UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Influência do verapamil na farmacocinética e na perfusão cerebral
da oxcarbazepina e dos enantiômeros do metabólito
10-hidroxicarbazepina em voluntários sadios**

Natalícia de Jesus Antunes

Ribeirão Preto
2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Influência do verapamil na farmacocinética e na perfusão cerebral
da oxcarbazepina e dos enantiômeros do metabólito
10-hidroxicarbazepina em voluntários sadios**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Toxicologia para
obtenção do título de Doutor em Ciências
Área de Concentração: Toxicologia

Orientada: Natalícia de Jesus Antunes

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vera Lucia Lanchote

Ribeirão Preto
2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA DESDE QUE CITADA A FONTE.

Antunes, Natalícia de Jesus

Influência do verapamil na farmacocinética e na perfusão cerebral da oxcarbazepina e dos enantiômeros do metabólito 10-hidroxicarbazepina em voluntários sadios. Ribeirão Preto, 2014.

115p.: il.; 30cm.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientadora: Lanchote, Vera Lucia

1. Oxcarbazepina; 2. MHD; 3. Enantiômeros; 4. Verapamil;
5. P-gp; 6. Farmacocinética não compartimental;
7. Farmacocinética populacional

FOLHA DE APROVAÇÃO

Natalícia de Jesus Antunes

Influência do verapamil na farmacocinética e na perfusão cerebral da oxcarbazepina e dos enantiômeros do metabólito 10-hidroxicarbazepina em voluntários sadios

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Vera Lucia Lanchote

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho

À minha mãe Terezinha, meu exemplo de vida, pela educação a mim dispensada, pela minha formação e pelos mais belos exemplos de honestidade, dignidade e perseverança. Além da confiança e apoio incondicional em todas as decisões por mim tomadas.

Às minhas irmãs Eva e Maria Aparecida, ao meu irmão Valdemir, a todos os meus sobrinhos e aos meus amigos, pelo respeito, pelo incentivo e pelo carinho que me fortalece e tornam os meus dias mais leves.

Ao Luiz César, pelo seu apoio incondicional e por sua capacidade de me trazer paz nos momentos de aflição enfrentados durante essa caminhada.

A Deus, por ter me dado condições de lutar e alcançar os objetivos pretendidos.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos

À Prof^a. Dr^a. Vera Lucia Lanchote, pela oportunidade, por acreditar na minha capacidade e pela orientação. Pelos seus ensinamentos pessoais e acadêmicos, pela sua paciência e dedicação.

Aos voluntários, que aceitaram participar deste trabalho dando a sua colaboração indispensável para a realização do mesmo.

Aos docentes e funcionários dos Departamentos de Clínica Médica, de Neurociências e Ciências do Comportamento e da Unidade de Pesquisa Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – HCFMRP-USP, pela parceria e contribuição na seleção e na realização das coletas das amostras dos voluntários sadios incluídos neste estudo.

Aos docentes e funcionários da Unidade de Medicina Nuclear do HCFMRP-USP pela parceria e contribuição na realização dos SPECTs nos voluntários sadios incluídos neste estudo.

Aos docentes e funcionários do Departamento de Farmacologia da Universidade de Leiden, por me receberem, durante um ano, para a realização do meu doutorado sanduíche, período no qual tive a oportunidade vivenciar experiências que muito contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal.

À Dr^a. Maria Paula Marques e Dr^a. Adriana Rocha, funcionárias do Laboratório de Farmacocinética e metabolismo da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - FCFRP-USP pelo respeito, pelos ensinamentos a mim dispensados e pelo auxílio na execução deste trabalho.

Ao Dr. Eduardo Tozzato, funcionário da FCFRP-USP, pelo auxílio na execução deste trabalho.

Ao Sr. Natalino Bocardo, funcionário do Laboratório de Farmacocinética e metabolismo da FCFRP-USP, pelo auxílio e pela simpatia contagiante.

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Farmacocinética e metabolismo da FCFRP-USP: Prof^a. Dr^a. Ana Leonor P.C. Godoy, Dr^a. Carolina M. Silva, Ms. Carolina P. Vieira, Dr. Daniel V. Neves, Daniela Miarelli, Ms. Diego Cusinato, Dr^a. Francine A. Castro, Gabriela C. Oliveira, Ms. Glauco Nardotto, Ms. João P.B. Ximenez, Dr^a. Juciane L. Cardoso, Dr^a. Juciene Caris, Leandro F. Pippa, Ms. Leonardo Pinto, Marília Oliveira, Milena Oliveira, Prof^a. Dr^a. Natália V. de Moraes, Ms. Otávio P. Rocha, Ms. Roberta Cestari, Ms. Rodrigo M.P. Ribeiro, pelas trocas de experiências profissionais e pessoais, pela inestimável ajuda e pelo carinho no nosso convívio diário.

Aos colegas e amigos da Universidade de Leiden: Annette Emerenciana, Esther Janssen, E Francesco Bellanti, Jan Berkhout, Janna Duong, Dra. Li Quin, Margeke Brill, Oscar Natan, Rick Admiraal, Sinziana Cristea, Verena Gotta, Wilbert De Witte. Willem Van Brink, Dr^a. Yumi Yamamoto pelas trocas de experiências profissionais e culturais e por terem me acolhido tão bem. E, em especial a Sven Van Dijkman e Coen Van Hasselt, que foram os meus mentores no processo de aprendizagem e execução da modelagem da farmacocinética. E também ao Dr. Erwin Lavallière, Dr^a. Chiara Piana e Zuzanna Baranski, pela amizade e por me receberem e auxiliarem na minha instalação e adaptação em Leiden.

