tratamento medicamentoso, pois se houver aumento da expressão da P-gp na barreira hematoencefálica a biodisponibilidade será aumentada, porém o acesso ao SNC estará diminuído, impedindo o sucesso farmacológico. Os próprios antiepilépticos podem causar aumento na expressão da P-gp, mas isso ainda não está completamente elucidado (STEPIEN *et al.*, 2012, LUND; PETERSEN; DALHOFF, 2017).

A expressão da P-gp também pode estar alterada em algumas patologias, como câncer, em que a expressão de P-gp é aumentada e com isso o tratamento não é satisfatório, pois há a resistência ao tratamento (GOTTESMAN; FOJO; BATES, 2002).

Em tecidos do SNC de pacientes epiléticos submetidos à cirurgia, foi observado aumento da expressão de P-gp em comparação a indivíduos saudáveis, além de maior expressão da P-gp na barreira hematoencefálica em pacientes epiléticos (ZHANG *et al.*, 2012).

Abaixo, na Figura 2, estão representados alguns transportadores em variados tecidos do organismo humano.

Figura 2 – Os transportadores atuando nos tecidos do organismo humano. Em A sua atividade no intestino, em B sua atividade no fígado, em C sua atividade nos rins e em D sua atividade na barreira hematoencefálica.



Fonte: Adaptado de KÖNIG; MÜLLER; FROMM, 2013.

Greiner (1999) demonstraram que a biodisponibilidade de digoxina estava diminuída quando esta foi administrada juntamente com a rifampicina. Isto se deu pelo aumento da expressão de P-gp, comprovado por técnicas de imunistoquímica e *western blotting*, uma vez que a rifampicina é indutora da P-gp e aumentou sua expressão no epitélio intestinal, e com isso a digoxina sofreu de forma pronunciada os efeitos de efluxo desta proteína, já que é substrato da P-gp.

Lazarowski *et al.* (2004a), notaram um aumento da expressão da P-gp cerebral após a indução da epilepsia com ácido mercaptopropiônico (MP) em ratos. Seus achados indicam que as crises epiléticas causam liberação de

transmissores, que ativam o gene responsável pela expressão de P-gp (MDR-1), e isto causou hiperexpressão da proteína, levando a casos de refratariedade no tratamento.

Potschka e Löscher (2001a) demonstraram diminuição no efeito da fenitoína em controlar as crises convulsivas em ratos submetidos ao *kindling* elétrico, devido ao aumento da expressão da P-gp na barreira hematoencefálica.

A P-gp está mais expressa na barreira hematoencefálica, principalmente no endotélio cerebrovascular, onde desempenha a função protetora da barreira hematoencefálica. Kwan e Brodie, (2002) demonstraram que a estimulação audiogênica em ratos com *background* genético (GEPRs - *genetically epilepsy-prone rats*) aumentou a expressão da P-gp em regiões cerebrais como o córtex e o hipocampo. Devido a estes achados, faz-se necessário avaliar se estas alterações também ocorrem em cepas, como os WARs, para se chegar a uma conclusão sobre o aumento de expressão da P-gp desempenhar a resistência ao tratamento na epilepsia.

Elkhatat *et al.* (2017), demonstraram o aumento da expressão de P-gp em crianças com resistência ao tratamento da epilepsia, em comparação com àquelas que respondiam ao tratamento. Porém, quando realizaram um estudo que utilizaram verapamil como inibidor da P-gp para estas crianças com resistência, e compararam com outro grupo que recebeu placebo, não se obteve diferença nas crises relatadas em ambos os grupos.

Hartz *et al.* (2017), realizaram estudos induzindo a epilepsia com pilocarpina; foram isolados vasos sanguíneos dos animais e também compararam com tecido cerebral humano. O primeiro achado foi de que o glutamato induz o aumento da expressão de P-gp, quando exposto à pilocarpina. Outro achado, foi que o *status epilepticus* induzido por pilocarpina também induziu o aumento da expressão de P-gp. Por fim, concluíram que este aumento da expressão da P-gp na barreira hematoencefálica em modelos experimentais são comparáveis aos achados em tecidos humanos, correlacionando estes à possível causa da refratariedade.

Lazarowski *et al.* (2006), demonstraram o aumento da P-gp também nos órgãos excretórios, em casos de epilepsia refratária, e não apenas na barreira hematoencefálica. Para isso, foi utilizado ^{99m}Tc-MIBI, uma substância marcadora da atividade de efluxo da P-gp que não é metabolizada, e que pode ser

observado por cintilografia. Foi observado um aumento da concentração desta substância marcadora de P-gp em órgãos como fígado e rins.

Enrique *et al.* (2017), em modelo animal de epilepsia resistente ao tratamento, criado pela administração de ácido mercaptopropiônico, observaram o aumento da expressão da P-gp na barreira hematoencefálica, principalmente ao redor de vasos sanguíneos. No estudo também foi avaliado o efeito dos anticonvulsivantes fenitoína, fenobarbital e carbamazepina; houve resistência ao tratamento farmacológico com a fenitoína e o fenobarbital. Uma vez que a fenitoína e o fenobarbital são substratos da P-gp, foi avaliado o seu uso juntamente com um inibidor da P-gp, a nimodipina. A associação com o inibidor da P-gp conseguiu reduzir parcialmente a resistência ao fenobarbital e completamente a resistência à fenitoína. Já a carbamazepina, como não é um substrato da P-gp, mostrou-se efetiva durante todo o experimento, não apresentando resistência (ENRIQUE, *et al.*, 2017).

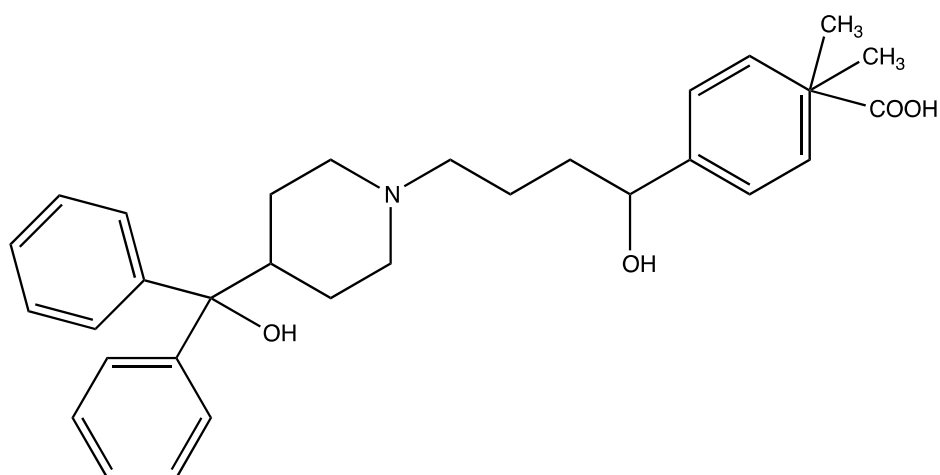
Enrique *et al.* (2019), avaliaram o uso de anti-inflamatórios associados aos anticonvulsivantes, como alternativa terapêutica para a refratariedade do tratamento. Como resultado, eles observaram que o uso do anti-inflamatório levou à diminuição na expressão da P-gp, sendo que os níveis deste transportador ficaram menores do que em animais sem epilepsia. Além disso, o efeito anticonvulsivante da fenitoína foi aumentado em comparação ao grupo que não recebeu o anti-inflamatório; dentre os anti-inflamatórios avaliados, aquele que mais se destacou foi o ácido sebácico (ENRIQUE, *et al.*, 2019).

2.4 FEXOFENADINA

A fexofenadina (Figura 3) é um fármaco anti-histamínico, que age como antagonista dos receptores H₁, ligando-se ao receptor e o inativando, diminuindo assim o número de receptores aos quais a histamina pode se ligar. Sua molécula apresenta propriedades zwitteriônicas, apresentando as conformações R e S, com as duas formas ativas; e é comercializada na forma de racemato. Apresenta dois pKa's: 4,25 e 9,53. É minimamente metabolizada pelo fígado, não sendo

encontrado nenhum metabólito. Ainda, apresenta rápida absorção, atingindo C_{max} (Concentração Plasmática Máxima) entre 1 a 3 horas em humanos; se liga entre 60 - 70% às proteínas plasmáticas (MING; KNIGHT; THAKKER, 2011).

Figura 3 – Estrutura molecular de fexofenadina.



Fonte: Do autor.

A terfenadina é metabolizada à fexofenadina. O FDA (*Food and Drug Administration*) determinou a substituição da terfenadina pela fexofenadina, pois esta possui menos efeitos adversos que seu precursor, uma vez que quando a terfenadina é administrada juntamente com algum inibidor do citocromo P450 (exemplo eritromicina e cetoconazol), ocorre acúmulo da terfenadina no organismo e aparecimento de efeitos cardiotoxicos como arritmias (FERREIRA *et al.*, 2009).

A substância apresenta excreção majoritariamente na forma inalterada, sendo apenas 5% metabolizada: predomina a excreção nas fezes (80%), 10% na urina e 5% em outras vias. A meia-vida, após múltiplas doses, é de 11-16 horas em humanos. Em idosos, o C_{max} e a área sob a curva ($AUC^{0-\infty}$) são aumentados (CHEN; HSU, 2014).

A fexofenadina é considerada um fármaco marcador da atividade *in vivo* da P-gp. Cvetkovic *et al.* (1999), demonstraram que, além da P-gp, a fexofenadina também é substrato do OATP. Portanto, a fexofenadina têm sua disposição cinética influenciada pelo OATP, que é transportador de influxo, e pela

P-gp, que é de efluxo.

Estudos demonstram que quando a atividade de P-gp está reduzida, devido à ação de inibidores do transportador como verapamil, ciclosporina e quinidina, ocorre a diminuição do efluxo da fexofenadina pelo transportador, ocasionando o aumento da absorção e consequentemente da concentração plasmática. Porém, quando a atividade do transportador está aumentada, por ação de indutores como clotrimazol, isosafrol, midazolam, fenobarbital, rifampicina, carbamazepina, entre outros, a absorção da fexofenadina é diminuída, pois o transportador promove maior efluxo de fexofenadina para o lúmen intestinal, e assim, sua absorção e concentração plasmática diminuem (SMITH; GUMS, 2009).

2.5 FÁRMACOS ANTIEPILEPTICOS

2.5.1 Carbamazepina

A carbamazepina é um antidepressivo tricíclico, sendo um dos antiepilepticos mais consumidos no mundo. Seu mecanismo de ação se dá por meio da estabilização da membrana hiperexcitada neuronal, impedindo a propagação do potencial de ação excitatórios. Esta estabilização se dá por meio do bloqueio de canais iônicos de sódio. A carbamazepina é lentamente absorvida, atingindo o $C_{máx}$ entre 4 - 8 horas em humanos, é metabolizada pelo citocromo P450, sendo eliminada principalmente em sua forma biotransformada (RITTER *et al.*, 2020). Um dos metabólitos é a carbamazepina epóxido, que é um metabólito que apresenta atividade. A carbamazepina é indutora de enzimas metabolizadoras, em especial CYP 3A4 e também pode induzir aumento da expressão da P-gp (DARWEESH, KHAMIS, EL-ELIMAT, 2020).

Em estudo com crianças que apresentavam epilepsia refratária, analisou-se o sangue destes indivíduos por 25 dias, e, em 33% das análises foi encontrado nível subterapêutico em pacientes que foram submetidos ao

tratamento com carbamazepina. Isto pode ter ocorrido pelo aumento da expressão da P-gp na barreira hematoencefálica e pelo aumento da excreção em órgãos como o fígado (onde a P-gp também atua excretando as substâncias para a bile), com possível aumento da atividade de CYP3A4; estes dois efeitos ocasionaram um aumento na detoxificação, resultando concentrações reduzidas do fármaco na circulação (LAZAROWSKI *et al.*, 2004b).

Graumlich *et al.*, (1999) demonstraram que a farmacocinética da carbamazepina alterou-se em ratos do tipo GEPR. A meia-vida apresentou redução quando comparada ao grupo controle. Os autores não conseguiram uma explicação para tal achado, mas provavelmente o fato da P-gp impedir o acesso do fármaco ao SNC fez com que o medicamento fosse mais metabolizado e excretado, e desta forma reduziu-se o AUC.

2.5.2 Fenitoína

O mecanismo de ação de fenitoína não é completamente elucidado, mas sabe-se que ela possui ação sobre a condutância dos canais iônicos, inibição dos canais de cálcio, elevação do potencial de membrana e aumento dos níveis de GABA. Sua farmacocinética é não linear, e sua metabolização a converte em forma hidroxilada, favorecendo sua eliminação (DELLA PASCHOA *et al.*, 1997).

Em um estudo sobre crianças que apresentavam epilepsia refratária, ao analisar o sangue dos pacientes que utilizaram fenitoína, em 40% das análises foi encontrado nível subterapêutico da mesma. A causa disso foi relacionada ao aumento da expressão de P-gp na barreira hematoencefálica e aumento do CYP3A4 (LAZAROWSKI *et al.*, 2004b).

2.5.3 Fenobarbital

O fenobarbital é anticonvulsivante, hipnótico e sedativo, utilizado por

pacientes para o tratamento de crises convulsivas. Seu mecanismo de ação é semelhante aos benzodiazepínicos, ou seja, aumenta a atividade do neurotransmissor GABA, estabilizando a membrana neuronal (RITTER *et al.*, 2020) e aumentando a duração média do canal aberto devido aumento do influxo do íon Cl⁻, isto leva à hiperpolarização da membrana celular do neurônio pós-sináptico. Assim, é possível impedir a transmissão da atividade epilética (PASTORE, OFUCHI, NISHIYAMA, 2007).

Esse fármaco é altamente lipossolúvel e por isso é distribuído para todo o organismo, principalmente o SNC. Cerca de 80% da sua dose é absorvida pelo trato gastrointestinal; posteriormente é metabolizado no fígado e excretado pelos rins na sua forma inalterada. Sua meia-vida plasmática é de 40 - 70 horas para crianças e de 50 - 140 horas em adultos, sendo que para pacientes idosos ou com insuficiências renal ou hepática esses valores podem ser exacerbados. A longa meia-vida do fármaco garante, primeiramente, a administração de apenas uma dose ao dia, além de proteger contra possíveis crises de abstinência, caso a ingestão seja interrompida (KWAN, BRODIE, 2004; TEIXEIRA-DA-SILVA *et al.*, 2020).

3 JUSTIFICATIVA

A epilepsia é uma patologia com incidência mundial, mas de maior prevalência em países em desenvolvimento. Cerca de cinquenta milhões de pessoas no mundo estão acometidas por esta patologia. Pacientes que possuem epilepsia, em alguns casos, não apresentam respostas ao tratamento e são denominados pacientes refratários. Uma possível causa para esta resistência ao tratamento são os transportadores, como por exemplo, a glicoproteína P (P-gp). A P-gp é um transportador de efluxo que está presente principalmente na barreira hematoencefálica; uma vez que fármacos antiepilépticos são substratos da P-gp, isto pode ocasionar alterações farmacocinéticas, ou concentrações subterapêuticas no local de ação. Por este motivo, utilizando-se animais controle e animais epiléticos, foi realizada a avaliação farmacocinética com o uso concomitante de inibidores da P-gp na farmacocinética da fexofenadina (fármaco marcador da atividade da P-gp) e, posteriormente, o efeito da inibição da P-gp foi avaliado para farmacocinética de anticonvulsivantes, utilizados para tratamento da epilepsia, com o intuito de se verificar a influência da atividade P-gp sobre os mesmos. É esperado que devido ao aumento da expressão da P-gp na barreira hematoencefálica, aconteça represamento do fármaco no sangue periférico dos animais epiléticos. Com a administração do inibidor, espera-se que ocorra alteração nos parâmetros farmacocinéticos.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a farmacocinética de fármacos antiepilépticos em ratos sadios e em modelo experimental de epilepsia, com o intuito de analisar a relação entre a atividade da P-gp e a farmacocinética dos antiepilépticos.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliação da farmacocinética nos grupos controle e epiléptico induzido por pilocarpina, e associação com o inibidor da P-gp para os fármacos:

- a) Fexofenadina;
- b) Carbamazepina;
- c) Fenobarbital;
- d) Fenitoína.

5 METODOLOGIA

5.1 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

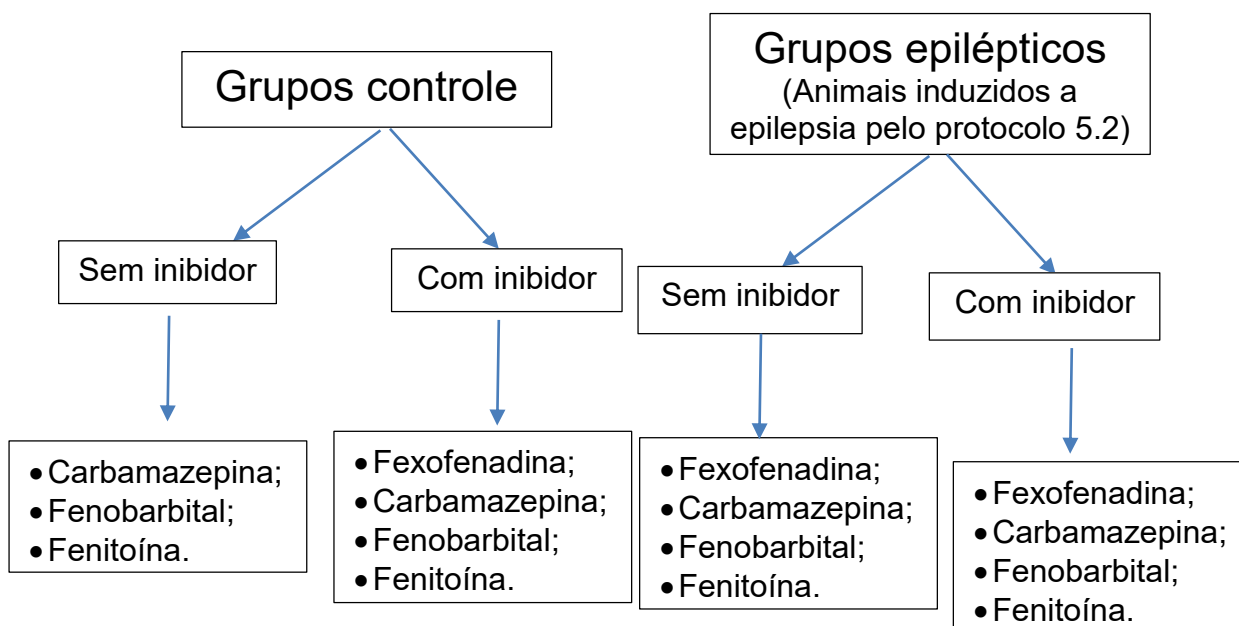
Foram utilizados animais da raça *Wistar*, obtidos do Biotério Central da UNIFAL-MG. O tamanho amostral foi de 8 (n=8) para cada grupo avaliado). O modelo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal da UNIFAL/MG, pelo Protocolo nº 32/2017 (Anexo I).

Inicialmente os animais foram submetidos ao protocolo de indução de *Status Epilepticus* (SE) por pilocarpina. Após 7 dias da indução, os animais passaram por um procedimento cirúrgico de canulação, para inserção de uma cânula em veia jugular no animal para realização de colheitas de sangue nos intervalos propostos.