Às funcionárias da seção de Pós-graduação, Rose e Rosana, pela dedicação, pelo auxílio e pela torcida.

Aos docentes e funcionários da FCFRP-USP por possibilitar a realização deste doutorado.

À minha família, minha mãe, meus irmãos, sobrinhos e Luiz César, pelo amor, apoio e confiança.

Aos meus amigos, em especial à Ms. Luna Ferolla, Fernanda carvalho e Prof^a. Dr^a. Gisele A. Rodrigues, pela amizade e apoio tão fundamentais.

A todos que não foram citados aqui, mas que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

À FAPESP pela concessão da bolsa de doutorado e de doutorado sanduíche.

Cada um de vocês foi muito importante na realização deste trabalho. Muito obrigada!

EPIÍGRAFE

***“Quando os ventos de mudança sopram, umas pessoas levantam barreiras,
outras constroem moinhos de vento.”***

Érico Veríssimo

RESUMO

ANTUNES, N.J. **Influência do verapamil na farmacocinética e na perfusão cerebral da oxcarbazepina e dos enantiômeros do metabólito 10-hidroxicarbazepina em voluntários sadios.** 2014. 115f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

A oxcarbazepina (OXC) é indicada como terapia adjuvante ou monoterapia no tratamento de crises epiléticas parciais ou crises tônico-clônicas generalizadas em adultos e crianças. A OXC sofre rápida eliminação pré-sistêmica com formação do metabólito ativo 10-hidroxicarbazepina (MHD), o qual possui como enantiômeros o R-(-)- e o S-(+)-MHD. A OXC e o MHD são substratos da glicoproteína-P (P-gp), que pode ser inibida pelo verapamil. O presente estudo avalia a influência do verapamil na farmacocinética e perfusão cerebral da OXC e dos enantiômeros do MHD em voluntários sadios. Os voluntários sadios (n=12) receberam em uma ocasião doses de 300 mg/12h de OXC e em outra ocasião doses de 300 mg/12h de OXC associadas com 80 mg/8h de verapamil. As amostras de sangue foram coletadas no estado de equilíbrio durante 12 horas e a avaliação da perfusão cerebral realizada utilizando a tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT) antes do início do tratamento e nos tempos 4, 6 ou 12h após a administração da OXC. As concentrações plasmáticas total e livre da OXC e dos enantiômeros do MHD foram avaliadas por LC-MS/MS. A análise farmacocinética não compartimental foi realizada com o programa WinNonlin e a farmacocinética populacional foi desenvolvida utilizando a modelagem não-linear de efeitos mistos com o programa NONMEM. Os limites de quantificação obtidos foram de 12,5 ng OXC/mL de plasma e 31,25 ng de cada enantiômero MHD/mL de plasma para a análise da concentração total, enquanto foi de 4,0 ng de OXC/mL de plasma e de 20,0 ng de cada enantiômero do MHD/mL de plasma para a determinação da concentração livre. Os coeficientes de variação obtidos nos estudos de precisão e a porcentagem de inexatidão inter e intra-ensaios foram inferiores a 15%, assegurando a reprodutibilidade e repetibilidade dos resultados. A análise farmacocinética não compartimental da OXC em monoterapia resultou nos seguintes parâmetros: concentração plasmática máxima (C_{max}) de 1,35 µg/mL como valor total e 0,32 µg/mL como concentração livre em 1,0 h, área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo (AUC^{0-12}) de 3,98 µg.h/mL e meia-vida de eliminação de 2,45 h, volume de distribuição aparente (V_{ss}/F) de 352,17 L e *clearance* aparente (CL_{ss}/F) de 75,58 L/h. A disposição cinética do MHD é enantiosseletiva, com observação de maior proporção para o enantiômero S-(+)-MHD em relação ao R-(-)-MHD (razão $AUC^{0-12}_{S-(+)/R-(-)}$ de 4,26). A fração livre avaliada no t_{max} da OXC foi 0,26 para a OXC, 0,42 para o R-(-)-MHD e 0,38 para o S-(+)-MHD, mostrando enantiosseletividade na ligação às proteínas plasmáticas do MHD. O tratamento com o verapamil reduziu o tempo médio de residência (MRT) (4,71 vs 3,83 h) e C_{max} como concentração livre (0,32 vs 0,53 µg/mL) da OXC e aumentou os valores para ambos os enantiômeros do MHD de C_{max} como valor total (2,60 vs 3,27 µg/mL para o R-(-)- e 11,05 vs 11,94 µg/mL para o S-(+)-MHD), C_{max} como concentração livre (3,11 vs 4,14 µg/mL para o S-(+)-MHD), $C_{média}$ (2,11 vs 2,42 µg/mL para o R-(-)- e 8,10 vs 9,07 µg/mL para o S-(+)-MHD) e AUC^{0-12} (25,36 vs 29,06 µg.h/mL para o R-(-)- e 97,19 vs 111,37 µg.h/mL para o S-(+)-MHD). A

farmacocinética populacional da OXC foi melhor descrita por modelo de dois compartimentos com eliminação de primeira ordem e com um conjunto de três compartimentos de trânsito para descrever o perfil de absorção da OXC. A disposição de ambos os enantiômeros do MHD foi caracterizada por modelo de um compartimento. Os valores de CL_{ss}/F estimados na monoterapia foram de 84,9 L/h para a OXC e de 2,0 L/h para ambos enantiômeros do MHD, enquanto os valores de V_{ss}/F foram de 587 L para a OXC, 23,6 L para o R-(-)-MHD e 31,7 L para o S-(+)-MHD. Concluindo, a associação do verapamil aumentou a biodisponibilidade da OXC em 12% (farmacocinética populacional) e aumentou os valores de AUC de ambos os enantiômeros do metabólito MHD (farmacocinética não compartimental), o que está provavelmente relacionado com a inibição da P-gp no trato intestinal. A associação do verapamil aumentou as concentrações cerebrais preditas de ambos os enantiômeros do MHD em maior extensão do que aquelas observadas no plasma. As mudanças no fluxo sanguíneo cerebral (SPECTs realizados 6h após a administração da OXC) associadas à coadministração de verapamil provavelmente foram causadas pelo aumento dos níveis cerebrais de ambos os enantiômeros do MHD. A confirmação dessa observação requer um braço experimental adicional com SPECTs realizados também após a administração do verapamil em monoterapia.

Palavras-chave: oxcarbazepina, MHD, enantiômeros, verapamil, P-gp, farmacocinética não compartimental, farmacocinética populacional

ABSTRACT

ANTUNES, N.J. **Influence of verapamil on the pharmacokinetics and cerebral perfusion of oxcarbazepine and the enantiomers of its metabolite 10-hydroxycarbazepine in healthy volunteers.** 2014. 115p. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Oxcarbazepine (OXC) is indicated as adjunctive therapy or monotherapy for the treatment of partial or generalized tonic-clonic seizures in adults and children. OXC undergoes rapid pre-systemic reduction with formation of the active metabolite 10-hydroxycarbazepine (MHD), which has the enantiomers R-(-)- and S-(+)-MHD. OXC and MHD are substrates of P-glycoprotein (P-gp), which can be inhibited by verapamil. The present study evaluates the influence of verapamil on the pharmacokinetics and cerebral perfusion of OXC and the MHD enantiomers in healthy volunteers. The healthy volunteers (n=12) received on one occasion doses of 300 mg/12h OXC and on another occasion they received doses of 300 mg/12h OXC associated with 80 mg/8h of verapamil. Blood samples were collected at steady state for 12 hours and the assessment of cerebral perfusion was performed using a single-photon emission computed tomography (SPECT) before the beginning of treatment and at times 4, 6 or 12 hours after OXC administration. The total and free plasma concentrations of OXC and MHD enantiomers were assessed by LC-MS/MS. The non-compartmental pharmacokinetics analysis was performed using the WinNonlin program, and population pharmacokinetics was developed using nonlinear mixed effects modelling with NONMEM. The limits of quantification obtained were 12.5 ng/mL plasma for OXC and 31.25 ng of each MHD enantiomer/mL plasma for total concentration analysis, while it was 4.0 ng OXC/mL plasma and 20.0 ng of each MHD enantiomer/mL plasma for the free concentration determination. The coefficients of variation obtained in studies of accuracy and the percentage of inaccuracy inter and intra-assay were less than 15%, ensuring the result reproducibility and repeatability. The non-compartmental pharmacokinetic analysis of OXC in monotherapy treatment, resulted in the following parameters: maximum plasma concentration (C_{max}) of 1.35 µg/mL as total concentration and 0.32 mg/mL as free concentration in 1.0 h, area under the plasma concentration vs time curve (AUC^{0-12}) was 3.98 µg.h/mL, half-life of 2.45 h, apparent volume of distribution (V_{ss}/F) of 352.17 L and the apparent clearance (CL_{ss}/F) of 75.58 L/h. The MHD kinetic disposition is enantioselective, with observation of a greater proportion of the S-(+)-MHD enantiomer compared to R-(-)-MHD (ratio $AUC^{0-12}_{S-(+)/R-(-)}$ of 4.26). The free fraction measured in the t_{max} of OXC was 0.26 for OXC, 0.42 for R-(-)-MHD and 0.38 for S-(+)-MHD, showing enantioselectivity in the plasma protein binding of MHD. Verapamil treatment reduced the mean residence time (MRT) (4.71 vs 3.83 h) and C_{max} (0.26 vs 0.31 µg/mL) as free concentration for OXC and increased the both MHD enantiomers values of C_{max} (2.60 vs 3.27 µg/mL for R-(-)- and 11.94 vs 11.05 µg/mL for S-(+)-MHD) as total concentration, C_{max} (3.11 vs 4.14 µg/mL for S-(+)-MHD) as free concentration, C_{avg} (2.11 vs 2.42 µg/mL for R-(-)- and 8.10 vs 9.07 µg/mL for S-(+)-MHD) and AUC^{0-12} (25.36 vs 29.06 µg.h/mL for R-(-)- and 97.19 vs 111.37 µg.h/mL for S-(+)-MHD). The population pharmacokinetics of oxcarbazepine was best described by a two-compartment model with first-order elimination and a