Após o procedimento, o animal permaneceu em recuperação até o dia seguinte, quando então foram administrados os fármacos e realizadas as colheitas nos tempos propostos. Pelas cânulas foram coletados aproximadamente 500 µL de sangue; este mesmo volume foi repostado com salina, para evitar alteração da volemia e conseqüentemente da concentração sanguínea.

Os grupos foram subdivididos conforme ilustrado na Figura 4.

Figura 4 – Estratificação dos grupos experimentais para cada fármaco analisado (n=8 por grupo). O inibidor da P-gp utilizado foi o verapamil.



Fonte: Do autor.

5.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL DE INDUÇÃO DE EPILEPSIA EM RATOS

Os animais foram pesados no dia do experimento, e aqueles que estavam com peso entre 150-200g foram utilizados, pois os animais jovens exibem maior suscetibilidade à indução de crises, exigindo doses menores, além de ter uma maior taxa de sobrevivência comparado aos animais adultos (LEITE *et al.*, 1996). Os animais receberam a injeção de brometo de metil-escopolamina intraperitoneal (i.p. 20mg/kg) com o objetivo de diminuir os efeitos colaterais periféricos da pilocarpina. Após um intervalo de 30 minutos, a pilocarpina (i.p. 280mg/kg) foi administrada aos animais do grupo epiléptico, enquanto que para os animais controle foi administrada salina em volumes similares ao grupo pilocarpina. A dose de pilocarpina foi otimizada para se obter maior razão de sobrevivência dos animais, visto que a dose descrita na literatura, de 320mg/kg, associou-se à grande mortalidade (cerca de 75%), então a dose foi reduzida para

280mg/kg, dose essa que induziu os animais ao SE e apresentou taxa de mortalidade de 30%. Após o início das crises convulsivas, que foram identificadas pelo movimento das orelhas e mastigação involuntários, observou-se a evolução do SE de acordo com os parâmetros de Pinel e Rovner, (1978) (Tabela 1). Os animais foram mantidos em SE por 90 minutos (tempo mínimo para que ocorra a epileptogênese (TURSKI *et al.*, 1984; CAVALHEIRO, 1995), sendo que a cada 15 minutos foi administrado 0,5mL de soro fisiológico glicosado por gavagem para reposição de líquidos. Após 90 minutos, todos os animais (controle e pilocarpina) foram submetidos à administração de diazepam (i.p 5 mg/kg) para controle das crises (Tabela 2).

Tabela 1 - Gravidade da crise límbica ou crises que mimetizam a epilepsia do lobo temporal.

Gravidade da crise	Comportamento
00	Imobilidade
01	Automatismo facial
02	Mioclonias de cabeça e pescoço
03	Comportamentos anteriores e clonias de patas anteriores
04	Comportamentos anteriores e elevação sobre as patas posteriores
05	Comportamentos anteriores e elevação e queda
06	Elevação e queda (≥ 3 vezes)
07	Comportamentos anteriores + corrida
08	Comportamentos anteriores + corrida = convulsão tônica-clônica

Fonte: adaptado de Pinel e Rovner, 1978.

Tabela 2 - Fármacos utilizados para o protocolo de indução da epilepsia, ação e tempo de administração.

Fármaco	Ação	Tempo
Brometo de metil-escopolamina (20mg/kg)	Antagonista muscarínico periférico	30 minutos
Pilocarpina (280 mg/kg)	Agonista muscarínico (agente epileptomimético)	90 minutos a partir do início do <i>SE</i>
Diazepam (5 mg/kg)	Inibidor de GABA (cessar a crise)	após 90 minutos do início do <i>SE</i>

Fonte: Do autor.

Os animais permaneceram por 7 dias em recuperação (com reposição de líquido e nutrientes) após a indução do SE para recuperação total, e então foram submetidos ao procedimento de canulação da veia jugular.

5.3 PROTOCOLO DE CANULAÇÃO DA VEIA JUGULAR

Para isso, animal foi pesado e em seguida foi anestesiado com cloridrato de cetamina (0,1mg/kg) e cloridrato de xilazina (0,05mg/kg), conforme protocolo da UFSCAR, 2015. Após a sedação iniciou-se o procedimento cirúrgico de canulação da veia jugular (HARMS; OJEDA, 1974).

O animal foi fixado em uma plataforma com seu abdômen para cima e braços abertos para facilitar a cirurgia. Então foi feita uma pequena incisão na região da clavícula do rato, onde a veia jugular se encontra pulsante logo abaixo do músculo do animal. Em seguida, foi feita a perfuração da veia com auxílio de uma agulha, e esta saiu pelo músculo onde foi fixada a cânula. Então, retirou-se a agulha da extremidade da cânula e com o auxílio de pinças movimentou-se a cânula para que ela ficasse no interior da veia e o sangue fluísse por ela. A cânula foi presa no músculo através de um ponto, para que ela ficasse fixada e não

saísse da luz da veia. A outra extremidade da cânula foi passada, com a ajuda de um trocáter, pela pele do rato para que saísse no dorso do mesmo. Foram feitas suturas para fechar a incisão. Assim, a cânula foi fixada na parte posterior. Após posicionamento da cânula, foi verificado o sucesso em obter sangue, se houvesse falha, poder-se-ia reposicionar. Após o procedimento o animal ficou em recuperação, em caixas individuais, até o dia seguinte, quando então foram administrados os fármacos e realizadas as colheitas nos tempos propostos. Pelas cânulas foram coletados cerca de 500 μL de sangue, e este mesmo volume foi repostado com salina, para evitar que altere a concentração sanguínea e para permitir que o animal aguentasse todas as coletas.

5.4 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS BIOANALÍTICAS DE ANÁLISE DOS FÁRMACOS EM PLASMA

5.4.1 Fexofenadina

Para a análise da fexofenadina foi utilizado um método já previamente validado no grupo (Placido *et al.*, 2017).

Em resumo, o preparo de amostra foi realizado através de *clean-up* com solvente orgânico. Para os calibradores foram pipetados 25 μL de padrão de fexofenadina nas concentrações de 80, 100, 200, 400, 1000 e 2000ng de fexofenadina por mL de acetonitrila, que equivalem a 20, 25, 50, 100, 250 e 500ng de fexofenadina por mL de plasma e 25 μL de padrão interno (losartana) na concentração de 250ng/mL, foram levados à secura e retomados em 100 μL de plasma branco (que representa a matriz de trabalho isenta do analito). Então para calibradores e amostras, (100 μL) foram adicionados 1000 μL acetonitrila (Merck®), em *ependorf*. Essa mistura foi agitada em vórtex (Thermolyne®, modelo Max Mix II) por 1 min e em seguida, centrifugada por 20 minutos a 22000G em microcentrifuga (marca Mini spin® modelo Mini spin plus - Eppendorf®). Então, 900 μL do sobrenadante foram transferidos para um tubo de ensaio, o qual foi levado à secura em concentrador a vácuo (Labconco®, modelo

Centrivap[®] concentrator), ressuspendido em 50 μ L de fase móvel, transferidos para *vials* contendo *inserts* e 25 μ L foram injetados no equipamento. A curva analítica foi formada pelos pontos: 20, 25, 50, 100, 250 e 500ng de fexofenadina por mL de plasma. Os controles de qualidade foram preparados nas concentrações de 25ng/mL para o CQ baixo, 200ng/mL para o CQ médio e 375ng/mL para o CQ alto.

A fase móvel foi constituída por uma mistura de acetonitrila: metanol: acetato de amônio 10mM (45:45:10 v:v:v), bombeados em fluxo de 0,4mL/min, com volume de injeção de 25 μ L, com coluna de separação C18, Shimadzu, modelo Shim-pack ODS*Phenyl*[®], de dimensões 3mm x 100mm x 2,2 μ m. As condições iniciais foram otimizadas pelo equipamento; a fonte de ionização utilizada foi a ESI. Os íons do fenobarbital foram monitorados no modo positivo, nas respectivas transições m/z de 502>484, 466 e 171, sendo a transição 502>171 de maior intensidade, e os do padrão interno nas transições m/z de 423>207, 192 e 235, sendo a transição 423>207 de maior intensidade.

5.4.2 Carbamazepina

Para a análise da carbamazepina foi utilizado um método já previamente validado em nosso grupo de pesquisa (Costa *et al.*, 2016).

Em resumo, utilizou-se a extração líquido-líquido para preparo das amostras e quantificação por UHPLC-MS/MS. A 200 μ L de plasma adiciona-se 25 μ L de PI (diazepam na concentração de 500 ng/mL), 0,1g de cloreto de sódio (NaCl), 200 μ l de tampão acetato (1M) pH= 4,6 e 3 mL de mistura éter dietílico: acetato de etila (6:4, v/v). Agitou-se por 15 minutos em agitador vertical (1500 rpm) (IKA[®] Vibraxx) e centrifugou-se a 1800 g por 15 minutos (Novatécnica[®] NT-811). Alíquotas de 2mL da fase orgânica foram levadas à secura, em concentradora de amostras (Labconco[®], modelo Centrivap[®] concentrator), em temperatura de 60°C, ressuspendidas em 200 μ L de fase móvel para posterior injeção de 100 μ L no UHPLC-MS/MS (Shimadzu[®]). A curva analítica foi formada pelos pontos: 1, 5, 10, 50, 100, 200, 500 e 1000ng de carbamazepina por mL de plasma. Os controles de qualidade foram preparados nas concentrações de

1ng/mL para o CQ baixo, 500ng/mL para o CQ médio e 1000ng/mL para o CQ alto.

A fase móvel foi constituída por uma solução de acetonitrila: tampão formiato de amônio 2mM, 75:25v/v bombeados em fluxo de 0,2mL/min, com volume de injeção de 100µL, com coluna de separação C18, Shimadzu, modelo Shim-pack ODSPhenyl®, de dimensões 3mm x 100mm x 2,2µm. As condições iniciais foram otimizadas pelo equipamento; a fonte de ionização utilizada foi a ESI. Os íons da carbamazepina foram monitorados no modo positivo, nas respectivas transições m/z de 236,80>193,90, 193,00 e 191,85 e os do padrão interno nas transições m/z de 285,00>154,00, 192,95 e 221,95.

5.4.3 Fenobarbital

O método de análise do fenobarbital em plasma de rato foi desenvolvido baseado inicialmente no método de Hassib *et al.* (2018).

O preparo das amostras foi realizado através de uma extração líquido-líquido, sendo o solvente extrator uma mistura de acetato de etila : hexano (30:70) (Êxodo Científica®). Em resumo, para os calibradores foram pipetados 25µL de padrão de fenobarbital nas concentrações de 100, 200, 400, 1000, 2000, 4000 e 10000ng de fenobarbital por mL de metanol, que equivalem a 25, 50, 100, 250, 500, 1000 e 2500ng de fenobarbital por mL de plasma e 25µL de padrão interno (quetiapina) na concentração de 1000ng/mL, foram secos e retomados em 100µL de plasma branco (que representa a matriz de trabalho isenta do analito). Para as amostras (100µL) e calibradores foram adicionados 4mL do solvente extrator, em tubo de ensaio. Essa mistura foi agitada em agitador de tubos (Ika®) por 10 min e em seguida, recuperou-se 3mL do sobrenadante para outro tubo de ensaio. Esse tubo foi levado para uma concentradora a vácuo (Labconco®, modelo Centrivap® concentrator) para a secagem. Após a completa secagem, ressuspendeu-se em 50µL de fase móvel e esse volume foi transferido para *vials* contendo *inserts* e 25 µL foram injetados no equipamento. A curva analítica foi formada pelos pontos: 25, 50, 100, 250, 500, 1000 e 2500ng de fenobarbital por mL de plasma. Os controles de qualidade foram preparados nas

concentrações de 50ng/mL para o CQ baixo, 250ng/mL para o CQ médio e 2500ng/mL para o CQ alto.

A fase móvel foi constituída por uma solução de metanol : acetato de amônio 10mM (90:10 v:v), bombeados em fluxo de 0,4mL/min, com volume de injeção de 25µL, com coluna de separação C18 (4,6 mm X 150 mm X 5 µm, LiChrospher®). As condições iniciais foram otimizadas pelo equipamento; a fonte de ionização utilizada foi a ESI, os íons do fenobarbital foram monitorados no modo negativo, nas respectivas transições m/z de 231>42, 188 e 85, sendo a transição 231>188 de maior intensidade, e o padrão interno na transição m/z de 384>253, 221 e 210, sendo a transição 384>253 de maior intensidade.

5.4.4 Fenitoína

O método de análise em plasma de rato foi desenvolvido baseado inicialmente no método de Hassib *et al.* (2018).

O preparo das amostras foi realizado através de extração líquido-líquido, sendo o solvente extrator uma mistura de acetato de etila : hexano (30:70) (Éxodo Científica). Em resumo, para os calibradores foram pipetados 25µL de padrão de fenitoína nas concentrações de 100, 200, 400, 1000, 2000 e 4000ng de fenitoína por mL de metanol, que equivalem a 25, 50, 100, 250, 500 e 1000ng de fenitoína por mL de plasma e 25µL de padrão interno (ibuprofeno) na concentração de 1000ng/mL, foram secos e retomados em 100µL de plasma branco (que representa a matriz de trabalho isenta do analito). Para as amostras (100µL) e calibradores foram adicionados 4mL do solvente extrator, em tubo de ensaio. Essa mistura foi agitada em agitador de tubos (Ika®) por 10 min e em seguida, retirou-se 3mL do sobrenadante e transferiu-se para outro tubo de ensaio. Esse tubo foi levado para uma concentradora a vácuo (Labconco®, modelo Centrivap® concentrator) para a secagem. Após a completa secagem, ressuspendeu-se em 100 µL de fase móvel e esse volume foi transferido para *vials* contendo *inserts* e 25 µL foram injetados no equipamento. A curva analítica foi formada pelos pontos: 25, 50, 100, 250, 500 e 1000ng de fenitoína por mL de plasma. Os controles de qualidade foram preparados nas concentrações de

100ng/mL para o CQ baixo, 250ng/mL para o CQ médio e 500ng/mL para o CQ alto.

A fase móvel foi constituída por uma solução de acetonitrila : acetato de amônio 10mM (50:50 v:v), bombeados em fluxo de 0,4mL/min, com volume de injeção de 25µL, com coluna de separação C18 (4,6 mm X 150 mm X 5 µm, LiChrospher®). As condições iniciais foram otimizadas pelo equipamento; a fonte de ionização utilizada foi a ESI, os íons do padrão foram monitorados no modo negativo, nas respectivas transições m/z de 250,9>102, 180 e 75, sendo a transição 250,9>102 de maior intensidade, e o padrão interno na transição m/z de 205>161.

5.4.5 Validação dos métodos bioanalíticos para análise de fenobarbital e fenitoína em plasma de rato

Os métodos analíticos foram validados conforme especificações da ANVISA na RDC nº 27 de maio de 2012 (BRASIL, 2012), nos seguintes parâmetros: precisão, exatidão, linearidade, efeito matriz, efeito residual e estabilidades, para confirmar sua adequação e confiabilidade para a análise proposta.

5.4.5.1 Efeito Matriz

Efeito matriz é um estudo realizado para verificar se algum componente presente na matriz biológica causa interferência na resposta do fármaco ou padrão interno na análise.

Para este teste foram analisadas, em triplicata, amostras de matrizes biológicas processadas e posteriormente adicionadas dos analitos e do PI em concentrações iguais aos controles de qualidade de baixa concentração (CQB) e controle de qualidade de alta concentração (CQA). O coeficiente de variação (CV) dos Fatores de matrizes normalizados (FMNs) relativos a todas as amostras

deve ser inferior a 15% (BRASIL, 2012).

A fórmula utilizada para o cálculo do fator de matriz normalizado está demonstrada a seguir:

$$\text{FMN} = \frac{\text{Resposta do analito em matriz/resposta do PI em matriz}}{\text{Resposta do analito em solução/resposta do PI em solução}}$$

5.4.5.2 Linearidade

A linearidade permite avaliar se o sinal emitido pelo equipamento aumenta com o aumento da concentração do analito presente na amostra, em uma proporção linear. Para sua realização foram adicionados 25µL do padrão do fármaco na concentração apropriada, e 25µL de PI nas concentrações das curvas analíticas. Os calibradores foram processados conforme o preparo de amostra descrito nos itens 5.3.3 e 5.3.4 e os resultados foram plotados em gráfico, e avaliou-se o R^2 , que deve ser maior ou igual a 0,98 (BRASIL, 2012).

5.4.5.3 Precisão e exatidão

A precisão avalia o grau de repetibilidade do método entre os resultados obtidos para uma mesma concentração, ou seja, o quanto os resultados estão próximos entre si para a mesma concentração. É dividido em precisão intra-dia (um único dia) e precisão interdias (mínimo de 3 dias diferentes). Foram avaliados por meio do controle de qualidade de baixa concentração (CQB), controle de qualidade de média concentração (CQM) e controle de qualidade de alta concentração (CQA). A exatidão expressa a proximidade dos resultados obtidos ao valor nominal e foi realizado da mesma forma que a precisão.

A precisão é expressa pelo coeficiente de variação (CV) ou desvio padrão relativo (DPR), e seu valor não deve ser superior a 15% entre as replicatas, exceto para o LIQ que é até 20%. Para a exatidão foi avaliada através de cálculo

do erro padrão relativo (EPR), os valores para cada concentração não podiam ser superiores a 15%, exceto para o LIQ que poderia ser 20% (BRASIL, 2012). A precisão e exatidão intra-dia foram realizadas em um mesmo dia, enquanto a interdias foi realizada em 3 dias. As amostras foram fortificadas com padrão em cada uma das concentrações (CQB, CQM, CQA) e passaram pelo procedimento de preparo de amostra, conforme descrito nos itens 5.3.3 e 5.3.4.

$$\text{CV ou DPR (\%)} = (\text{Desvio padrão} \times 100) / \text{Média}$$

$$\text{Inexatidão (\%)} = [(\text{concentração média determinada} - \text{concentração nominal}) \times 100] / \text{Concentração nominal}$$

5.4.5.4 Limite inferior de quantificação (LIQ)

O LIQ representa a menor concentração que o método pode quantificar com precisão e exatidão. O coeficiente de variação deve ser inferior a 20%. Sua determinação foi realizada por meio de 6 replicatas.

5.4.5.5 Limite de detecção

O limite de detecção é a menor quantidade de analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2012).

Este parâmetro é calculado conforme a fórmula:

$$\text{LD} = \frac{\text{Dpa} \times 3}{\text{IC}}$$

Sendo, Dpa (desvio padrão do intercepto com o eixo Y da curva analítica) e IC (inclinação da curva analítica).

5.4.5.6 Estabilidade

A estabilidade foi avaliada com o intuito de garantir que o analito se manteve estável nas condições de preparo, análise e estocagem das amostras. Para isso, foi avaliada a estabilidade do padrão frente a estabilidade pós-processamento e estabilidade de curta duração. A estabilidade é garantida quando não ocorrer um desvio superior a 15% da média das concentrações obtidas em relação a amostras recém-preparadas (BRASIL, 2012).

5.4.5.6.1 Estabilidade de curta duração

Amostras foram fortificadas com padrões nas concentrações do CQB e CQA, em quadruplicata, foram deixadas em repouso em condições normais do laboratório (temperatura, umidade e luminosidade) durante o tempo necessário para preparo das amostras. Em seguida foram submetidas ao preparo de amostra conforme itens 5.3.3 e 5.3.4 e analisadas. Os resultados obtidos foram comparados a amostras recém-preparadas e a variação deve ser menor que 15%.