set of three transit compartments to describe the absorption profile of the parent compound. The disposition of both MHD enantiomers was characterised by one-compartment model. The CL_{ss}/F estimates in monotherapy were 84.9 L/h for OXC and 2.0 L/h for both MHD enantiomers, whereas the values of V_{ss}/F were 587 L for OXC, 23.6 L for R-(-)-MHD and 31.7 L for S-(+)-MHD. In conclusion, verapamil co-administration increased the OXC bioavailability in 12% (population pharmacokinetics) and increased the AUC of both metabolite MHD enantiomers (non-compartmental pharmacokinetics), which is probably related to the inhibition of P-gp in the intestinal tract. Verapamil co-administration increased the predicted brain concentrations of both MHD enantiomers in a greater extent than those observed in plasma. Changes in cerebral blood flow (SPECTs performed 6h after administration of OXC) associated with co-administration of verapamil were probably caused by an increase in brain levels of both MHD enantiomers. Confirmation of this observation requires additional experimental arm with SPECTs also performed after administration of verapamil in monotherapy.

Keywords: oxcarbazepine, MHD, enantiomers, verapamil, P-gp, non-compartmental pharmacokinetics, population pharmacokinetics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1:	Espectro de massas do íon molecular protonado (A) e do íon produto (B) da oxcarbazepina e do íon molecular protonado (C) e do íon produto (D) do MHD	20
Figura 1.2:	Cromatogramas referentes à análise da oxcarbazepina e dos enantiômeros do MHD em plasma. (A) Plasma branco enriquecido com oxcarbazepina (0,25 µg/mL), MHD (0,625 µg de cada enantiômero/mL) e padrão interno (PI - 4-metilprimidona - 40 µg /mL) e (B) Plasma de um voluntário sadio obtido 1h após a administração da última dose de 300 mg oral de oxcarbazepina.....	21
Figura 1.3:	Cromatogramas referentes à análise da oxcarbazepina e dos enantiômeros do MHD livre em plasma. (A) Ultrafiltrado de plasma branco; (B) Ultrafiltrado de plasma branco enriquecido com oxcarbazepina (0,2 µg/mL), MHD (0,1 µg de cada enantiômero/mL) e padrão interno (PI - 4-metilprimidona - 40 µg /mL) e (C) Ultrafiltrado de plasma de um voluntário sadio obtido 1h após a administração da última dose de 300 mg oral de oxcarbazepina.....	22
Figura 1.4:	Curvas de concentrações plasmáticas versus tempo da oxcarbazepina e dos enantiômeros do MHD em um voluntário sadio tratado com 300 mg/12h de oxcarbazepina	31
Figura 2.1:	Metabolismo da OXC (FLESCH et al., 2011; SCHUTZ et al., 1986; WELLINGTON & GOA, 2001). O-SUL=O-Sulfato; O-GLU=O-Glucuronídeo; S-(+)-MHD=S-10-hidroxicarbazepina; R-(-)-MHD=R-10-hidroxicarbazepina GLU-S-(+)-MHD=S-10-hidroxicarbazepina glucuronídeo; GLU-R-(-)-MHD=R-10-hidroxicarbazepina glucuronídeo; DHD=10,11-dihydro-10,11-trans-dihidroxicarbazepina; AKR1C1=aldo-ceto redutases família 1 e membro 1; AKR1C2= aldo-ceto redutases família 1 e membro 2; AKR1C3= aldo-ceto redutases família 1 e membro 3; AKR1C4=aldo-ceto redutases família 1 e membro 4; CBR1=carbonil redutase 1; CBR3=carbonil redutase 3	39
Figura 2.2:	Gráfico do tamanho amostral em relação ao poder do teste.....	43
Figura 2.3:	Curvas de concentrações plasmáticas versus tempo da OXC e dos enantiômeros do MHD no estado de equilíbrio em voluntários sadios (n=12) após tratamento oral de 300mg/12h de OXC em monoterapia (Ocasão O) ou em associação com o verapamil (Ocasão O+V). Os dados estão expressos como média	48
Figura 2.4:	Correlação entre a concentração plasmática total e livre da OXC, do R-(-)-MHD e do S-(+)-MHD nas ocasiões O (tratamento com OXC em monoterapia) e O + V (tratamento de OXC+verapamil); r ² =coeficiente de determinação	53

- Figura 3.1: Imagens cerebrais de um voluntário sadio geradas por SPECTs realizados nas três ocasiões de estudo: ausência do fármaco, ocasião O (tratamento com oxcarbazepina em monoterapia) e ocasião O+V (tratamento com oxcarbazepina + verapamil). São apresentadas as imagens dos cortes axial, coronal e sagital. D=direita; E=esquerda; A=anterior; P=posterior. Na escala, de azul para amarelo representa o aumento fluxo sanguíneo cerebral 73
- Figura 3.2: Visão esquemática do modelo da farmacocinética populacional para a OXC e para os enantiômeros do MHD. V=volume de distribuição; K=constante de velocidade; CL=*clearance*; F₁=biodisponibilidade; K_{tr}=constante de velocidade de transferência; Q=*clearance* intercompartimental 74
- Figura 3.3: Gráficos de diagnóstico de qualidade do ajuste (goodness-of-fit) do modelo final da farmacocinética populacional da OXC, do R-(-)-MHD e do S-(+)-MHD – dados observados (dependent variable - DV) *versus* previsões baseadas na estimativa populacional do modelo (population prediction - PRED), DV *versus* previsões baseadas nas estimativas individuais do modelo (individual prediction - IPRED), resíduos ponderados condicionais (conditional weighted residuals - CWRES) *versus* tempo, CWRES *versus* PRED; ○=Ocasião O (tratamento com OXC em monoterapia), ●=Ocasião O+V (tratamento com OXC+verapamil) 79
- Figura 3.4: Gráficos espelhos (mirror plots) populacionais (PRED *versus* DV) e individuais (IPRED *versus* DV) da OXC, do R-(-)-MHD e do S-(+)-MHD. Gráficos OBS= gráficos dos dados originais; Gráficos 1, 2 e 3=gráficos dos dados simulados; ○=Ocasião O (tratamento com OXC em monoterapia); ●=Ocasião O+V (tratamento com OXC+verapamil) 80
- Figura 3.5: Verificação visual preditiva (VPC - *visual predictive check*) para o modelo final da farmacocinética populacional da OXC, do R-(-)-MHD e do S-(+)-MHD. As linhas tracejadas representam o intervalo de confiança de 95% e as linhas contínuas a mediana dos dados simulados (n=1000). Ocasião O=tratamento com OXC em monoterapia; Ocasião O+V=tratamento com OXC+verapamil 81
- Figura 3.6: Distribuição da exposição da OXC, do R-(-)-MHD e do S-(+)-MHD em voluntários sadios. Os histogramas representam a distribuição dos valores de AUC⁰⁻¹² calculados a partir dos dados de 1000 simulações e a linha contínua representa a mediana dos valores de AUC⁰⁻¹² dos dados observados. Ocasião O=tratamento com OXC em monoterapia; Ocasião O+V=tratamento com OXC+verapamil 83

Figura 3.7:	Análises da distribuição dos erros de predição normalizada (NPDE - <i>normalised prediction distribution errors</i>) para a OXC, o R-(-)-MHD e o S-(+)-MHD. Esquerda: Histograma da distribuição do NPDE, com a densidade da distribuição gaussiana normal sobreposta; Direita: NPDE <i>versus</i> predições baseadas na estimativa populacional (PRED - <i>population prediction</i>) e NPDE <i>versus</i> tempo. ○=Ocasião O (tratamento com OXC em monoterapia); ●=Ocasião O+V (tratamento com OXC+verapamil).....	84
Figura 3.8:	Concentração plasmática livre e cerebral do R-(-)-MHD e do S-(+)-MHD <i>versus</i> tempo. Os dados estão expressos como mediana. Ocasião O=tratamento com OXC em monoterapia; Ocasião O+V=tratamento com OXC+verapamil.....	85
Figura 3.9:	Alterações relativas do sinal dos SPECTs cerebrais <i>versus</i> tempo na região temporal do cérebro	87
Figura 3.10:	Alterações relativas do sinal dos SPECTs cerebrais <i>versus</i> tempo na região frontal do cérebro	88
Figura 3.11:	Alterações relativas do sinal dos SPECTs cerebrais <i>versus</i> tempo nas regiões basal e tálamo.....	89
Figura 3.12:	Alterações relativas do sinal dos SPECTs cerebrais <i>versus</i> tempo nas regiões ínsula e parietal.....	89
Figura 3.13:	Alterações relativas do sinal dos SPECTs cerebrais <i>versus</i> tempo na região occipital	90
Figura 3.14:	Alterações relativas do sinal dos SPECTs cerebrais <i>versus</i> tempo na região do cabelo.....	91
Figura 3.15:	Correlação entre os valores de AUC^{0-6} do R-(-)-MHD e a mudança relativa do sinal dos SPECTs realizados 6h após a administração da OXC daqueles realizados sem fármaco em diferentes áreas do cérebro. Ocasião O=tratamento com OXC em monoterapia, Ocasião O+V=tratamento com OXC+verapamil.....	92
Figura 3.16:	Correlação entre os valores de AUC^{0-6} do S-(+)-MHD e a mudança relativa do sinal dos SPECTs realizados 6h após a administração da OXC daqueles realizados sem fármaco em diferentes áreas do cérebro. Ocasião O=tratamento com OXC em monoterapia, Ocasião O+V=tratamento com OXC+verapamil.....	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1:	Efeito matriz para a oxcarbazepina e os enantiômeros do MHD total e livre em oito diferentes lotes de plasma humano, sendo 4 normais, 2 lipêmicos e 2 hemolisados.....	23
Tabela 1.2:	Limites de confiança do método de análise da oxcarbazepina total em plasma	25
Tabela 1.3:	Limites de confiança do método de análise da oxcarbazepina livre em plasma.....	26
Tabela 1.4:	Limites de confiança do método de análise dos enantiômeros do MHD total em plasma.....	27
Tabela 1.5:	Limites de confiança do método de análise dos enantiômeros do MHD livre em plasma	28
Tabela 1.6:	Estudo de estabilidade do método de análise da OXC e dos enantiômeros do MHD total em plasma	29
Tabela 1.7:	Estudo de estabilidade do método de análise da OXC e dos enantiômeros do MHD livre em plasma	30
Tabela 1.8:	Farmacocinética da OXC e dos enantiômeros do MHD em um voluntário sadio tratado com 300 mg/12h de OXC por via oral	32
Tabela 2.1:	Dados demográficos e parâmetros bioquímicos dos voluntários sadios investigados (n=12).....	47
Tabela 2.2:	Farmacocinética da OXC e dos enantiômeros do MHD em voluntários sadios tratados com 300 mg/12h de OXC por via oral na ocasião O (OXC em monoterapia). Os valores estão expressos como mediana, média (IC 95%)....	49
Tabela 2.3:	Farmacocinética da OXC e dos enantiômeros do MHD em voluntários sadios tratados com 300 mg/12h de OXC associada com verapamil 80mg/8h (Ocasião O+V). Os valores estão expressos como mediana, média (IC 95%)....	51
Tabela 2.4:	Disposição cinética da OXC e dos enantiômeros do MHD nas ocasiões O (OXC em monoterapia) e O+V (OXC + verapamil). Os valores estão expressos como mediana.....	52
Tabela 3.1:	Informações sobre a duração do tratamento, a dose dos fármacos, número de amostras e tempo de realização dos SPECTs para os 12 voluntários sadios investigados.....	63