5.4.5.6.2 Estabilidade pós-processamento

Amostras de plasma foram fortificadas com padrões nas concentrações do CQB e CQA, em quadruplicata, foram submetidas ao preparo de amostra conforme descrito nos itens 5.3.3 e 5.3.4, porém foram analisadas pelo equipamento somente após o término de todas as outras amostras. Os resultados obtidos foram comparados com amostras recém-preparadas e a variação deve ser menor que 15%.

5.4.5.7 Efeito residual

Efeito residual (*carryover*) avalia se há contaminação proveniente de análises anteriores, as quais podem levar ao aparecimento e aumento do sinal do analito ou padrão interno. Para a análise, foram analisadas 3 injeções de amostra branco, sendo uma antes e duas após a injeção do limite superior de quantificação (LSQ) e avalia se houve aparecimento de sinal do analito no branco.

5.5 PROTOCOLOS PARA AVALIAÇÃO FARMACOCINÉTICA

Foi realizada a avaliação farmacocinética para os grupos controle com inibidor, epilético e epilético com inibidor, sendo os grupos epiléticos formados por animais induzidos quimicamente pelo modelo da pilocarpina, conforme item 5.2. Cada grupo foi composto por 8 animais da raça *Wistar* provenientes do Biotério Central da UNIFAL-MG.

Os grupos foram mantidos no laboratório de experimentação, onde foram submetidos ao ciclo do claro e escuro de 12 horas e tiveram água e comida *ad libitum*. Todos os animais foram pesados, e aqueles que estiveram com peso entre 200 – 250g foram submetidos ao procedimento cirúrgico para a inserção de uma cânula na veia jugular. No dia seguinte a cirurgia de canulação, foi administrado os fármacos, conforme os protocolos.

5.5.1 Fexofenadina

Foi administrado o verapamil na dose de 10mg/kg (BANSAL *et al.*, 2009) (para os grupos com inibidor), e após 2 horas foi administrada a fexofenadina por gavagem na dose de 10mg/kg (PHATAK *et al.*, 2008) de peso do animal. Então foram realizadas colheitas de 0,5mL de sangue, e este mesmo volume foi

reposto com salina. Os tempos de colheita foram: 0,25; 0,5; 1; 1,25; 2; 3; 4; 6; 8; 12 horas. O sangue foi centrifugado e o plasma foi separado e armazenado a -80°C até o momento da análise.

5.5.2 Carbamazepina

Foi administrado a carbamazepina por gavagem na dose de 25mg/kg de peso do animal (Costa *et al.*, 2016). Então foram realizadas colheitas de 0,5mL de sangue, e este mesmo volume foi repostado com salina. Os tempos de colheita foram: 0,08; 0,33; 0,66; 1; 1,5; 2; 3; 4; 6; 8 horas. O sangue foi centrifugado e o plasma foi separado e armazenado a -80°C até o momento da análise. Para os animais tratados com o inibidor, primeiramente foi administrado o verapamil na dose de 10mg/kg (BANSAL *et al.*, 2009); após duas horas da administração do verapamil, foi administrado a carbamazepina nas mesmas condições dos grupos sem inibidores, e realizou-se as colheitas nos mesmos tempos do grupo sem inibidor.

5.5.3 Fenobarbital

Foi administrado o fenobarbital por gavagem na dose de 40mg/kg de peso do animal (BRANDT *et al.*, 2004). Então foram realizadas colheitas de 0,5mL de sangue, e este mesmo volume foi repostado com salina. Os tempos de colheita foram: 0,08; 0,25; 0,30; 1; 1,5; 2; 3; 4; 6; 8 horas. O sangue foi centrifugado e o plasma foi separado e armazenado a -80°C até o momento da análise. Para os animais tratados com o inibidor, primeiramente foi administrado o verapamil na dose de 10mg/kg (BANSAL *et al.*, 2009); após duas horas da administração do verapamil, foi administrado o fenobarbital nas mesmas condições dos grupos sem inibidores, e realizou-se as colheitas nos mesmos tempos do grupo sem inibidor.

5.5.4 Fenitoína

Foi administrado a fenitoína por gavagem na dose de 30mg/kg de peso do animal (POTSCHKA; LÖSCHER, 2001b; HÖCHT *et al.*, 2007). Então foram realizadas colheitas de 0,5mL de sangue, e este mesmo volume foi repostado com salina. Os tempos de colheita foram: 0,08; 0,25; 0,30; 0,45; 1; 1,5; 2; 3; 4; 6 horas. O sangue foi centrifugado e o plasma foi separado e armazenado a -80°C até o momento da análise. Para os animais tratados com o inibidor, primeiramente foi administrado o verapamil na dose de 10mg/kg (BANSAL *et al.*, 2009); após duas horas da administração do verapamil, foi administrado a fenitoína nas mesmas condições dos grupos sem inibidores, e realizou-se as colheitas nos mesmos tempos do grupo sem inibidor.

5.6 ANÁLISE FARMACOCINÉTICA

Após determinação bioanalítica por cromatografia líquida de ultra eficiência da concentração dos fármacos presentes em plasma, foi realizada a modelagem farmacocinética. Para isso foi utilizado o *add-in* PKSolver para Excel (Microsoft®) (ZHANG *et al.*, 2010). Os dados de concentração plasmática em função do tempo após a administração oral foram analisados por modelo não-compartimental; foram obtidos os parâmetros: área sob a curva ($AUC^{0-\infty}$), *clearance*, meia vida ($t_{1/2}$), $C_{m\acute{a}x}$ e $T_{m\acute{a}x}$.

5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os testes estatísticos foram realizados com o auxílio do programa GraphPad InStat® para a obtenção da mediana e do intervalo de confiança 95% (IC 95%).

O teste de Mann-Whitney bicaudado para dados não pareados e não

paramétricos foi utilizado para comparar os parâmetros farmacocinéticos da fexofenadina nos grupos controle com inibidor, pilocarpina e pilocarpina com inibidor, nível de confiança fixado em $p \leq 0,05$.

O teste de Mann-Whitney bicaudado para dados não pareados e não paramétricos também foi utilizado para a comparação da farmacocinética da carbamazepina, fenobarbital e fenitoína entre os grupos: controle, controle com inibidor, epilético e epilético com inibidor, nível de confiança fixado em $p \leq 0,05$.

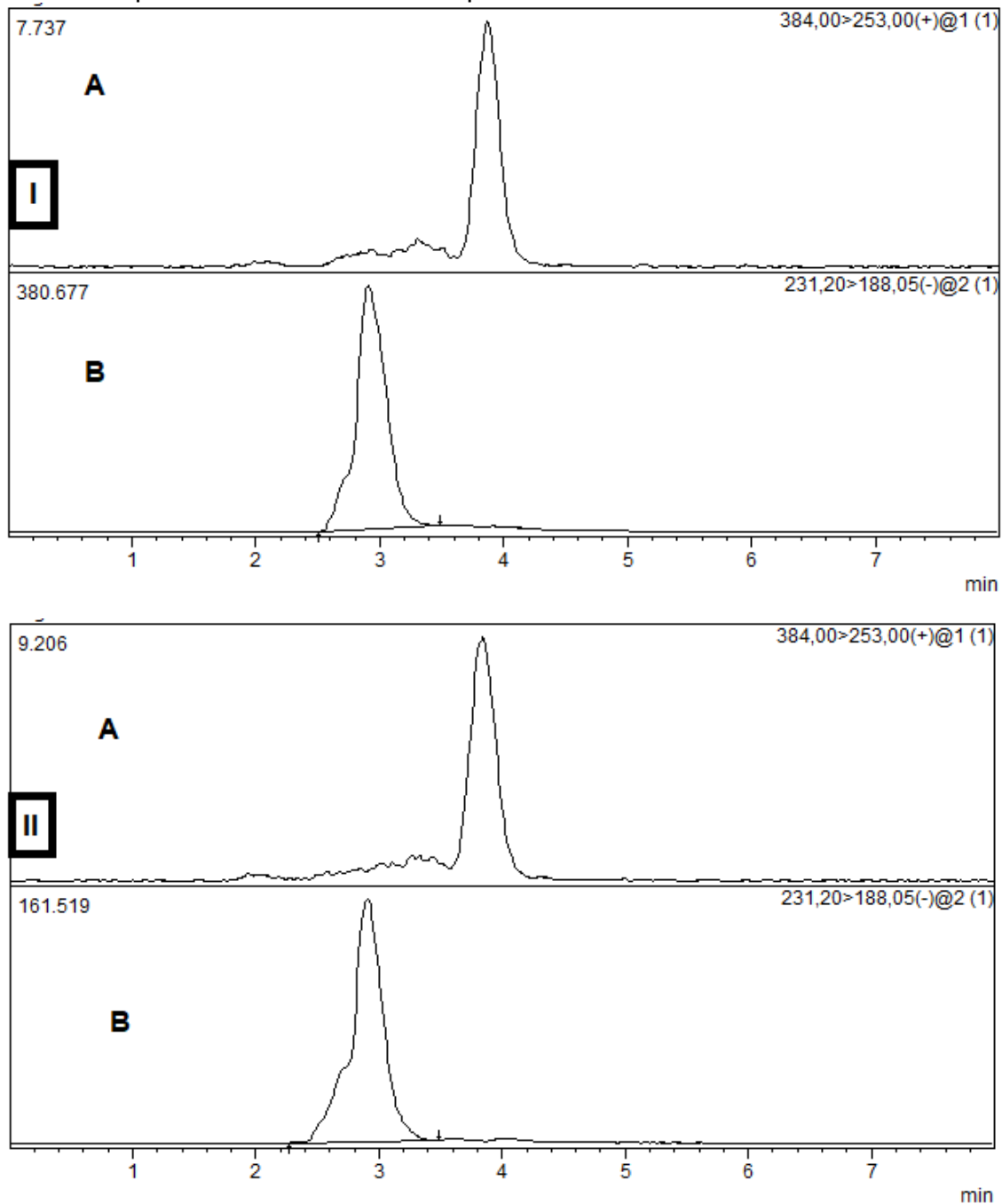
6 RESULTADOS

6.1 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS DE ANÁLISE EM PLASMA DE RATOS

6.1.1 Fenobarbital

O método analítico desenvolvido no UHPLC-MS/MS para a quantificação de fenobarbital foi validado conforme as especificações da RDC 27/2012 da ANVISA (BRASIL, 2012). O cromatograma obtido está mostrado na Figura 5. O tempo de eluição do fenobarbital foi aproximadamente 3 minutos e do padrão interno em torno de 4 minutos.

Figura 5 - Cromatogramas obtidos na análise do fenobarbital em plasma de rato por UHPLC-MS/MS. Em I: cromatograma referente a calibrador na concentração de 2500ng de fenobarbital por mL de plasma de rato. O pico **A** refere-se ao PI e o pico **B** ao fenobarbital. Em II: cromatograma referente a amostra de animal tratado, no tempo de colheita de 4h. O pico **A** refere-se ao PI e o pico **B** ao fenobarbital.



Fonte: Do autor.

6.1.1.1 Efeito matriz

A avaliação deste efeito para os controles de qualidade baixo (CQB) e alto (CQA), mostrou o método desenvolvido para o fenobarbital não apresentou efeito matriz. Os coeficientes de variação (CV) obtidos para o CQB foram de 2,8% e 9,7%, para o CQA; portanto estão dentro dos limites aceitáveis pela RDC 27/2012, que são até 15% (BRASIL, 2012).

6.1.1.2 Linearidade

De acordo com a RDC 27/2012, para a aceitação da linearidade é necessário que a menor concentração nominal tenha desvio menor ou igual a 20%, as demais concentrações não tenham desvio superior a 15% em relação ao valor nominal. Além disso, é necessário que no mínimo 75% dos padrões de calibração estejam adequados ao acima disposto, e, que no mínimo seis padrões de concentrações distintas sejam utilizados. O limite inferior de detecção (LIQ) e o limite superior de quantificação (LSQ) também devem atender às exigências anteriores (BRASIL, 2012). A relação entre concentração e resposta foi definida por meio de uma curva analítica, representada por uma equação de primeiro grau, no intervalo de 25 a 2500ng/mL de fenobarbital em plasma.

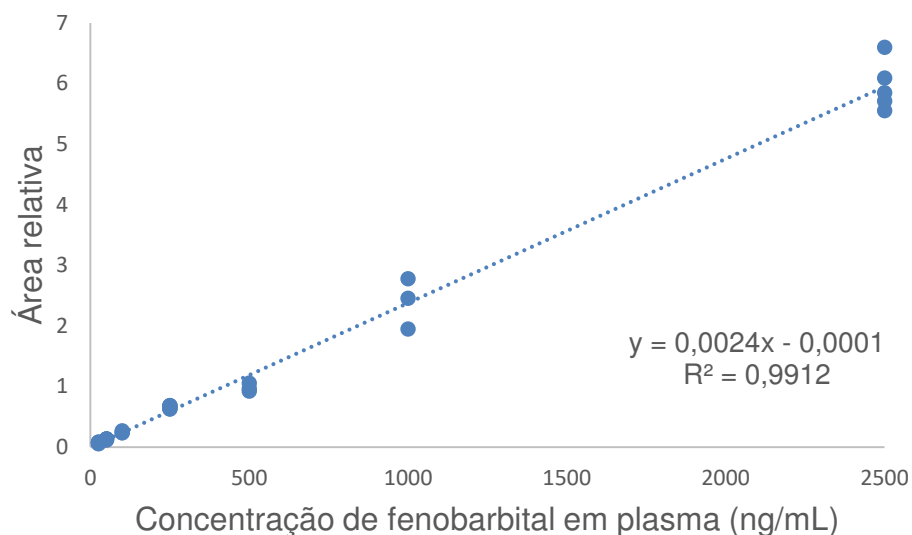
Os dados da curva analítica estão demonstrados na Tabela 3. A Figura 6 representa a curva analítica, com seis réplicas para cada ponto. O valor do coeficiente de correlação linear foi superior a 0,99, sendo que o critério de aceitação para o coeficiente é de que ele seja maior ou igual a 0,98; indicando adequada linearidade na faixa de trabalho.

Tabela 3 - Dados obtidos da equação linear do fenobarbital

Parâmetro	Valor
Coeficiente angular (a)	0,0024
Coeficiente linear (b)	-0,0001
Coeficiente de correlação linear (r)	0,9912

Fonte: Do autor.

Figura 6 – Curva analítica para o fenobarbital em plasma de rato.



Fonte: Do autor.

6.1.1.3 Precisão, exatidão e limite inferior de quantificação

Foram determinadas precisão e exatidão intra e intercorridas (Tabela 4) para os controles baixo (CQB), médio (CQM) e alto (CQA) e para o LIQ. Os resultados de precisão e exatidão estão de acordo com os valores aceitos pela RDC 27/2012, (até 15% de variação) mostrando que o método é preciso e exato (BRASIL, 2012).

O LIQ do método desenvolvido foi de 25ng/mL. O coeficiente de variação foi menor que 20%, o que é exigido pela RDC 27/2012 (BRASIL, 2012). Os dados obtidos estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Valores de DPR (CV) (%) e EPR (inexatidão) (%) intra-dia e interdias para precisão e exatidão para fenobarbital em plasma de ratos.

		LIQ (25ng/mL)	CQB (50ng/mL)	CQM (250ng/mL)	CQA (2500ng/mL)
Intra-dias n=6	Precisão (DPR%)	14,2	5,4	3,9	6,9
	Exatidão (EPR%)	17,6	7,3	10,8	0,2
Interdias n= 3	Precisão (DPR%)	16,7	9,5	6,7	5,0
	Exatidão (EPR%)	10,1	2,7	8,2	0,5

$$\text{DPR} = [(SD/média) \times 100]$$

$$\text{EPR} = [(C_{\text{obtida}} - C_{\text{nominal}}) / C_{\text{nominal}}] \times 100$$

Fonte: Do autor.

6.1.1.4 Limite de detecção

O limite de detecção calculado de acordo com o item 5.3.5.6 foi de 0,1ng/mL, estando adequado aos valores obtidos com as amostras reais no estudo.

6.1.1.5 Estabilidades

A estabilidade do analito em plasma foi demonstrada para curta duração e pós-processamento, visto que não se observou desvio superior a 15% da média das concentrações obtidas dos testes de estabilidade com relação ao valor nominal dos CQB e CQA recém-preparados. Os estudos de estabilidade de ciclos de congelamento e longa duração não foram realizados pois a amostra só foi descongelada para análise e a análise foi realizada em intervalo reduzido

de tempo, após a colheita das amostras. Os resultados obtidos referentes aos testes estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5 - Dados referentes aos testes de estabilidade de curta duração e pós-processamento. Dados expressos com coeficiente de variação (CV %).

Amostra	Curta duração	Pós-processamento
CQB (50ng/mL)	12,2	13,4
CQA (2500ng/mL)	10,0	5,9

Legenda: CQB: controle de qualidade baixo;

CQA: controle de qualidade alto;

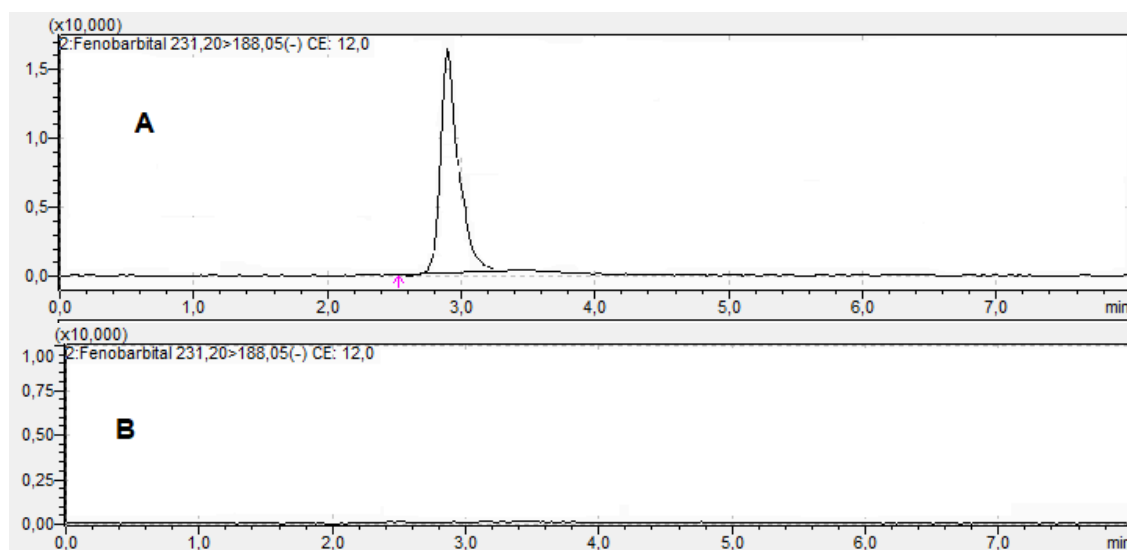
CV = $[(SD/média) \times 100]$

Fonte: Do autor.

6.1.1.6 Efeito residual

Para a análise de efeito residual, foram realizadas 3 injeções de amostra branco, sendo uma antes e duas após a injeção do limite superior de quantificação (LSQ 2500 ng/ml de plasma). Por meio deste teste, foi possível observar que o fenobarbital não apresentou efeito residual significativo na análise, quando se comparou o branco ao LIQ (Figura 7).

Figura 7 - Efeito residual no método bioanalítico desenvolvido para quantificação de fenobarbital em plasma de rato por UHPLC-MS/MS Em **A** limite inferior de quantificação (25ng/mL). Em **B** o branco, ambos na mesma escala (x10.000).