Tabela 3.2:	Resumo esquemático das principais etapas da construção do modelo da farmacocinética populacional da OXC e dos enantiômeros do MHD	75
Tabela 3.3:	Estimativas dos parâmetros de farmacocinética populacional para a OXC e enantiômeros do MHD	77
Tabela 3.4:	Valores de AUC^{0-12} estimados para a concentração plasmática livre e cerebral dos enantiômeros do MHD. Valores expressos como mediana, média (IC 95%)	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Anterior
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ABCB1	<i>ATP-binding cassette</i> , subfamília B
ALAG	<i>Lag time</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AKR	Aldo-ceto redutase- <i>do inglês aldo keto reductase</i>
AKR1C1	Aldo-ceto redutases família 1 e membro 1
AKR1C2	Aldo-ceto redutases família 1 e membro 2
AKR1C3	Aldo-ceto redutases família 1 e membro 3
AKR1C4	Aldo-ceto redutases família 1 e membro 4
AST	Aspartato aminotransaminase
BHCG	Beta-gonadotrofina coriônica humana – do inglês <i>Beta-Human Chorionic Gonadotropin</i>
BW	<i>Bodyweight</i>
CBR1	Carbonil redutase 1
CBR3	Carbonil redutase 3
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CQA	Controle de qualidade alto
CQB	Controle de qualidade baixo
CQD	Controle de qualidade de diluição
CQM	Controle de qualidade médio
CV	Coeficiente de variação
CYP	Citocromo
CWRES	Resíduos ponderados condicionais – do inglês <i>conditional weighted residuals</i>
D	Direita
DHD	10,11-dihidro-10,11-trans-dihidroxicarbazepina
DV	Dados observados – do inglês <i>dependent variable</i>
E	Esquerda
EA	Escala alométrica
EPR	Erro padrão relativo
ESI	Eletronebulização
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
FMN	Fator de matriz normalizado por padrão interno
FOCE-I	Estimação condicional de primeira ordem com a opção de interação – do inglês <i>First-order conditional estimation method with the interaction option</i>
FSCr	Fluxo sanguíneo cerebral regional
FWHM	<i>Full-width at half maximum</i>
GT	Glutamil transferase
H	Homem
HCFMRP	Hospital das Clínicas Faculdade de Medicina Ribeirão Preto
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência- do inglês <i>High-performance liquid chromatography</i>
IC	Intervalo de confiança

IIV	Variabilidade inter-individual – do inglês <i>inter-individual variability</i>
IMC	Índice de massa corporal
IOV	Variabilidade inter-ocasiões – do inglês <i>inter-occasion variability</i>
IPRED	Predições baseadas nas estimativas individuais– do inglês <i>individual prediction</i>
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas
LACDR	<i>Leiden Academic Centre for Drug Research</i>
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LIQ	Limite inferior de quantificação
M	Mulher
MDR1	Resistência a multifármacos 1- do inglês <i>multidrug resistance 1</i>
MHD	10-hidroxicarbazepina - do inglês <i>monohydroxy derivative</i>
MNI	<i>Montreal Neurological Institute</i>
MRM	Monitoramento de reações múltiplas- do inglês <i>Multiple Reaction Monitoring</i>
MRT	Tempo médio de residência- do inglês <i>mean residence time</i>
MS/MS	Espectrometria de massas
MTT	Média do tempo de trânsito – do inglês <i>mean transit time</i>
NONMEM	Efeitos mistos não lineares - do inglês <i>Nonlinear mixed effects modelling</i>
NPDE	Distribuição dos erros de predição normalizada - do inglês <i>normalised prediction distribution error</i>
OFV	Valor da função objetiva – do inglês <i>objective function value</i>
OSEM	<i>Ordered-subset Expectation Maximization</i>
OXC	Oxcarbazepina
P	Posterior
P-gp	Glicoproteína-P
PI	Padrão interno
PK-PD	Farmacocinética-farmacodinâmica
PRED	Predições baseadas na estimativa populacional do modelo – do inglês <i>population prediction</i>
PPC	Verificação visual preditiva posterior – do inglês <i>posterior predictive check</i>
PsN	<i>Perl-speaks-NONMEM</i>
RSE	Relative standard error
SNC	Sistema nervoso central
SPECT	Tomografia por emissão de fóton único – do inglês <i>Single-photon emission computed tomography</i>
SPM	<i>Statistical Parametric Mapping</i>
TSH	Hormônio estimulante da tireóide
UPC	Unidade de Pesquisa Clínica
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultraviolet
v/v/v	volume/volume/volume
VER	Verapamil
VPC	Verificação visual preditiva– do inglês <i>visual predictive check</i>
^{99m} Tc-ECD	Dímero etilcisteinato marcado com ^{99m} tecnécio

LISTA DE SÍMBOLOS

AUC	Área sob a curva concentração plasmática <i>versus</i> tempo
AUC^{0-12}	Área sob a curva concentração plasmática <i>versus</i> tempo de zero a 12 horas
C	Concentração
CL	<i>Clearance</i>
CL/F	<i>Clearance</i> total aparente
CL_{ss}/F	<i>Clearance</i> total aparente no estado de equilíbrio
C_{max}	Concentração plasmática máxima
$C_{média}$	Concentração plasmática média no estado de equilíbrio
F	Biodisponibilidade
f_u	Fração livre
K	Constante de velocidade
K_a	Constante de velocidade de absorção
K_{el}	Constante de velocidade de eliminação
K_{tr}	Constante de velocidade de transferência – do inglês <i>transfer rate constant</i>
Q	<i>Clearance</i> intercompartimental
r	Coeficiente de correlação linear
r^2	Coeficiente de determinação
$t_{1/2}$	Meia-vida de eliminação
t_{max}	Tempo para alcançar C_{max}
$V_{área}/F$	Volume de distribuição aparente
V_{ss}/F	Volume de distribuição aparente
®	Marca registrada
θ_i	Valor do parâmetro do indivíduo i^{th}
θ_p	Valor típico do parâmetro na população
η_i	Variabilidade entre os indivíduos
ω^2	Variância
K	Ocasão
$C_{ij,obs}$	Concentrações observadas para o indivíduo i^{th}
$C_{ij,pred}$	Concentrações preditas para o indivíduo i^{th}

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	x
LISTA DE SÍMBOLOS.....	xii
 INTRODUÇÃO	 1
 CAPÍTULO 1 - Análises das concentrações total e livre da oxcarbazepina e dos enantiômeros do metabólito 10-hidroxicarbazepina em plasma empregando LC-MS/MS	 4
1 INTRODUÇÃO	5
2 OBJETIVO.....	8
3 CASUÍSTICA E MÉTODOS	9
3.1 Soluções padrão e reagentes.....	9
3.2 Análises cromatográficas	10
3.2.1 Análise cromatográfica da OXC e dos enantiômeros do MHD total em plasma.....	10
3.2.2 Análise cromatográfica da OXC e dos enantiômeros do MHD livre em plasma.....	11
3.3 Preparo das amostras	12
3.3.1 Preparo das amostras da OXC e dos enantiômeros do MHD total	12
3.3.2 Preparo das amostras da OXC e dos enantiômeros do MHD livre	12
3.4 Determinação da ordem de eluição dos enantiômeros do MHD	13
3.5 Teste de racemização	13
3.6 Validação dos métodos de análise da OXC e dos enantiômeros do metabólito MHD total e livre em plasma	14
3.6.1 Efeito matriz	14
3.6.2 Curvas de calibração.....	14
3.6.3 Linearidade.....	15
3.6.4 Limite de quantificação.....	15
3.6.5 Recuperação	16
3.6.6 Precisão e exatidão	16
3.6.7 Estabilidade.....	17

3.7 Protocolo clínico	17
3.8 Análise farmacocinética.....	18
4 RESULTADOS	19
4.1 Análise da OXC e dos enantiômeros do metabólito MHD total e livre em plasma.....	19
4.2 Ordem de eluição dos enantiômeros do MHD.....	22
4.3 Racemização.....	23
4.4 Validação dos métodos de análise da OXC e dos enantiômeros do metabólito MHD total e livre em plasma	23
4.5 Estudo clínico	30
5 DISCUSSÃO	33
6 CONCLUSÃO.....	36

CAPÍTULO 2 - Influência do verapamil na farmacocinética não compartimental da oxcarbazepina e dos enantiômeros do metabólito 10-hidroxicarbazepina em voluntários sadios

1 INTRODUÇÃO	38
2 OBJETIVOS	42
3 CASUÍSTICA E MÉTODOS	43
3.1 Casuística e protocolo clínico.....	43
3.2 Análise da oxcarbazepina e dos enantiômeros do metabólito MHD total e livre em plasma.....	45
3.3 Análise farmacocinética.....	45
3.4 Análise estatística	45
4 RESULTADOS	46
4.1 Protocolo clínico	46
4.2 Disposição cinética e metabolismo da OXC e dos enantiômeros do metabólito MHD no estado de equilíbrio em voluntários sadios na ocasião O	48
4.3 Disposição cinética e metabolismo da OXC e dos enantiômeros do metabólito MHD no estado de equilíbrio em voluntários sadios na ocasião O+V	50
5 DISCUSSÃO	54
6 CONCLUSÕES	57