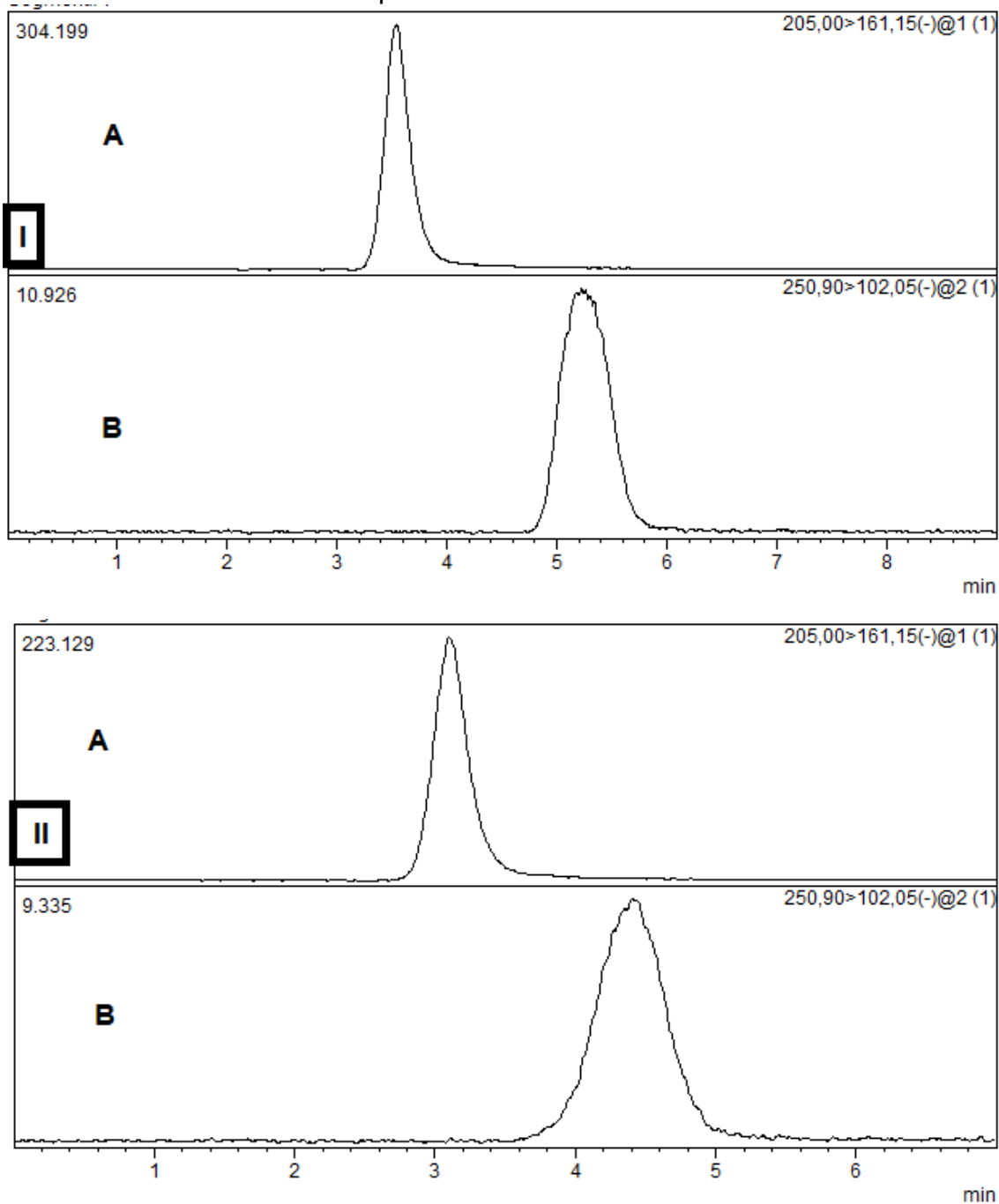


Fonte: Do autor.

6.1.2 Fenitoína

O método analítico desenvolvido no UHPLC-MS/MS para a quantificação de fenitoína em plasma foi validado conforme as especificações da RDC 27/2012 da ANVISA (BRASIL, 2012). O cromatograma obtido pode ser observado na Figura 8. O tempo de eluição da fenitoína foi aproximadamente 4,5 minutos e do padrão interno em torno de 3,5 minutos.

Figura 8 – Cromatogramas obtidos na análise da fenitoína em plasma de rato por UHPLC-MS/MS. Em I: cromatograma referente a calibrador na concentração de 500ng de fenitoína por mL de plasma de rato. O pico **A** refere-se ao PI e o pico **B** a fenitoína. Em II: cromatograma referente a amostra do animal tratado, no tempo de colheita de 1h. O pico **A** refere-se ao PI e o pico **B** a fenitoína.



Fonte: Do autor.

6.1.2.1 Efeito matriz

A avaliação deste efeito para os controles de qualidade baixo (CQB) e alto (CQA), o método desenvolvido para a fenitoína não apresentou efeito matriz. Os coeficientes de variação (CV) obtidos para o CQB foram de 8,2% e 4,3% para CQA, portanto dentro dos limites aceitáveis pela RDC 27/2012, que são até 15% (BRASIL, 2012).

6.1.2.2 Linearidade

A relação entre concentração e resposta foi definida por meio de uma curva analítica, representada por uma equação de primeiro grau, no intervalo de 25 a 1000ng de fenitoína por mL de plasma.

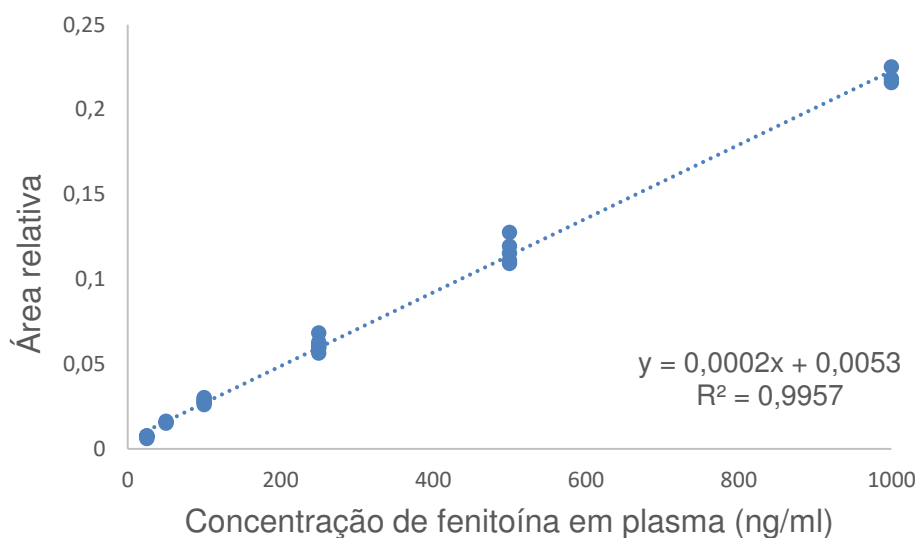
Os dados da curva analítica estão demonstrados na Tabela 6. A Figura 9 representa a curva analítica, para qual foram feitas seis réplicas para cada ponto. O valor do coeficiente de correlação linear foi superior a 0,99, sendo que o critério de aceitação para o coeficiente é de que ele seja maior ou igual a 0,98; indicando adequada linearidade na faixa de trabalho.

Tabela 6 - Dados obtidos da equação linear da fenitoína.

Parâmetro	Valor
Coeficiente angular (a)	0,0002
Coeficiente linear (b)	0,0053
Coeficiente de correlação linear (r)	0,9957

Fonte: Do autor.

Figura 9 – Curva analítica para a fenitoína em plasma de rato.



Fonte: Do autor.

6.1.2.3 Precisão, exatidão e limite inferior de quantificação

Foram determinadas precisão e exatidão intra e intercorridas (Tabela 7) para os controles de qualidade baixo (CQB), médio (CQM), alto (CQA) e para o LIQ. Os resultados de precisão e exatidão estão em acordo com os valores aceitos pela RDC 27/2012, (até 15% de variação) mostrando que o método é preciso e exato (BRASIL, 2012).

O LIQ do método desenvolvido foi de 25ng/mL. O coeficiente de variação foi menor que 20%, o que é exigido pela RDC 27/2012 (BRASIL, 2012). Os dados obtidos estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Valores de DPR (CV) (%) e EPR (inexatidão) (%) intra-dia e interdias para precisão e exatidão para fenitoína em plasma de ratos.

		LIQ (25ng/mL)	CQB (100ng/mL)	CQM (250ng/mL)	CQA (500ng/mL)
Intra-dias n=6	Precisão (DPR%)	14,0	6,8	4,8	4,4
	Exatidão (EPR%)	1,5	5,3	13,9	3,1
Interdias n= 3	Precisão (DPR%)	14,5	12.1	14,4	8,8
	Exatidão (EPR%)	7,9	5.7	3,0	1,7

$$\text{DPR} = \left[\frac{\text{SD}}{\text{média}} \times 100 \right]$$

$$\text{EPR} = \left[\frac{\text{C}_{\text{obtida}} - \text{C}_{\text{nominal}}}{\text{C}_{\text{nominal}}} \times 100 \right]$$

Fonte: Do autor.

6.1.2.4 Limite de detecção

O limite de detecção calculado de acordo com o item 5.3.5.6 foi de 16,8ng/mL, estando adequado aos valores obtidos com as amostras reais no estudo.

6.1.2.5 Estabilidade

A estabilidade do analito em plasma foi demonstrada para os testes de curta duração e pós-processamento, visto que não se observou desvio superior a 15% da média das concentrações obtidas para os testes de estabilidade, com relação ao valor nominal dos CQB e CQA recém-preparados. Os estudos de estabilidade de ciclos de congelamento e longa duração não foram realizados pois a amostra só foi descongelada para análise e a análise foi realizada em

intervalo reduzido de tempo, após a colheita das amostras. Os resultados obtidos referentes aos testes estão descritos na Tabela 8.

Tabela 8 - Dados referentes aos testes de estabilidade de curta duração e pós-processamento. Dados expressos com coeficiente de variação (CV %).

Amostra	Curta duração	Pós-processamento
CQB (50ng/mL)	11,5	14,4
CQA (2500ng/mL)	13,0	13,6

Legenda: CQB: controle de qualidade baixo;

CQA: controle de qualidade alto;

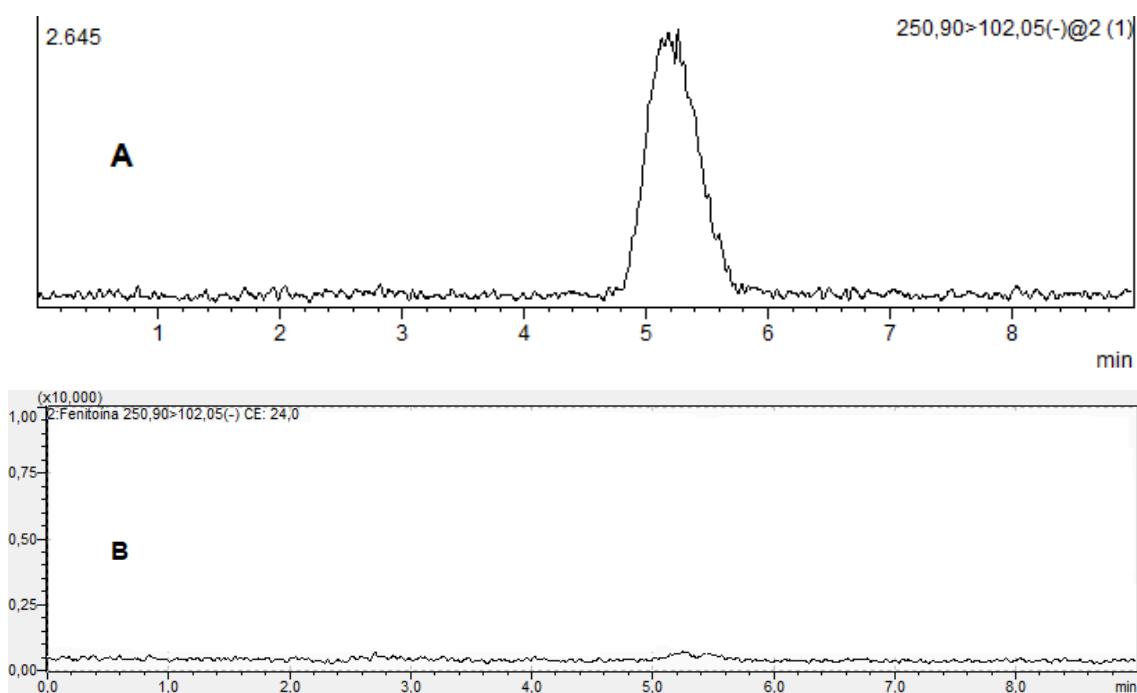
CV = [(SD/média)x100]

Fonte: Do autor.

6.1.2.6 Efeito residual

Para avaliação do efeito residual, foram analisadas 3 injeções de amostra branco, sendo uma antes e duas após a injeção do limite superior de quantificação (LSQ – 1000 ng/ml de plasma). Por meio deste teste, foi possível observar que a fenitoína não apresentou efeito residual significativo na análise, quando se comparou o branco ao LIQ (Figura 10).

Figura 10 - Efeito residual para o método bioanalítico desenvolvido para quantificação de fenitoína em plasma de rato por UHPLC-MS/MS Em **A** limite inferior de quantificação (25ng/mL). Em **B** o branco, ambos em mesma escala (x10.000).



Fonte: Do autor.

6.2 FARMACOCINÉTICA

6.2.1 Fexofenadina

Este trabalho de doutorado foi realizado em continuação ao mestrado realizado pelo próprio autor (PLACIDO *et al.*, 2017). Na dissertação de mestrado foi realizada a avaliação farmacocinética da fexofenadina para os grupos controle, WAR com ELT e WAR resistente, sob as mesmas condições utilizadas neste estudo, porém sem o uso do inibidor da P-gp (verapamil). Na Tabela 9 estão expressos os parâmetros para os grupos controle FX, controle FX após a administração do inibidor da P-gp (verapamil), epilético FX e epilético FX com a administração do inibidor da P-gp. Na Figura 11, estão ilustrados em gráfico os

perfis farmacocinéticos, comparando-se os grupos controle FX, controle FX com a administração do inibidor, epiléptico FX e epiléptico FX com inibidor.

Tabela 9 – Parâmetros farmacocinéticos da fexofenadina (FX) para os grupos controle FX, controle FX com inibidor, epiléptico FX e epiléptico FX com inibidor (n= 8, por grupo), após a administração de fexofenadina (10mg/kg, via oral) e inibidor verapamil administrado 2 horas antes da fexofenadina (10mg/kg, via oral). Dados apresentados como: mediana; intervalo de confiança (IC).

Parâmetros	Controle FX	Controle FX com inibidor	Epiléptico FX	Epiléptico FX com inibidor
AUC ^{0-∞} (ng.h/mL)	766,4 (570,93 – 981,93)	3022,0 (928,9 – 6865,3) ^a	766,5 (548,3 – 1221,2)	642,7 (450,7 – 1151,9)
AUC ^{0-3h} (ng.h/mL)	223,9 (160,9 – 262,3)	154,9 (88,3 – 238,6)	136,4 (79,5 – 262,7)	71,3 (60,7 – 88,3) ^b
t _{1/2} (h)	8,1 (4,18 – 12,2)	18,9 (9,6 – 30,2)	23,3 (11,7 – 43,8) ^c	21,1 (12,0 – 41,8) ^c
T _{máx} (h)	0,50 (0,4 – 0,8)	0,5 (0,2 – 0,8)	0,3 (0,2 – 0,6)	1,1 (0,4 – 1,9) ^d
C _{máx} (ng/mL)	117,9 (65,7 – 206,9)	99,6 (1,9 – 331,1)	104,2 (32,2 – 267,6)	34,8 (22,1 – 71,5) ^e
Cl _{Tf} (mL/h/Kg)	13110,0 (10028,2 – 17107,4)	3374,5 (1537,2 – 5702,8) ^a	13069,0 (9346,3 – 16344,3)	15595,7 (9121,7 – 19066,4)

Fonte: Do autor.

Legenda: AUC^{0-∞}: área sob a curva;

AUC^{0-3h}: área sob a curva de 0 a 3 horas;

t_{1/2}: meia-vida;

T_{máx}: tempo de concentração máxima;

C_{máx}: concentração máxima;

Cl_{Tf}: clearance total aparente.

^a p<0,01 (Controle FX com inibidor vs. Controle FX; Epiléptico FX e Epiléptico FX com inibidor)

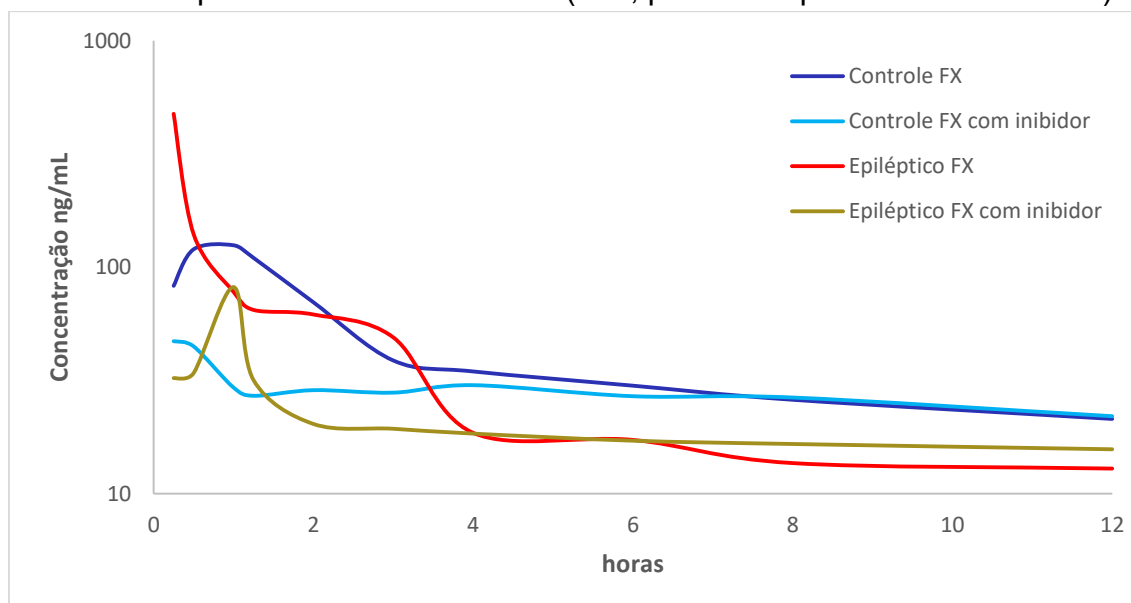
^b p<0,01 (Epiléptico FX com inibidor vs. Epiléptico FX)

^c p<0,01 (Epiléptico FX e Epiléptico FX com inibidor vs. Controle FX)

^d p<0,01 (Epiléptico FX com inibidor vs. Controle FX com inibidor e Epiléptico FX)

^e p<0,01 (Epiléptico FX com inibidor vs. Controle FX e Epiléptico FX)

Figura 11 – Curvas médias de concentração plasmática para fexofenadina (FX) em função do tempo para os grupos controle FX, controle FX com inibidor, epilético FX e epilético FX com inibidor. Dados apresentados como média (n=8, para cada perfil farmacocinético).



Fonte: Do autor.

Como pode-se notar na Tabela 9, após a administração do inibidor da P-gp para o grupo controle FX com inibidor, o $AUC^{0-\infty}$ aumentou em comparação ao grupo controle FX sem inibidor (3022,0 vs. 766,4 ng.h/mL) e o *clearance* reduziu (3374,5 vs. 13110,0 mL/h/kg).

Ao se administrar o inibidor da P-gp para o grupo epilético FX, notou-se aumento no tempo necessário para atingir o $C_{máx}$ ($T_{máx}$) (1,1 vs. 0,3 h) e redução nessa concentração (34,8 vs. 104,2 ng/mL) quando comparado ao grupo epilético FX com inibidor.

No parâmetro AUC^{0-3h} nota-se uma redução entre os grupos controle FX vs. controle FX com inibidor (223,9 vs. 154,94 ng.h/mL), e entre epilético FX vs. epilético FX com inibidor (136,4 vs. 71,3 ng.h/mL), como pode ser observado na Figura 11, com diferença acentuada nas primeiras 3 horas.

6.2.2 Carbamazepina

Na Tabela 10 estão expressos os parâmetros farmacocinéticos obtidos para a carbamazepina (CB) nos grupos controle CB, controle CB com inibidor, epiléptico CB e epiléptico CB com inibidor. Na Figura 12, estão ilustrados os perfis farmacocinéticos pós-administração de carbamazepina, comparando-se os grupos controle CB, controle CB com inibidor, epiléptico CB e epiléptico CB com inibidor.

Tabela 10 – Parâmetros farmacocinéticos da carbamazepina (CB) para os grupos controle CB, controle CB com inibidor, epiléptico CB e epiléptico CB com inibidor (n=8, por grupo), após administração de carbamazepina (25mg/kg, via oral) e inibidor verapamil administrado 2 horas antes da carbamazepina (10mg/kg, via oral). Dados apresentados como: mediana; Intervalo de confiança.

Parâmetros	Controle CB	Controle CB com Inibidor	Epiléptico CB	Epiléptico CB com Inibidor
AUC ^{0-∞} (ng.h/mL)	16638,2 (5334,8 – 22854,3)	14905,4 (5711,2 – 25098,8)	14519,5 (5895,9 – 30217,1)	12279,2 (4844,3 – 30165,6)
t _{1/2} (h)	4,0 (2,6 – 5,5)	5,4 (2,9 – 9,5)	4,8 (2,2 – 9,3)	3,1 (0,2 – 8,7)
T _{máx} (h)	1,0 (0,6 – 1,3)	0,7 (0,3 – 1,0)	1,0 (0,7 – 1,2)	1,0 (0,4 – 1,2)
C _{máx} (ng/mL)	5062,4 (1551,3 – 6911,9)	2058,2 (1179,2 – 4097,5)	1803,4 (826,8 – 3729,8)	1901,7 (1233,4 – 3198,1)
Cl _{T/f} (mL/h/kg)	1594,0 (34,3 – 10133,7)	1677,3 (629,4 – 4634,5)	1740,4 (553,3 – 4885,0)	2036,0 (625,1 – 4273,5)

Fonte: Do autor.

Legenda: AUC^{0-∞}: área sob a curva;

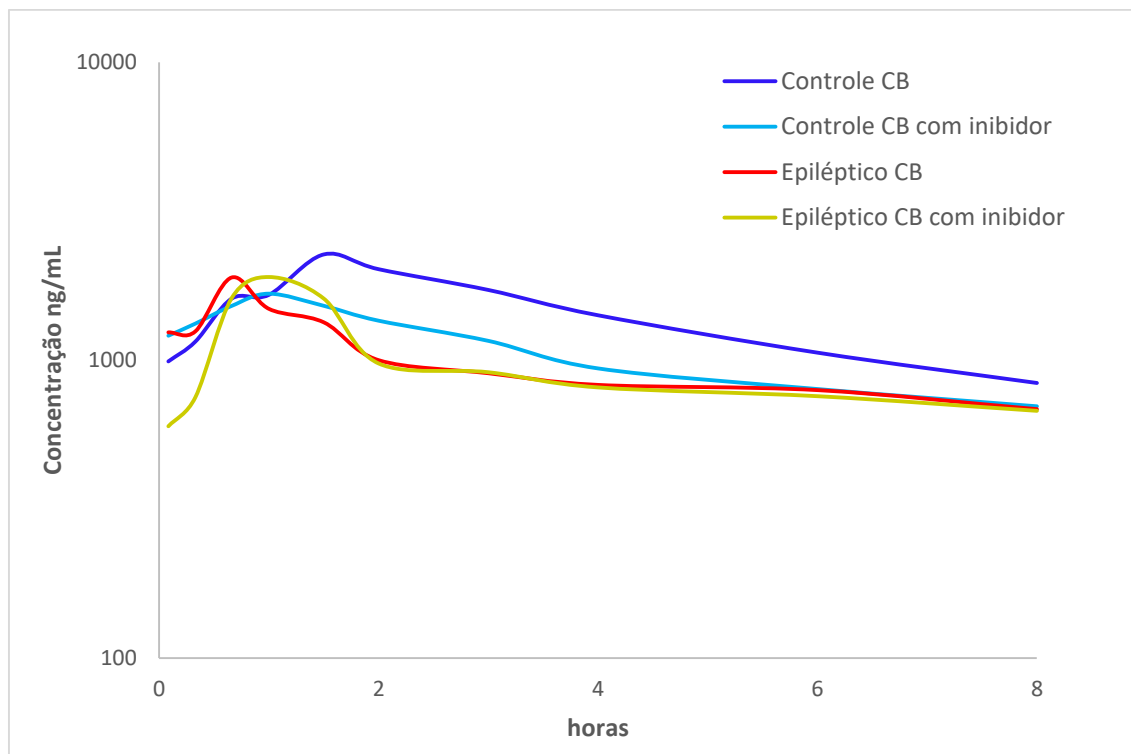
t_{1/2}: meia-vida;

T_{máx}: tempo de concentração máxima;

C_{máx}: concentração máxima;

Cl_{T/f}: clearance total aparente.

Figura 12 – Curvas médias para concentração plasmática de carbamazepina (CB) em função do tempo para os grupos controle CB, controle CB com inibidor da P-gp, epilético CB e epilético CB com inibidor da P-gp. Dados apresentados como média (n=8, para cada perfil farmacocinético).



Fonte: Do autor.

Como pode ser observado na Tabela 10 e na Figura 12, não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os grupos para este antiepilético para nenhum dos parâmetros analisados.

6.2.3 Fenobarbital

Na Tabela 11 estão expressos os parâmetros farmacocinéticos obtidos para o fenobarbital (FB) nos grupos controle FB, controle FB com inibidor, epilético FB e epilético FB com inibidor. Na Figura 13, estão ilustrados os perfis farmacocinéticos pós-administração de fenobarbital, comparando-se os grupos controle FB, controle FB com inibidor, epilético FB e epilético FB com inibidor.

Tabela 11 - Parâmetros farmacocinéticos do fenobarbital (FB) para os grupos controle FB, controle FB com inibidor, epiléptico FB e epiléptico FB com inibidor (n=8, por grupo), após administração de fenobarbital (40mg/kg, via oral) e inibidor verapamil administrado 2 horas antes do fenobarbital (10mg/kg, via oral). Dados apresentados como: mediana; Intervalo de confiança.

Parâmetros	Controle FB	Controle FB com inibidor	Epiléptico FB	Epiléptico FB com inibidor
AUC ^{0-∞} (ng.h/mL)	129379,7 (62176,2 – 199657,5)	31965,8 (13332,2 – 64113,7) ^a	201235,9 (99606,7 – 306062,6) ^d	74406,2 (36389,6 – 187634,5) ^e
t _{1/2} (h)	8,3 (6,2 - 11,0)	4,2 (3,8 - 4,6) ^a	5,9 (5,2 - 7,7) ^d	3,7 (2,2 - 6,5) ^{c, f}
T _{máx} (h)	1,0 (0,9 - 1,8)	1,5 (1,0 - 1,7)	1,0 (0,6 – 3,0)	1,5 (1,2 - 2,5)
C _{máx} (ng/mL)	8789,5 (5201,1 – 16530,4)	5336,1 (2663,4 - 8665,8)	20804,0 (12708,2 – 26362,8) ^{b, d}	11713,5 (7979,9 – 15446,1) ^{e, f}
Cl _{Tf} (mL/h/kg)	232,8 (39,8 - 607,9)	443,4 (90,4 - 1295,6)	173,0 (88,7 - 302,6) ^d	405,3 (176,3 - 541,4)

Fonte: Do autor.

Legenda: AUC^{0-∞}: área sob a curva;

t_{1/2}: meia-vida;

T_{máx}: tempo de concentração máxima;

C_{máx}: concentração máxima;

Cl_{Tf}: *clearance* total aparente.

^a p<0,05 controle FB vs. controle FB com inibidor

^b p< 0,05 controle FB vs. epiléptico FB

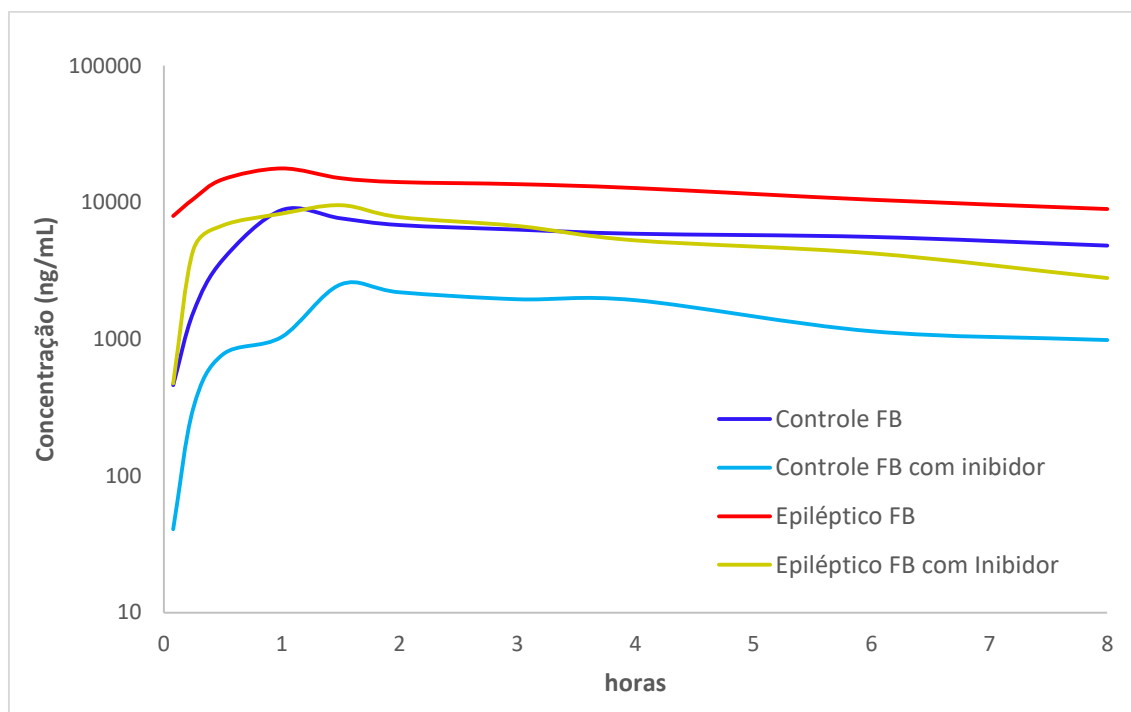
^c p<0,05 controle FB vs. epiléptico FB com inibidor

^d p<0,05 controle FB com inibidor vs. epiléptico FB

^e p<0,05 controle FB com inibidor vs. epiléptico FB com inibidor

^f p<0,05 epiléptico FB vs. epiléptico FB com inibidor

Figura 13 – Curvas médias para concentração plasmática de fenobarbital (FB) em função do tempo para os grupos controle FB, controle FB com inibidor da P-gp, epiléptico FB e epiléptico FB com inibidor da P-gp. Dados apresentados como média (n=8, para cada perfil farmacocinético).



Fonte: Do autor.

Ao se observar a Tabela 11, o grupo controle FB com a coadministração do inibidor, notou-se uma redução em meia-vida (4,2 vs. 8,3 h), $C_{m\acute{a}x}$ (5336,1 vs. 8789,5 ng/mL) e $AUC^{0-\infty}$ (31965,8 vs. 129379,7 ng.h/mL) em comparação ao grupo controle FB sem inibidor. Comparando-se posteriormente o grupo epiléptico FB com o grupo controle FB, notou-se aumento em $C_{m\acute{a}x}$ (20804,0 vs. 8789,5 ng/mL) e $AUC^{0-\infty}$ (201235,9 vs. 129379,7 ng.h/mL). Porém ao administrar o inibidor da P-gp para o grupo epiléptico (grupo epiléptico FB com inibidor), observou-se redução em meia-vida (3,7 vs. 5,9 h), $C_{m\acute{a}x}$ (11713,5 vs. 20804,0 ng/mL) e $AUC^{0-\infty}$ (74406,2 vs. 201235,9 ng.h/mL) quando comparado ao grupo epiléptico FB sem inibidor, semelhante ao achado no uso do inibidor no grupo controle FB com inibidor.

Na Figura 13, é possível observar a diferença nos parâmetros $AUC^{0-\infty}$ e $C_{m\acute{a}x}$ entre os grupos, já que os grupos controle FB com inibidor e epiléptico FB com inibidor tiveram uma significativa redução na curva farmacocinética.

6.2.4 Fenitoína

Na Tabela 12 estão expressos os parâmetros farmacocinéticos obtidos para a fenitoína (FN) nos grupos controle FN, controle FN com inibidor, epiléptico FN e epiléptico FN com inibidor. Na Figura 14, estão ilustrados os perfis farmacocinéticos pós-administração de fenitoína, comparando-se os grupos controle FN, controle FN com inibidor, epiléptico FN e epiléptico FN com inibidor.

Tabela 12 - Parâmetros farmacocinéticos da fenitoína (FN) para os grupos controle FN, controle FN com inibidor, epiléptico FN e epiléptico FN com inibidor (n=8, por grupo), após administração de fenitoína (30mg/kg - via oral) e inibidor verapamil administrado 2 horas antes da fenitoína (10mg/kg - via oral). Dados apresentados como: mediana; Intervalo de confiança.

Parâmetros	Controle FN	Controle FN com inibidor	Epiléptico FN	Epiléptico FN com inibidor
AUC ^{0-∞} (ng.h/mL)	2393,4 (1295,8 - 5109,1)	2353,7 (1441,0 - 4310,4)	9860,2 (7593,0 - 12352,1) ^{b, d}	5823,9 (2696,8 - 11781,9) ^{c, e}
t _{1/2} (h)	2,3 (1,7 - 3,7)	2,6 (2,0 - 3,7)	4,6 (2,8 - 8,4) ^{b, d}	2,9 (1,7 - 5,4)
T _{máx} (h)	0,8 (0,5 - 1,0)	1,0 (0,8 - 1,6) ^a	1,0 (0,7 - 1,4)	1,0 (0,6 - 1,4)
C _{máx} (ng/mL)	1311,5 (792,4 - 2173,1)	859,0 (496,2 - 1222,7)	2547,7 (1471,9 - 3951,2) ^d	1757,3 (1224,4 - 2697,5) ^e
Cl _{Tf} (mL/h/kg)	1300,0 (597,6 - 2031,3)	1500,0 (1020,2 - 2063,8)	330,6 (181,3 - 586,7) ^{b, d}	725,3 (222,8 - 1025,4) ^e

Fonte: Do autor.

Legenda: AUC^{0-∞}: área sob a curva;

t_{1/2}: meia-vida;

T_{máx}: tempo de concentração máxima;

C_{máx}: concentração máxima;

Cl_{Tf}: clearance total aparente.

^a p<0,05 controle FN vs. controle FN com inibidor

^b p< 0,05 controle FN vs. epiléptico FN

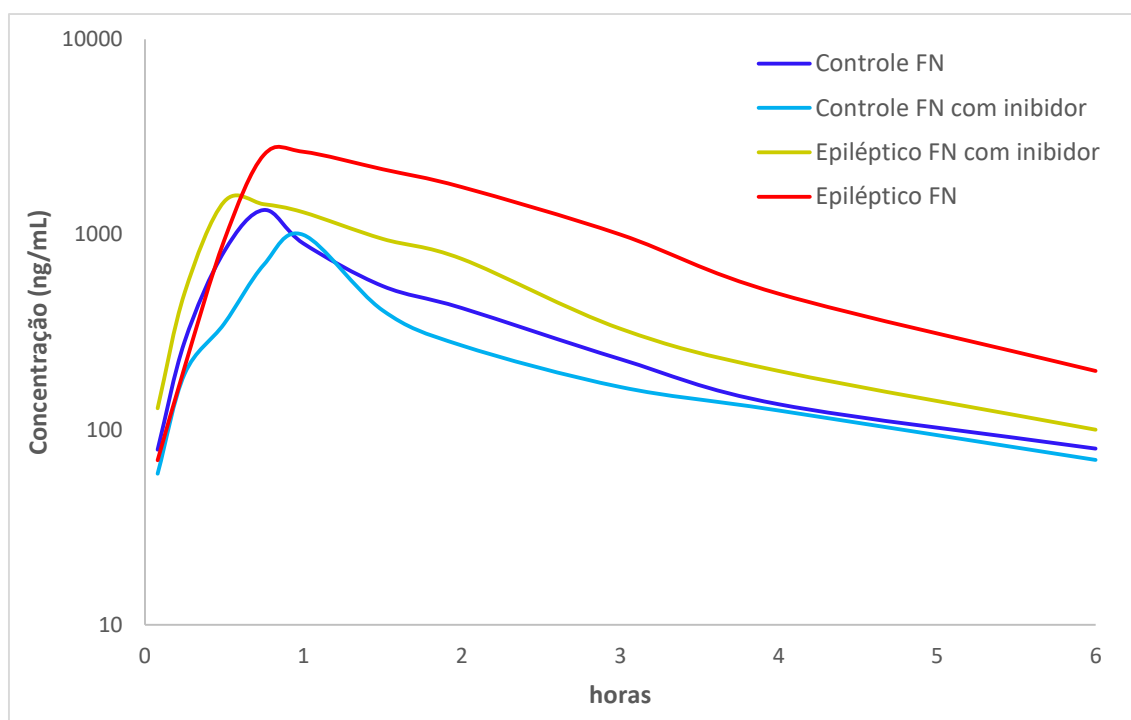
^c p<0,05 controle FN vs. epiléptico FN com inibidor

^d p<0,05 controle FN com inibidor vs. epiléptico FN

^e p<0,05 controle FN com inibidor vs. epiléptico FN com inibidor

^f p<0,05 epiléptico FN vs. epiléptico FN com inibidor

Figura 14 – Curvas médias para concentração plasmática de fenitoína (FN) em função do tempo para os grupos controle FN, controle FN com inibidor da P-gp, epiléptico FN e epiléptico FN com inibidor da P-gp. Dados apresentados como média (n=8, para cada perfil farmacocinético).



Fonte: Do autor.

Como pode ser observado na Tabela 12, não foram observadas diferenças estatísticas significativas no uso do inibidor quando comparado aos grupos sem inibidor. Já na comparação entre os grupos controle FN e epiléptico FN, notou-se um aumento na meia-vida (2,3 vs. 4,6 h), no $C_{máx}$ (1311,5 vs. 2547,7 ng/mL) e no $AUC^{0-\infty}$ (2393,4 vs. 9860,2 ng.h/mL) e redução no *clearance* (1300,0 vs. 330,6 mL/h/kg). Na Figura 14 é possível observar essa diferença entre os perfis farmacocinéticos do grupo epiléptico FN e controle FN.

7 DISCUSSÃO

Para desenvolvimento deste trabalho, em primeiro momento, foram desenvolvidas e validadas metodologias bioanalíticas para a quantificação de fenitoína e fenobarbital em plasma de rato. A determinação de fexofenadina e carbamazepina foram realizadas empregando metodologias bioanalíticas desenvolvidas e validadas previamente pelo nosso grupo de pesquisa (COSTA *et al.*, 2016; PLACIDO *et al.*, 2017).

Os métodos desenvolvidos e validados com preparo de amostra simples e quantificação por UHPLC-MS/MS do fenobarbital e fenitoína em plasma de rato demonstraram ser seletivos, precisos e exatos, além de apresentarem limites de quantificação satisfatórios e linearidade em intervalo de 25 – 2500ng/mL para o fenobarbital e de 25 – 1000ng/mL para a fenitoína. O tempo de análise cromatográfica foi de 8 minutos para ambos os métodos. Ainda, os dois métodos apresentaram baixo fluxo de fase móvel, com redução de utilização de solventes. O preparo de amostra empregou quantidade reduzida de plasma e de solventes para extração, sendo simples e rápido, sendo considerado adequado para a realização de estudos farmacocinéticos. Desta forma, tais métodos foram considerados eficazes para a quantificação desses fármacos em plasma de rato, para os limites utilizados neste estudo.

Patel *et al.* (2021), empregando extração líquido-líquido com hexano obtiveram um método para quantificação de fenitoína abrangendo uma curva analítica de 60 – 12000ng/mL e com um tempo total de corrida de 4 minutos.

Samadi *et al.* (2019), desenvolveram um método para quantificação de fenobarbital empregando preparo de amostra por precipitação de proteínas com acetonitrila. Sua curva analítica foi linear no intervalo de 1-40µg/mL, com um tempo de corrida de 20 minutos.

Hassib *et al.* (2018), apresentaram um método para quantificação de fenobarbital e fenitoína, utilizando preparo de amostra por meio de extração líquido-líquido com éter dietílico. A curva analítica obtida para os dois fármacos foi linear no intervalo de 250-20000ng/mL e o tempo de análise cromatográfica foi de 3 minutos.

Qu *et al.* (2016), quantificaram fenobarbital e fenitoína empregando

preparo de amostra por extração em fase sólida. Eles obtiveram um limite de quantificação de 8ng/mL para ambos os fármacos e uma curva analítica linear entre 8ng/mL-2500µg/mL e o tempo total de corrida foi de 13 minutos.

Em comparação aos métodos desenvolvido neste trabalho, obtivemos um tempo total de corrida para ambos os métodos de 8 minutos, estando com tempo médio aos da literatura, que possui métodos entre 3 (HASSIB *et al.*, 2018) até 20 minutos (SAMADI *et al.*, 2019). Em relação a faixa linear, o trabalho de Qu *et al.* (2016), obteve um valor menor, porém comparado aos outros trabalhos o nosso alcançou um menor valor de LIQ. Ressalta-se que os valores foram adequados para as amostras de nosso estudo.

Em relação ao preparo de amostra, a extração em fase sólida (QU *et al.* 2016), possui um valor agregado maior para a realização, devido ao custo dos cartuchos C₁₈ de extração, além do tempo de processamento para cada amostra. O método por precipitação de proteínas (SAMADI *et al.* 2019) tem etapa maior para o preparo da amostra, uma vez que concentrar o volume de acetonitrila utilizado no preparo é maior. Portanto, nosso método possui técnica de preparo de baixo custo e com facilidade para ser realizada, adequado à estudos farmacocinéticos com volume muito grande de amostras, sendo semelhante aos trabalhos de Patel *et al.* (2021) e Hassib *et al.* (2018).

Em suma, nosso método desenvolvido apresentou bons parâmetros cromatográficos, apesar de na literatura existirem métodos com detectabilidade superior, mas foi eficaz em cumprir sua proposta de realizar a quantificação plasmática de fenobarbital e fenitoína em plasma de rato para aplicação farmacocinética, com um baixo custo e de forma rápida.

Com a determinação dos valores de concentração plasmática para os grupos de animais incluídos neste estudo para os diferentes fármacos obtidos, foi realizada a determinação dos parâmetros farmacocinéticos para os fármacos fexofenadina, carbamazepina, fenobarbital e fenitoína em todos os grupos incluídos no estudo.

A biodisponibilidade da fexofenadina, evidenciada pelo parâmetro AUC, após a administração do inibidor da P-gp no grupo controle FX com inibidor aumentou em comparação ao grupo controle FX sem inibidor (3022,0 vs. 766,4 ng.h/mL – aumento de aproximadamente 4 vezes). Yasui-Furukori *et al.* (2005), também notaram aumento do AUC da fexofenadina, quando administrado o

inibidor da P-gp em cerca de 2 vezes. Pode-se dizer que, no intestino a P-gp realiza a ação de efluxo para impedir a absorção do fármaco; uma vez inibida, a absorção do fármaco será aumentada.

Em relação ao *clearance* da fexofenadina no grupo controle FX com inibidor em relação ao grupo controle FX, foi observada diminuição (3374,5 vs. 13110,0 mL/h/kg – redução para aproximadamente 25%). Yasui-Furukori *et al.* (2005), também notaram redução para *clearance* da fexofenadina quando administrado o inibidor da P-gp, para cerca de 27%. A eliminação da fexofenadina acontece predominantemente em sua forma inalterada pela urina (aproximadamente 95%) (CHEN; HSU, 2014). Ao se associar o uso da fexofenadina ao inibidor, ocorreu também o bloqueio da atividade de efluxo da P-gp presente nos rins, que consequentemente alterou o *clearance* uma vez que esta é a principal rota de eliminação da fexofenadina.

Esta diminuição no *clearance* no grupo controle FX com inibidor também resultou em aumento da meia-vida de eliminação do fármaco quando comparado ao grupo controle FX (18,9 vs. 8,1 h).

Bansal *et al.* (2009), também notaram diferenças nos parâmetros farmacocinéticos de fármaco substrato da P-gp (irinotecan) quando administrado inibidor verapamil (10mg/kg - via oral) antes de sua administração. Os valores de *clearance* foram reduzidos pela metade e, consequentemente, a biodisponibilidade aumentou (de 2 a 3 vezes). O aumento da biodisponibilidade se deve ao aumento da absorção do fármaco, que resulta em um aumento do $C_{m\acute{a}x}$ da irinotecan e também da diminuição do *clearance* renal, onde a P-gp atua eliminando o substrato para a urina em formação. Nos hepatócitos a P-gp favorece a metabolização e eliminação biliar, que foi comprovado pela dosagem do fármaco na bile excretada (LIPPERT *et al.*, 1995).

O uso de um indutor da P-gp causa os efeitos opostos; Hamman *et al.* (2001), administraram rifampicina que é indutor da P-gp, antes da administração da fexofenadina. Neste caso foi notado aumento do *clearance* e diminuição da biodisponibilidade.

Sabe-se que a epilepsia eleva a expressão da P-gp na barreira hematoencefálica nos pacientes; estes achados foram observados em tecidos do SNC de pacientes epiléticos submetidos à cirurgia, em comparação a indivíduos saudáveis (ZHANG *et al.*, 2012). Placido *et al.* (2017) realizaram a

imunoistoquímica cerebral em animais WAR e detectaram aumento da expressão da P-gp em comparação ao grupo controle, principalmente em torno de vasos sanguíneos de pequeno e médio porte, onde a barreira hematoencefálica desempenha seu efeito. Nos WAR resistentes, que não desenvolveram ELT, este aumento foi ainda maior. O aumento da expressão de P-gp pode representar um mecanismo de detoxificação para eliminação de neurotransmissores cerebrais, pois as crises convulsivas são fenômenos definidos bioquimicamente pelo desequilíbrio entre os neurotransmissores inibitórios e excitatórios, dentre eles, os principais são GABA e glutamato, respectivamente.

A indução química pela pilocarpina é um modelo muito conhecido por mimetizar os sinais e sintomas da epilepsia (COVOLAN *et al.*, 2000; CURIA *et al.*, 2008). Na literatura foi demonstrado que o modelo de indução pela pilocarpina associa-se a aumento da expressão da P-gp (VAN VLIET *et al.* 2005; BANKSTAHL, LÖSCHER, 2008).

Em relação ao grupo epilético, foi possível relacionar a comparação com os dados obtidos em um trabalho anterior do grupo (PLACIDO *et al.*, 2017). Nesse estudo, foi realizada a farmacocinética da fexofenadina para os grupos epiléticos WAR, que são uma cepa geneticamente susceptíveis a epilepsia, ou seja, que possuem *background* genético para desenvolvimento da epilepsia. Esses animais foram divididos em WAR com epilepsia do lobo temporal (WAR com ELT) e WAR resistente (que não apresentaram recrutamento límbico durante o estímulo audiogênico para a indução da epilepsia, pelo qual esses animais passaram).

A farmacocinética foi determinada sob as mesmas condições atuais e os valores de mediana obtidos para o grupo WAR com ELT foram: $AUC^{0-\infty}$ 746,4 ng.h/mL; $t_{1/2}$ 7,6 h; $T_{máx}$ 0,3 h; $C_{máx}$ 340,2 ng/mL; *clearance* 14104,0 mL/h/kg, e para o WAR resistente foram: $AUC^{0-\infty}$ 1659,7 ng.h/mL; $t_{1/2}$ 22,0 h; $T_{máx}$ 0,3 h; $C_{máx}$ 296,7 ng/mL; *clearance* 6620,2 mL/h/kg.

Comparando-se o grupo epilético FX aos dados obtidos para os grupos WAR, notou-se um perfil semelhante ao grupo WAR com ELT ($AUC^{0-\infty}$ 766,5 vs. 746,4 ng.h/mL; $T_{máx}$ 0,3 h para ambos; *clearance* 13069,0 vs. 14104,0 mL/h/kg), com meia-vida que se assemelha ao WAR resistentes (23,3 vs. 22,0 h). Ressalta-se porém o $C_{máx}$ menor que estes grupos (104,2 vs. 340,2ng/mL para WAR com

ELT e 296,7ng/mL para WAR resistente).

Ao se administrar o inibidor da P-gp para o grupo epiléptico FX com inibidor, notou-se aumento no tempo necessário para atingir o $C_{m\acute{a}x}$ ($T_{m\acute{a}x}$) (1,1 vs. 0,3h para grupos epiléptico FX, WAR com ELT e WAR resistente). Também foi observado para o grupo epiléptico FX com inibidor a redução do $C_{m\acute{a}x}$ (34,8 vs. 104,2ng/mL no grupo epiléptico FX, 340,2ng/mL no grupo WAR com ELT e 296,7ng/mL no grupo WAR resistente). Uma vez que a P-gp é expressa na barreira hematoencefálica, ao se inibi-la, pode ter acontecido aumento de distribuição da fexofenadina para o SNC e também para outros órgãos, onde a P-gp possa estar impedindo o acesso (LAZAROWSKI *et al*, 2004a). Isso pode ser demonstrado pelo parâmetro farmacocinético $C_{m\acute{a}x}$ estar menor quando comparado aos demais grupos (PLACIDO *et al.*, 2017). *Clearance* e meia-vida do grupo epiléptico FX com inibidor permaneceram semelhantes ao grupo epiléptico FX (15595,7 vs. 13069,0 mL/h/kg; 21,1 vs. 23,3 h).

No parâmetro AUC^{0-3h} nota-se uma redução entre os grupos controle FX vs. controle FX com inibidor (223,9 vs. 154,94 ng.h/mL), e entre epiléptico FX vs. epiléptico FX com inibidor (136,4 vs. 71,3 ng.h/mL). Essa redução possivelmente é decorrente do efeito do inibidor da atividade do verapamil sobre a P-gp, que bloqueou a ação de efluxo dessa glicoproteína, ocasionando assim uma maior distribuição da fexofenadina para outros compartimentos, dentre eles possivelmente o SNC.

Ao se realizar a análise dos parâmetros farmacocinéticos da carbamazepina não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os grupos para os parâmetros farmacocinéticos analisados.

No trabalho de Höcht *et al.* (2009), foi utilizado o modelo de indução de epilepsia por ácido mercaptopropiônico. O inibidor da P-gp utilizado foi nimodipina, que é um fármaco semelhante ao verapamil. Nos resultados obtidos para o plasma, não foram observadas diferenças estatísticas entre os 4 grupos (controle, controle com inibidor, epiléptico e epiléptico com inibidor); no hipocampo dos animais também não foram notadas diferenças entre os grupos, sendo, portanto, semelhante aos resultados encontrados por nosso trabalho com modelo experimental induzido por pilocarpina. Porém, no trabalho de Höcht *et al.* (2009), a farmacocinética foi realizada no período de a 0 a 3 horas e a administração foi intraperitoneal.

Costa *et al.* (2016), realizaram a comparação da farmacocinética da carbamazepina entre ratos controle e o modelo WAR, porém sem indução por kindling audiogênico. Em seu trabalho foi determinado um $AUC^{0-\infty}$ de 19539,0 ng.h/mL para o grupo controle e 11021,0 ng.h/mL para o grupo WAR, sendo que não houveram diferenças estatísticas entre os grupos. Comparando-se com os resultados obtidos em nosso trabalho, notamos semelhanças em valores de $AUC^{0-\infty}$ entre os grupos controle e controle CB (19539,0 vs. 16638,2 ng.h/mL) e grupos entre os grupos epiléticos WAR e epilético CB induzido pela pilocarpina (11021,0 vs. 14519,5 ng.h/mL).

Na literatura, diversos autores divergem sobre a carbamazepina ser ou não substrato da P-gp. Owen *et al.* (2001), afirmam que a carbamazepina não é substrato da P-gp. Porém, seu estudo foi conduzido em camundongos e não envolveu uso de animais epiléticos. Höcht *et al.* (2009), também não observaram diferenças na farmacocinética da carbamazepina entre os grupos epiléticos e controle. Porém, Potschka, Fedrowitz e Löscher (2001) notaram diferença na concentração de carbamazepina no hipocampo e o uso do inibidor da P-gp se mostrou eficaz; entretanto a administração do inibidor se deu por uma infusão contínua. Ma *et al.* (2013), também obtiveram diferenças na concentração de carbamazepina no hipocampo e o uso do inibidor também se mostrou eficaz para a elevação da concentração de carbamazepina no período de 0 a 3 horas. Estes dois trabalhos que observaram diferenças utilizaram o modelo elétrico de indução de epilepsia.

Em estudo com crianças que apresentavam epilepsia refratária, em 33% das amostras foi encontrado nível subterapêutico nos pacientes que foram submetidos ao tratamento com carbamazepina. Isto pode ter ocorrido pelo aumento da expressão da P-gp na barreira hematoencefálica e pelo aumento da excreção em órgãos como o fígado (LAZAROWSKI *et al.*, 2004b).

Portanto, podemos notar que a carbamazepina não é um substrato ideal para se notar a influência da P-gp na epilepsia, uma vez que os resultados na literatura são controversos.

Sabe-se que em humanos a carbamazepina sofre sim o efeito de efluxo da P-gp, conforme descrito por Lazarowski *et al.* (2004b). Isto pode ocorrer devido à possível diferença estrutural entre a P-gp em ratos e humanos, que modifica a afinidade da carbamazepina por ambas, levando às diferenças

observadas.

Há relatos na literatura de que a carbamazepina também é indutora da P-gp; desta forma, pode acontecer a indução da expressão da P-gp pela carbamazepina, e com isto aumenta ainda mais a sua eliminação, ocasionado diminuição dos seus níveis plasmáticos (YAMADA *et al.*, 2009; AKAMINE *et al.*, 2011; LUND; PETERSEN; DALHOFF, 2017). Nestes estudos de farmacocinética em ratos, o experimento foi realizado poucas horas após a administração da carbamazepina. Desta forma, o efeito indutor de P-gp ainda não foi estabelecido; entretanto em pacientes que fazem uso crônico deste fármaco, como no estudo com crianças com epilepsia refratária, possivelmente houve um aumento por dois fatores para a expressão da P-gp, devido à epilepsia e ao uso da carbamazepina.

Enquanto as análises referentes à carbamazepina demonstraram que esse fármaco não é um bom substrato da P-gp, as análises do fenobarbital e da fenitoína forneceram resultados mais interessantes. Höcht *et al.* (2009), avaliaram a farmacocinética de fenobarbital no hipocampo, comparando-se ratos sadios e epiléticos induzidos por ácido mercaptopropiônico e também o uso de nimodipina como inibidor da P-gp. Nos parâmetros $C_{m\acute{a}x}$ e $AUC^{0-\infty}$ notou-se uma redução no grupo epilético quando comparado ao grupo controle. Segundo os autores, isso ocorreu devido ao aumento da P-gp na barreira hematoencefálica que impediu o acesso do fármaco ao hipocampo. Ao utilizar o inibidor da P-gp, houve um aumento no $C_{m\acute{a}x}$ e $AUC^{0-\infty}$, pois a P-gp foi bloqueada e o efeito do efluxo foi reduzido, permitindo um maior acesso do fármaco.

Comparando-se a farmacocinética do fenobarbital realizada em nosso trabalho frente ao trabalho de Höcht *et al.* (2009), enquanto o $C_{m\acute{a}x}$ e $AUC^{0-\infty}$ tiveram redução no hipocampo para o grupo epilético comparado ao grupo controle, em nosso trabalho foi notado um aumento do $C_{m\acute{a}x}$ e $AUC^{0-\infty}$ quando comparou-se o grupo epilético FB com o controle FB ($C_{m\acute{a}x}$: 20804,0 vs. 8789,5 ng/mL; $AUC^{0-\infty}$ 201235,9 vs. 129379,7 ng.h/mL). Portanto, esse resultado demonstra que de fato o acesso ao SNC poderia estar reduzido devido ao aumento da atividade de P-gp na barreira hematoencefálica. Esse possível aumento da expressão da P-gp impediu a passagem do fármaco para o SNC, ocasionando o aumento da quantidade do fármaco no sangue periférico. Ao se

analisar o uso do inibidor, Höcht *et al.* (2009), notaram um aumento do $C_{m\acute{a}x}$ e $AUC^{0-\infty}$ dos grupos epil\u00e9pticos comparados ao grupo sem inibidor, demonstrando que, ao inibir a P-gp, houve aumento da concentra\u00e7\u00e3o cerebral de fenobarbital, resultando em uma diminui\u00e7\u00e3o da concentra\u00e7\u00e3o perif\u00e9rica do f\u00e1rmaco. Em nosso trabalho, notou-se uma redu\u00e7\u00e3o do $C_{m\acute{a}x}$ e $AUC^{0-\infty}$ na compara\u00e7\u00e3o do grupo epil\u00e9ptico FB com inibidor vs. grupo epil\u00e9ptico FB ($C_{m\acute{a}x}$ 11713,5 vs. 20804,0 ng/mL; $AUC^{0-\infty}$ 74406,2 vs. 201235,9 ng.h/mL).

Liu *et al.* (2007), notaram o aumento da express\u00e3o da P-gp na barreira hematoencef\u00e1lica em ratos com epilepsia induzida quimicamente pelo protocolo do pentilenotetrazol, assim como redu\u00e7\u00e3o da distribui\u00e7\u00e3o de fenobarbital para o c\u00f3rtex e hipocampo dos animais epil\u00e9pticos no intervalo de 60 minutos, com um leve aumento na concentra\u00e7\u00e3o plasm\u00e1tica devido ao efluxo na barreira hematoencef\u00e1lica. Posteriormente, foi avaliado o uso de ciclosporina A, um inibidor da P-gp, e observou-se aumento da distribui\u00e7\u00e3o do fenobarbital para o c\u00f3rtex e hipocampo devido a inibi\u00e7\u00e3o do efluxo na barreira.

Brandt *et al.* (2006), avaliaram o uso de tariquidar como inibidor da P-gp em ratos com epilepsia induzida pelo modelo el\u00e9trico. Ao se administrar o tariquidar juntamente com o fenobarbital, notou-se redu\u00e7\u00e3o nas crises convulsivas dos animais, que apresentavam resist\u00eancia ao tratamento de fenobarbital.

Jing *et al.* (2010), al\u00e9m de avaliarem a distribui\u00e7\u00e3o do fenobarbital em ratos induzidos a epilepsia pelo modelo do pentilenotetrazol, tamb\u00e9m avaliaram o uso cr\u00f4nico do fenobarbital como indutor do aumento da express\u00e3o de P-gp no c\u00e9rebro. O fenobarbital diminuiu os efeitos convulsivos nos primeiros dias da indu\u00e7\u00e3o, por\u00e9m ao decorrer dos 40 dias da indu\u00e7\u00e3o ele perdeu o efeito gradativamente. Quando se quantificou a express\u00e3o da P-gp, foi poss\u00edvel notar aumento da express\u00e3o nos primeiros dias devido \u00e0 epilepsia, por\u00e9m ao decorrer dos 40 dias do estudo, foi notado aumento da express\u00e3o, devido ao uso cr\u00f4nico do fenobarbital. Ao se avaliar a distribui\u00e7\u00e3o do fenobarbital, que foi quantificado nos dias 14 e 40 do estudo, foi observada diminui\u00e7\u00e3o da concentra\u00e7\u00e3o do fenobarbital no hipocampo com o passar do tempo. Esse efeito foi notado tanto no grupo epil\u00e9ptico tratado com fenobarbital, como no grupo controle tratado com fenobarbital. Portanto, o aumento da express\u00e3o da P-gp nos pacientes

refratários pode ocorrer devido a somatória dos efeitos agudos da epilepsia com os efeitos do uso crônico do fenobarbital.

Além disso, fatores genéticos podem contribuir para a resistência ao tratamento por fenobarbital. Keangraphun *et al.* (2015), avaliaram o polimorfismo de um gene responsável por codificar a P-gp (*ABCB1*) em pacientes tailandeses que faziam o uso de fenobarbital como tratamento a epilepsia. Nos pacientes resistentes ao tratamento com fenobarbital, foi notado aumento do genótipo *ABCB1 3435CC* nos pacientes com epilepsia focal. Essa modificação contribui para o aumento das crises convulsivas, aumento da expressão da P-gp e diminuição das concentrações de fenobarbital no SNC.

Em relação a fenitoína, Höcht *et al.* (2007), analisaram a farmacocinética da fenitoína no período de 0 a 3 horas, comparando-se ratos saudáveis e ratos com epilepsia induzida pelo ácido mercaptopropiônico, ainda avaliaram o uso de nimodipina como inibidor da P-gp. No hipocampo foi notada diminuição do $C_{máx}$ e $AUC^{0-\infty}$ nos ratos epiléticos, quando comparado ao grupo controle devido ao bloqueio imposto pela P-gp na barreira hematoencefálica. Isso é condizente com nossos resultados, uma vez que se houve menor entrada do fármaco ao SNC, uma maior quantidade foi quantificada no sangue periférico do grupo epilético FN vs. controle FN ($C_{máx}$ 2547,7 vs. 1311,5 ng/mL; $AUC^{0-\infty}$ 9860,2 vs. 2393,4 ng.h/mL). Já quando administrou-se a nimodipina no trabalho de Höcht *et al.* (2007), o $C_{máx}$ e $AUC^{0-\infty}$ aumentaram no hipocampo, demonstrando que ao impedir a atividade de efluxo da P-gp, houve maior entrada do fármaco ao SNC o que se espelha em nosso trabalho: tendência de redução destes parâmetros ao se utilizar o verapamil, quando compara-se o grupo epilético FN com inibidor com o grupo epilético FN, porém sem diferença estatística ($C_{máx}$ 1757,3 vs. 2547,7 ng/mL e $AUC^{0-\infty}$ 5823,9 vs. 9860,2 ng.h/mL).

Van Vliet *et al.* (2007), demonstraram que o aumento da expressão da P-gp na barreira hematoencefálica de ratos com epilepsia induzida pelo modelo elétrico contribuiu para a redução na concentração de fenitoína no SNC.

Alvariza *et al.* (2013), avaliaram o uso do verapamil sobre a farmacocinética da fenitoína, para verificar se haveria aumento na biodisponibilidade do fármaco, uma vez que o verapamil bloquearia o efluxo da P-gp, impedindo o efeito de primeira passagem intestinal e a eliminação

hepática. Porém, em seu trabalho não foram verificadas diferenças em biodisponibilidade da fenitoína. Esse resultado ocorreu devido a fenitoína ser metabolizada por outras enzimas hepáticas, como CYP2C6 e CYP2C11. Esse resultado corrobora para nossos achados na comparação entre grupo controle FN e controle FN com inibidor, sem observação de diferença relevante entre os grupos ($C_{\text{máx}}$ 1311,5 vs. 859,0 ng/mL e $AUC^{0-\infty}$ 2393,4 vs. 2353,7 ng.h/mL).

Além disso, o uso crônico da fenitoína pode levar ao aumento da expressão da P-gp em órgãos como barreira hematoencefálica, intestino e fígado (ALVARIZA et al., 2014). Uma vez que a fenitoína é substrato da P-gp, em casos de uso crônico pelo paciente, haverá declínio na biodisponibilidade do fármaco, levando à doses subterapêuticas e refratariedade ao tratamento. Os mesmos autores observaram que quando o tratamento com fenitoína foi suspenso o nível dos transportadores retornou ao nível basal.

Wen *et al.* (2008), avaliaram o aumento da expressão da P-gp no SNC pelo uso crônico de fenitoína, carbamazepina e fenobarbital por 21 dias em ratos. Ao decorrer dos 21 dias, foi notado aumento significativo da expressão da P-gp, principalmente no hipocampo, sendo que, dentre os 3 fármacos, a fenitoína foi o fármaco que apresentou uma maior indução do aumento da expressão da P-gp. Além da quantificação da P-gp, também foi avaliada a distribuição de rodamina 123, um marcador da atividade da P-gp, e foi possível notar redução da sua distribuição para o córtex e hipocampo após o uso crônico pelos anticonvulsivantes, devido ao efluxo estar aumentado na barreira hematoencefálica.

Com base nos resultados discutidos anteriormente, é possível notar que o aumento da expressão da P-gp na barreira hematoencefálica representa um importante mecanismo para os casos de refratariedade ao tratamento na epilepsia. Porém, outros mecanismos também estão relacionados a essa refratariedade, como causas genéticas, medicamentos que são indutores tanto da expressão da P-gp, bem como de enzimas metabolizadoras e possivelmente outras causas ainda não descobertas.

Nosso estudo com modelo experimental de epilepsia induzida por pilocarpina, com modelo de administração de dose única de anticonvulsivantes, por via oral (gavagem) sem coadministração e associado a inibidor da P-gp mostrou que não há diferenças estatísticas entre os grupos para a

carbamazepina. Porém, para fenitoína e fenobarbital, foram encontradas diferenças (o inibidor reduziu o $AUC^{0-\infty}$ em 40% para a fenitoína e em 63% para o fenobarbital), permitindo um aumento da distribuição dos fármacos, inclusive para o SNC, como demonstrado também pelos trabalhos de Höcht *et al.* (2007) e Höcht *et al.* (2009). Ressalta-se que nosso estudo empregou a administração dos fármacos pela via oral, mesma via utilizada pelos pacientes que utilizam esses fármacos em sua terapia, enquanto Höcht *et al.* (2007) e Höcht *et al.* (2009) administraram o fármaco pela via endovenosa. Portanto, em nossa farmacocinética os fármacos passaram pelo processos absorptivos no trato gastrointestinal, pelo efeito de primeira passagem no fígado, o torna o processo mais semelhante ao dos pacientes. Há de ser ressaltado ainda que nossas colheitas foram planejadas para o período de três a cinco meias-vidas de eliminação de cada fármaco, como maior quantidade de dados realmente observados, adequado ao delineamento de estudos farmacocinéticos. Höcht *et al.* (2007) e Höcht *et al.* (2009) realizaram a farmacocinética no período de 0 à 3 horas, o que leva à extrapolação de grande parte dos perfis, e maior incerteza para os parâmetros calculados.

O uso de inibidor da P-gp associado ao anticonvulsivante é uma alternativa terapêutica promissora, porém requer estudos adicionais, desde o campo da farmacotécnica até estudos clínicos e experimentais, em última instância. A pesquisa por novos fármacos com atividade anticonvulsivante também é campo com potencial a ser explorado, buscando-se novos compostos quem mantenham ação desejada e que não sejam substratos da P-gp, ou acumulem a função de anticonvulsivante e inibidor da P-gp, dentre outros.

8 CONCLUSÕES

- Na avaliação farmacocinética do marcador de atividade da P-gp (fexofenadina) foi possível notar que o inibidor da P-gp (verapamil) reduziu a biodisponibilidade, no período de tempo com maior preponderância de processos absorptivos (0 – 3 horas), e o $C_{m\acute{a}x}$.

- Na avaliação farmacocinética da carbamazepina não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos;

- Na análise farmacocinética do fenobarbital foi possível notar que para o grupo epiléptico houve um aumento do $C_{m\acute{a}x}$ e $AUC^{0-\infty}$, e, que ao se administrar o inibidor da P-gp, foi notada redução para estes parâmetros.

- Na análise farmacocinética da fenitoína foi observado aumento do $C_{m\acute{a}x}$ e da biodisponibilidade no grupo epiléptico, e, que ao se administrar o inibidor da P-gp foi possível notar redução nesses parâmetros.

- O aumento da expressão da P-gp na barreira hematoencefálica contribuiu para o represamento dos fármacos no sangue periférico dos animais epilépticos. Ao se administrar o inibidor, a distribuição dos fármacos foi aumentada, reduzindo o AUC e $C_{m\acute{a}x}$.

- O uso do inibidor da P-gp demonstrou ser uma alternativa em potencial ou um adjuvante no tratamento de pacientes com refratariedade aos tratamentos farmacológicos para epilepsia.

REFERÊNCIAS

AKAMINE, Y. ; MIURA, M. ; YASUI-FURUKORI, N. ; KOJIMA, M.; UNO, T. Carbamazepine differentially affects the pharmacokinetics of fexofenadine enantiomers. **British Journal of Clinical Pharmacology**. v. 73, n. 3, p. 478–481, 2011.

ALLER, S. G. *et al.* Structure of P-glycoprotein Reveals a Molecular Basis for Poly-Specific Drug Binding. **Science**. v. 323, n. 5922, p. 1718-1722, 2009.

ALBRECHT, J.; ZIELIŃSKA, M. Mechanisms of Excessive Extracellular Glutamate Accumulation in Temporal Lobe Epilepsy. **Neurochemical Research**, v. 42, n. 6, p. 1724–1734, 2017.

ALVARIZA, S. *et al.* Verapamil effect on phenytoin pharmacokinetics in rats. **Epilepsy Research**. v. 107, p. 51-55, 2013.

ALVARIZA, S.; FAGIOLINO, P.; VÁSQUEZ, M.; FERIA-ROMERO, I.; OROZCO-SUÁREZ, S. Chronic administration of phenytoin induces efflux transporter overexpression in rats. **Pharmacological Reports**. v. 66, p. 946-951, 2014.

AVANZINI, G.; DEPAULIS, A.; TASSINARI, A.; CURTIS, M. Do seizures and epileptic activity worsen epilepsy and deteriorate cognitive function **Epilepsia**, v. 54, n. 8, p. 14-21, 2013.

BALESTRINI, S.; SISODIYA, S. M. Pharmacogenomics in epilepsy **Neuroscience Letters**, v. 667, p. 27-39, 2018.

BANKSTAHL, J. P.; LOSCHER, W. Resistance to antiepileptic drugs and expression of P-glycoprotein in two rat models of status epilepticus. **Epilepsy Res**. v. 82, p. 70-85, 2008.

BANSAL, T. *et al.* Effect of P-glycoprotein inhibitor, verapamil, on oral bioavailability and pharmacokinetics of irinotecan in rats **European Journal of Pharmaceutical Sciences** v. 36, p. 580-590, 2009.

BEGHI, E. The epidemiology of Epilepsy **Neuroepidemiology** v. 54, n. 2, p. 185-191, 2020.

BEN-ARI, Y. *et al.* Evidence suggesting secondary epileptogenic lesions after kainic acid: pretreatment with diazepam reduces distant but not local brain damage. **Brain Res**. v. 165, n. 2, p. 362-365, 1979.

BRANDT, C; VOLKER, H. A.; LOSCHER, W. Striking Differences in Individual Anticonvulsant Response to Phenobarbital in Rats with Spontaneous Seizures after Status Epilepticus **Epilepsia** v. 45, n. 12, p. 1488-1497, 2004.

BRANDT, C.; BETHMANN, K.; GASTENS, A. M.; LÖSHER, W. The multidrug transporter hypothesis of drug resistance in epilepsy: proof-of-principle in a rat model of temporal lobe epilepsy. **Neurobiology of Disease**. v. 24, p. 202-211, 2006.

BRASIL. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução RDC N.º 27, DE 17 DE MAIO DE 2012. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0027_17_05_2012.html> Acesso em: 23 mai. 2016.

BRODIE, M. J.; SCHACHTER, S. C.; KWAN, P. **Fast Facts: Epilepsy** 5 ed., 2012.

BROWNING, R. A.; NELSON, D. K. Variation in threshold and pattern of electroshock-induced seizures in rats depending on site of stimulation **Life Sciences** v. 37, n. 23, p.2205-2211, 1985.

BRUNSON, K. L.; KHAN, N.; EGHBAL-AHMADI, M.; BARAM, T. Z. Corticotropin (ACTH) acts directly on amygdala neurons to downregulate corticotropin-releasing hormone gene expression. **Ann. Neurol.** v. 49, p. 304-312, 2001.

CARBAJAL, D.; CASACO, A.; ARRUZBABALA, L.; GONZALES, R.; TOLON, T. Pharmacological study of *Cymbopogon citratus* leaves. **J. Ethnopharmacol.** v. 25, p. 103-107, 1989.

CASTRO, O. W.; FURTADO, M. A.; TILELLI, C. Q.; FERNANDES, A.; PAJOLLA, G. P.; GARCIA-CAIRASCO, N. Comparative neuroanatomical and temporal characterization of FluoroJade-positive neuro degeneration after status epilepticus induced by systemic and intrahippocampal pilocarpine in Wistar rats. **Brain research**, v. 1374, p. 43-55, 2011.

CAVALHEIRO, E. A. The pilocarpine model of epilepsy. **The Italian Journal of Neurological Sciences**, v.16, n.1-2, p.33-37, 1995.

CHEN, Y. A.; HSU, K. Y. Pharmacokinetics of fexofenadine in healthy Taiwanese volunteers **Pak. J. Pharm. Sci.** v. 27, n. 5, p. 1261-1264, 2014.

COSTA, L. H. *et al.* Influência da epilepsia na farmacocinética do enalapril e da carbamazepina em ratos. Dissertação de mestrado. 76 f. Universidade Federal de Alfenas. Alfenas. 2016.

COVOLAN L.; RIBEIRO, L. T. C. LONGO, B. M.; MELLO, L. E. A. M. Cell damage and neurogenesis in the dentate granule cell layer of adult rats after pilocarpine- or kainate-induced status epilepticus **Hippocampus** v. 10, p. 169-180, 2000.

CURIA, G. *et al.*, The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy **Journal of Neuroscience Methods** v. 172, n. 2, p. 143-157, 2008.

- CVETKOVIC, M.; LEAKE, B.; FROMM, M. F.; WILKINSON, G. R.; KIM, R. B. OATP and P-glycoprotein transporters mediate the cellular uptake and excretion of fexofenadine **Drug Metabolism and Disposition** v. 27, n. 8, p. 866-871, 1999.
- DARWEESH, R. S.; KHAMIS, T. N.; EL-ELIMAT, T. The effect of cannabidiol on the pharmacokinetics of carbamazepine in rats. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**. 2020
- DELLA PASCHOA, O. E.; MANDEMA, J. W.; VOSKUYL, R. A.; DANHOF, M. Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modeling of the Anticonvulsant and Electroencephalogram Effects of Phenytoin in Rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 284, n. 2, p. 460-466, 1998.
- DE MORAES, N. V.; LAURETTI, G.R.; LANCHOTE, V.L. Effects of type 1 and type 2 diabetes on the pharmacokinetics of tramadol enantiomers in patients with neuropathic pain phenotyped as cytochrome P450 2D6 extensive metabolizers. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 2014.
- DORETTO M.C.; FONSECA C.G.; LOBO R.B.; TERRA V.C.; OLIVEIRA J.A.; GARCIA-CAIRASCO N. Quantitative study of the response to genetic selection of the *Wistar audiogenic rat* strain (WAR). **Behav Genet** v. 33, n. 1, p. 33-42, 2003.
- DRESSER G. K. *et al.* Fruit juices inhibit organic anion transporting polypeptide-mediated drug uptake to decrease the oral bioavailability of fexofenadine. **Clin. Pharmacol. Ther.** v. 71, n. 1, p. 11-20, 2002.
- ENGEL, J. JR., *et al.* Practice parameter: temporal lobe and localized neocortical resections for epilepsy: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology, in association with the American Epilepsy Society and the American Association of Neurological Surgeons. **Neurology**. v. 60, p. 538-547, 2003.
- ELKHAYAT, H. A.; ALY, R. H.; ELAGOUZA, I. A.; EL-KABARITY R. H.; GALAL, Y. I. Role of P-glycoprotein inhibitors in children with drug-resistant epilepsy. **Acta Neurol Scand**. v. 136, p. 639–644, 2017.
- ENRIQUE, A. New model of pharmacoresistant seizures induced by 3-mercaptopropionic acid in mice. **Epilepsy Research**, v. 129, p. 8-16, 2017.
- ENRIQUE, A. V. *et al.* New anticonvulsant candidates prevent P-glycoprotein (P-gp) overexpression in a pharmacoresistant seizure model in mice. **Epilepsy & Behavior**, 2019.
- FANG, M.; XI, Z. Q.; WU, Y.; WANG, X. F. A new hypothesis of drug refractory epilepsy: neural network hypothesis. **Med Hypotheses** v. 76, p. 871–876, 2011.

FERNANDES, M. J. S. Epilepsia do lobo temporal: mecanismos e perspectivas. **Estudos avançados**. v.27, n.77, 2013.

FERREIRA, F. G.; POLLI, M. C.; OSHIMA-FRANCO, Y.; FRACETO, L. F. Farmacos: do desenvolvimento à retirada do mercado **Rev. Eletrônica de Farmácia** v. 6, n. 1, p. 14-24, 2009.

FIEST, K. M. *et al.* Prevalence and incidence of epilepsy. **Neurology**. v. 88, n. 3, p. 296–303, 2017.

GALVIS-ALONSO, O. Y.; OLIVEIRA, J. A. C.; GARCIA-CAIRASCO, N. Limbic epileptogenicity, cell loss and axonal Reorganization induced by audiogenic and amygdale *Kindling* in *wistar audiogenic rats* (war strain) **Neuroscience** v. 125, p. 787-802, 2004.

GARCIA-CAIRASCO, N.; DORETTO, M. C.; LOBO, R. B. Genetic selection of a strain of Wistar rats susceptible to audiogenic seizures. A quantitative analysis. **Epilepsia** v. 31, n. 815, 1996.

GARCIA-CAIRASCO, N.; ROSSETTI, F.; OLIVEIRA, J. A. C.; FURTADO, M. A. Neuroethological study of status epilepticus induced by systemic pilocarpine in Wistar audiogenic rats (WAR strain) **Epilepsy & Behavior** v. 5, n. 4, p.455-463, 2004.

GIACOMINI, K. M. *et al.* Membrane transporters in drug development **Nature Reviews** v. 9, p. 215-236, 2010.

GIACOMINI, K. M.; SUGIYAMA, Y. Membrane transporters and drug response. In: BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. (eds). **Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics**, p. 41–70, 2010.

GOTTESMAN, M. M.; FOJO, T.; BATES, S. E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters **Nature Reviews** v. 2, p. 49-58, 2002.

GRAUMLICH, J. F. *et al.* Carbamazepine pharmacokinetics– pharmacodynamics in genetically epilepsy-prone rats. **European Journal of Pharmacology** v. 369, p. 305-311, 1999.

GREINER, B. *et al.* The role of intestinal P-glycoprotein in the interaction of digoxin and rifampin. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 104, n. 2, p. 147-153, 1999.

HAMMAN, M. A.; BRUCE, M. A.; HAEHNER-DANIELS, B. D.; HALL, S. D. The effect of rifampin administration on the disposition of fexofenadine **Clinical Pharmacology & Therapeutics** v. 69, n. 3, p. 114-121, 2001.

HARTZ, A. M. S. *et al.* P-gp Protein Expression and Transport Activity in Rodent Seizure Models and Human Epilepsy. **Mol. Pharmaceutics** v. 14, p. 999–1011, 2017.

HASSIB, S. T.; HASHEM, H. M. A.; MAHROUSE, M. A.; MOSTAFA, E. A. Determination of four anti-epileptic drugs in plasma using ultra performance liquid chromatography with mass detection technique. **Biomedical Chromatography**. v. 32, n. 8, 2018.

HELLIER, J. L.; PATRYLO, P. R.; BUCKMASTER, P. S.; DUDEK, E. Recurrent spontaneous motor seizures after repeated low-dose systemic treatment with kainate: assessment of a rat model of temporal lobe epilepsy **Epilepsy Research** v. 31, p. 73-84, 1998.

HÖCHT, C. *et al.* Nimodipine restores the altered hippocampal phenytoin pharmacokinetics in a refractory epileptic model. **Neuroscience Letters**, v. 413, p. 168-172, 2007.

HÖCHT, C. Differential hippocampal pharmacokinetics of phenobarbital and carbamazepine in repetitive seizures induced by 3-mercaptopropionic acid. **Neuroscience Letters**, 2009.

ILAE, International League Against Epilepsy. Disponível em: <https://www.ilae.org/> Acesso em: 13/04/17

JANMOHAMED, M.; BRODIE, M. J.; KWAN, P. Pharmacoresistance – Epidemiology, mechanisms and impact on epilepsy. **Neuropharmacology**. 2019.

JING, X. *et al.* Combined effects of epileptic seizure and phenobarbital induced overexpression of P-glycoprotein in brain of chemically kindled rats. **British Journal of Pharmacology**. v. 159, p. 1511-1522, 2010.

JULIANO, R.L. LING, V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants, **Biochim. Biophys. Acta** v. 455, p. 152–162, 1976.

KANDATAVICIUS, L. *et al.* Animal models of epilepsy: use and limitations **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 10, p. 1693-1705, 2014.

KEANGPRAPHUN, T.; TOWANABUT, S.; CHINVARUN, Y.; KIJSANAYOTIN, P. Association of *ABCB1 C3435T* polymorphism with phenobarbital resistance in Thai patients with epilepsy. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**. v. 40, p. 315-319, 2015.

KÖNIG, J.; MÜLLER, F.; FROMM, M. F. Transporters and Drug-Drug Interactions: Important Determinants of Drug Disposition and Effects. **Pharmacol Rev.** v. 65, p. 944-966, 2013.

KWAN, P.; BRODIE, M.J. Refractory epilepsy: a progressive, intractable but a

preventable condition **Seizure**, v. 11, p. 77-84, 2002.

KWAN, P.; BRODIE, M. J. Phenobarbital for the treatment of epilepsy in the 21st century: a critical review. **Epilepsia**, v. 45, n. 9, p. 1141–1149, 2004.

KWAN, P.; BRODIE, M. J. Potential role of drug transporters in the pathogenesis of medically intractable epilepsy. **Epilepsia**, v. 46, p. 224–35, 2005.

KWAN, P.; SCHACHTER, S. C.; BRODIE, M. J. Drug-resistant epilepsy **N. Engl. J. Med.** v. 365, p. 919-926, 2011.

LAZAROWSKI, A. *et al.* Neuronal and Glial Expression of the Multidrug Resistance Gene Product in an Experimental Epilepsy Model. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 24, n. 1, 2004a.

LAZAROWSKI, A. *et al.* Neuronal MDR-1 Gene Expression and Persistent Low Levels of Anticonvulsants in a Child with Refractory Epilepsy. **Ther Drug Monit**, v. 26, n. 1, 2004b.

LAZAROWSKI, A. *et al.* Multidrug-Resistance (MDR) Proteins Develops Refractory Epilepsy Phenotype: Clinical and Experimental Evidences. **Current Drug Therapy**, v. 1, n. 3, p. 291-309, 2006.

LAZAROWSKI, A. *et al.* ABC transporters during epilepsy and mechanisms underlying multidrug resistance in refractory epilepsy. **Epilepsia** v. 48, n. 5, p. 140-149, 2007.

LE, A.; THOMAS, M.; STALLMAN, B.; MEADOWS, K.; BHARGAVA, V. Refractory epilepsy: mechanisms of pharmacoresistance. **Georgetown Scientific Research Journal**. 2021.

LEITE, J. P.; GARCIA-CAIRASCO, N.; CAVALHEIRO, E. A. New insights from the use of pilocarpine and kainate models **Epilepsy Research** v. 50, p. 93-103, 2002.

LI, S.; LIU, Y.; WANG, Q. ABCB1 Gene C3435T Polymorphism and Drug Resistance in Epilepsy: Evidence Based on 8604 Subjects **Med Sci Monit**, v. 21, p. 861-868, 2015.

LIPPERT, C. *et al.* Mass balance and pharmacokinetics of MDL 16455A in healthy male volunteers **Pharm Res** v. 12, 1995.

LÖSCHER, W.; POTSCHKA, H.; SISODIYA, S. M.; VEZZANI, A. Drug resistance in epilepsy: clinical impact, potential mechanisms and new innovative treatment options. **Pharmacological Reviews**. v. 72, p. 606-638, 2020.

LUND, M.; PETERSEN, T. S.; DALHOFF, K. P. Clinical Implications of P-Glycoprotein Modulation in Drug–Drug Interactions. **Drugs**, v. 77, n. 8, p. 859–883, 2017.

- LUKAWSKI, K.; CZUCZWARB, S. J. Understanding mechanisms of drug resistance in epilepsy and strategies for overcoming it. **Expert Opin Drug Metab Toxicol**. 2021.
- MA, A.; WANG, C.; CHEN, Y.; YUAN, W. P-glycoprotein alters blood–brain barrier penetration of antiepileptic drugs in rats with medically intractable epilepsy. **Drug Design, Development and Therapy** v. 7, p. 1447–1454, 2013.
- MING, X.; KNIGHT, B. M.; THAKKER, D. R. Vectorial Transport of Fexofenadine across Caco-2 Cells: Involvement of Apical Uptake and Basolateral Efflux Transporters. **Mol. Pharmaceutics**.v. 8, p. 1677–1686, 2011.
- MORAES, M. F. D.; GALVIS-ALONSO, O. Y.; GARCIA-CAIRASCO, N. Audiogenic kindling in the Wistar rat: a potential model for recruitment of limbic structures **Epilepsy Res**. v. 39, n. 3, p. 251-259, 2000.
- MÜLLER, F.; FROMM, M. F. Transporter mediated drug-drug interaction **Pharmacogenomics**. v. 12, n. 7, p. 1017-1037, 2011.
- NOMURA, S. *et al.* Effects of focal brain cooling on extracellular concentrations of neurotransmitters in patients with epilepsy. **Epilepsia**, v. 58, n. 4, p. 627–634, 2017.
- O'BRIEN, F. E.; DINAN, T. G.; GRIFFIN, B. T.; CRYAN, J. F. Interactions between antidepressants and P-glycoprotein at the blood-brain barrier: clinical significance of *in vitro* and *in vivo* findings **British Journal of Pharmacology** v. 165, p. 289-312, 2012.
- ORSINI, A.; ZARA, F.; STRIANO, P. Recent advances in epilepsy genetics **Neuroscience Letters**, v. 667, p. 4-9, 2018.
- OWEN, A. Carbamazepine is not a substrate for P-glycoprotein. **J Clin Pharmacol**, v. 51, p. 345-349, 2001.
- PASTORE, M. E.; OFUCHI, A. S.; NISHIYAMA, P. Monitorização terapêutica de fenobarbital. **Acta Scientiarum - Health Sciences**, v. 29, n. 2, p. 125–131, 2007.
- PATEL, A. I. *et al.* Rapid, sensitive and simple LC-MS/MS method development and validation for estimation of phenytoin in human plasma by using deuterated internal standard. **Research Journal of pharmacy and Technology**. v. 14, n. 6, 2021.
- PERUCCA, E.; TOMSON, T. The pharmacological treatment of epilepsy in adults **Lancet Neurol** v. 10, p. 446-456, 2011.

PINEL, J. P.; ROVNER, L. I. Experimental epileptogenesis: kindling-induced epilepsy in rats **Exp Neurol**. v. 58, n. 2, p. 190-202, 1978.

PLACIDO, R. V. Influência da epilepsia na expressão de transportadores. 2017. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNIFAL-MG, Alfenas, 2017.

POTSCHKA H, LÖSCHER W. Multidrug resistance-associated protein is involved in the regulation of extracellular levels of phenytoin in the brain. **Neuroreport**, v. 12, p. 2387–2389, 2001a.

POTSCHKA H, LÖSCHER W. In vivo evidence for P-glycoprotein-mediated transport of phenytoin at the blood-brain-barrier of rats **Epilepsia**, v. 42, n. 10, p. 1231-1240, 2001b.

POTSCHKA, H.; FEDROWITZ, M.; LÖSCHER, W. P-glycoprotein and multidrug resistance associated protein are involved in the regulation of extracellular levels of the major antiepileptic drug carbamazepine in the brain, **Neuroreport** v. 12, p. 3557–3560, 2001.

QU, L.; FAN, Y.; WANG, W.; MA, K.; YIN, Z. Development, validation and clinical application of an online-SPE-LC_HRMS/MS for simultaneous quantification of phenobarbital, phenytoin, carbamazepine, and its active metabolite carbamazepine 10,11-epoxide. **Talanta**. v. 158, p. 77-88, 2016.

RACINE, R.; ROSE, P. A.; BURNHAM, W. M. After discharge thresholds and kindling rates in dorsal and ventral hippocampus and dentate gyrus. **Can J Neurol Sci**. v. 4, n. 4, p. 273-278, 1977.

REMY, S. *et al.* A novel mechanism underlying drug resistance in chronic epilepsy. **Ann. Neurol**. v. 53, n.4.p. 469-479, 2003.

REMY, S.; BECK, H. Molecular and cellular mechanisms of pharmacoresistance in epilepsy. **Brain**, v. 129, p. 18–35, 2006.

RITTER, J. M. *et al.* Rang & Dale Farmacologia. **Guanabara Koogan**. 9 ed. Rio de Janeiro, 2020.

ROCH, C.; LEROY, C.; NEHLIG, A.; NAMER, I. J. Predictive Value of Cortical Injury for the Development of Temporal Lobe Epilepsy in 21-day-old Rats: An MRI Approach Using the Lithium-pilocarpine Model **Epilepsia** 2002.

ROMCY-PEREIRA, R. N.; GARCIA-CAIRASCO, N. Hippocampal cell proliferation and epileptogenesis after audiogenic kindling are not accompanied by mossy fiber sprouting or fluoro-jade staining **Neuroscience** v. 119, p. 533-546, 2003.

- SAMADI, A. *et al.* Simultaneous determination of phenobarbital, phenytoin, carbamazepine and carbamazepine-10,11epoxide in plasma of epileptic patients. **Pharmaceutical Sciences**. v. 25, n. 4, p. 345-351, 2019.
- SHARMA, A. K. *et al.* Mesial Temporal Lobe Epilepsy: Pathogenesis, Induced Rodent Models and Lesions. **Toxicologic Phatology** v. 35, p. 984-999, 2007.
- SCHEFFER, I. E. Classificação da ILAE das epilepsies: artigo da posição da comissão de classificação e terminologia da International League against Epilepsy. 2017.
- SCHMIDT, D.; LOSCHER, W. New developments in antiepileptic drug resistance: an integrative view. **Epilepsy Curr** v. 9, p. 47–52, 2009.
- SIMONATO, M. Identification and characterization of outcome measures reported in animal models of epilepsy: Protocol for a systematic review of the literature—A TASK2 report of the AES/ILAE Translational Task Force of the ILAE. **Epilepsia**. v. 58, n. 4, p. 68–77, 2017.
- SLOVITER, R. S.; ZAPONE, C. A.; BUMANGLAG, A. V.; NORWOOD, B. A.; KUDRIMOTI, H. On the relevance of prolonged convulsive status epilepticus in animals to the etiology and neurobiology of human temporal lobe epilepsy. **Epilepsia** v. 48, p. 6-10, 2007.
- SMITH, S. M.; GUMS, J. G. Fexofenadine biochemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties and its unique role in allergic disorders. **Expert Opin Drug MetabToxicol**. n. 7, p. 813-822, 2009.
- STEPIEN, K. M.; TOMASZEWSKI, M.; TOMASZEWSKA, J.; CZUCZWAR, S. J. The multidrug transporter P-glycoprotein in pharmacoresistance to antiepileptic drugs. **Pharmacol Reports** v. 64, p. 1011-1019, 2012.
- TANG, F.; HARTZ, A. M. S.; BAUER, B. Drug-resistant epilepsy: Multiple Hypotheses, few answers. **Frontiers in Neurology** v. 8, n. 301, 2017.
- TAUCK, D. L.; NADLER, V. Evidence of functional mossy fiber sprouting in hippocampal formation of kainic acid-treated rats **The Journal of Neuroscience** v. 5, n. 4, p. 1016-1022, 1985.
- TEIXEIRA-DA-SILVA, P.; SANTOS-BUELGA, D.; OTERO, M. J.; GARCÍA, M. J. Population pharmacokinetics of phenobarbital in Caucasian patients with epilepsy. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 153, 2020.
- THIJS, R. D. *et al.* Epilepsy in adults. **The Lancet**, v. 393, n. 10172, p. 689–701, 2019.
- TURSKI, W. A. *et al.* Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. **Behavioural Brain Research**, v.9, n.3, p.315-335, 1984.

Universidade Federal de São Carlos UFSCAR, Normativas do Concea. Disponível em: <<http://www.propq.ufscar.br/etica/manual-de-manutencao-de-animais>> Acesso em: 18 mai. 2016.

UMEOKA, E. H. L.; GARCIA, S. B.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; ELIAS, L. L. K.; GARCIA-CAIRASCO, N. Functional characterization of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis of the *Wistar Audiogenic Rat* (WAR) strain **Brain Research** v. 1381, p. 141-147, 2011.

VAN VLIET, E. A.; REDEKER, S.; ARONICA, E.; EDELBROEK, P. M.; GORTER, J. A. Expression of multidrug transporters MRP1, MRP2, and BCRP shortly after status epilepticus, during the latent period, and in chronic epileptic rats. **Epilepsia**. v. 46, p. 1569-1580, 2005.

VAN VLIET, E. A. Region-specific overexpression of P-glycoprotein at the Blood-Brain barrier affects brain uptake of phenytoin in epileptic rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 322, p. 141-147, 2007.

VERHELST, H. *et al.* Steroids in intractable childhood epilepsy: clinical experience and review of the literature. **Seizure**. v. 14, p. 412-421, 2005.

VEZZANI, A.; FRENCH, J.; BARTFAI, T.; BARAM, T. Z. The role of inflammation in epilepsy **Nat. Rev. Neurol.** v. 7, p. 31-40, 2011.

VOLK, H. A. *et al.*, Neuronal expression of the drug efflux transporter pglycoprotein in the rat hippocampus after limbic seizures **Neuroscience** v. 123, p. 751-759, 2004.

YAMADA, S. *et al.* Effects of the P-glycoprotein Inducer Carbamazepine on Fexofenadine Pharmacokinetics. **Ther Drug Monit.** v. 31, n. 6, p. 764-768, 2009.

YASUI-FURUKORI, N.; UNO, T. ; SUGAWARA, K.; TATEISHI, T. Different Effects of Three Transporting Inhibitors, Verapamil, Cimetidine, and Probenecid, on Fexofenadine Pharmacokinetics **Pharmacokinetics and Drug Disposition** v. 77, n. 1, p. 17-23, 2005.

WEN, T. *et al.* Effect of 21-day exposure of phenobarbital, carbamazepine and phenytoin on P-glycoprotein expression and activity in the rat brain. *Journal of the Neurological Sciences*. v. 270, p. 99-106, 2008.

World Human Organization WHO. Epilepsy. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/en/>> Acesso em: 17 jun. 2021.

ZAVALA-TECUAPETLA, S. *et al.* Activation of adenosine receptors modulates the efflux transportes in brain capillaries and restores the anticonvulsant effect of carbamazepine in carbamazepine resistant rats developed by window-pentylene-tetrazole kindling. **Brain Research**. 2019.

ZHANG, Y.; HUO, M.; ZHOU, J; XIE, S. PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel **Computer methods and programs in biomedicine** v.99, p. 306-314, 2010.

ZHANG, C.; KWAN, P; ZUO, Z.; BAUM, L. The transport of antiepileptic drugs by P-glycoprotein. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 64, p. 930-942, 2012.

ANEXO A - CERTIFICADO



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG
 Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas/MG. CEP 37130-000
 Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da glicoproteína-P na farmacocinética de fármacos antiepiléticos em ratos", registrada com o nº 32/2017, sob a responsabilidade de Vanessa B. Boralli Marques, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	De 11/07/2017 a 30/12/2020
Espécie/linhagem/raça	Rato Wistar / heterogênico Wistar audiogenic rats (WAR) / heterogênico
Nº de animais	Wistar: 100 WAR: 100
Sexo	Macho
Origem	Wistar: Biotério Central da UNIFAL WAR: Biotério do Prof. Dr. Norberto Garcia-Cairasco – USP/RP

Alfenas, 11 de Julho de 2017.


 Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida
 Coordenador CEUA-UNIFAL