CAPÍTULO 3 - Influência do verapamil na farmacocinética populacional e na perfusão cerebral da oxcarbazepina e dos enantiômeros do metabólito 10-hidroxicarbazepina em voluntários sadios

1 INTRODUÇÃO	59
2 OBJETIVOS	61

2.1 Geral:.....	61
2.2 Específicos:	61
3 CASUÍSTICA E MÉTODOS	62
3.1 Protocolo clínico	62
3.2 Aquisição dos SPECTs cerebrais.....	63
3.3 Métodos de análise da OXC e dos enantiômeros do MHD total e livre em plasma.....	66
3.4 Farmacocinética populacional	66
3.4.1 Critérios de discriminação do modelo	66
3.4.2 Desenvolvimento do modelo farmacocinético sequencial	67
3.4.3 Avaliação do modelo	69
3.5 Predição da concentração cerebral dos enantiômeros do MHD	70
3.6 Correlação entre a concentração cerebral dos enantiômeros do MHD e a alteração do fluxo sanguíneo cerebral	71
4. RESULTADOS	72
4.1 Protocolo clínico	72
4.2 Avaliação do fluxo sanguíneo cerebral.....	72
4.3 Desenvolvimento do modelo de farmacocinética populacional	73
4.4 Avaliação do modelo	78
4.5 Predição das concentrações cerebrais dos enantiômeros do MHD	85
4.6 Correlação entre a concentração cerebral dos enantiômeros do MHD e a alteração do fluxo sanguíneo cerebral	86
5 DISCUSSÃO	93
6 CONCLUSÕES	96
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
APÊNDICES	105

Introdução

A epilepsia é um transtorno cerebral que afeta cerca de 50 milhões de pessoas no mundo, sendo que 30% dos pacientes são farmacoresistentes ao tratamento com antiepiléticos provavelmente em função da super expressão na barreira hematoencefálica do transportador de efluxo glicoproteína-P (P-gp) (LÖSCHER et al., 2011; MARCHI et al., 2005; RIZZI et al., 2002; WHO, 2011).

Considerando que a oxcarbazepina (OXC), um antiepilético de segunda geração indicado no tratamento de crises epiléticas parciais ou crises tônico-clônicas generalizadas em adultos e crianças (VERROTTI et al., 2010; WELLINGTON & GOA, 2001) e o seu metabólito ativo 10-hidroxicarbazepina (MHD-*monohydroxy derivative*) são substratos da P-gp (FORTUNA et al., 2012; ZHANG et al., 2011) e que o verapamil (VER) é um fármaco inibidor da P-gp em vários tecidos (CLINCKERS et al., 2005), o presente estudo avalia a influência do verapamil na farmacocinética da OXC e dos enantiômeros do MHD e sua relação com a perfusão cerebral em voluntários sadios.

O presente estudo permite abrir uma nova perspectiva no sentido de avaliar a farmacocinética no plasma e buscar correlações com a perfusão cerebral como uma medida indireta da distribuição do fármaco no sistema nervoso central (SNC). Ou seja, verificar se a monitorização terapêutica de fármacos no plasma representa sua distribuição para o cérebro. O estudo visa estabelecer um protocolo para posterior investigação de pacientes portadores de epilepsia em tratamento com oxcarbazepina e com abrangência da correlação entre a concentração plasmática, o sinal do SPECT e a resposta clínica.

O estudo foi dividido em três capítulos, os quais incluem o desenvolvimento e a validação dos métodos utilizados, a avaliação da farmacocinética não compartimental e populacional da OXC e dos enantiômeros do metabólito MHD em voluntários sadios tratados em monoterapia ou em associação ao verapamil, bem como a correlação entre a concentração plasmática e o sinal do SPECT.

O Capítulo 1 apresenta o desenvolvimento e a validação dos métodos de análise sequencial da oxcarbazepina e dos enantiômeros do MHD total e livre em plasma, empregando o sistema de cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (LC-MS/MS). Os métodos foram aplicados no estudo da farmacocinética no estado de equilíbrio da OXC e dos enantiômeros do seu metabólito MHD em um voluntário sadio.

O Capítulo 2 aborda o estudo da influência do verapamil na farmacocinética não compartimental da oxcarbazepina e dos enantiômeros do MHD em voluntários sadios.

O Capítulo 3 trata do desenvolvimento de um modelo de farmacocinética populacional para avaliar a influência do verapamil na farmacocinética da OXC e dos enantiômeros do MHD em voluntários sadios. Neste capítulo está também descrita a correlação entre a farmacocinética e os sinais gerados pelos SPECTs.

Capítulo 1

Análises das concentrações total e livre da oxcarbazepina e dos enantiômeros do metabólito 10-hidroxicarbazepina em plasma empregando LC-MS/MS

1 INTRODUÇÃO

A OXC é considerada um pró-fármaco, sendo grande parte dos seus efeitos produzida pelo seu metabólito ativo MHD. O MHD é formado pela rápida redução pré-sistêmica da OXC, o qual possui um centro quiral na posição 10, tendo o R-(-)- e o S-(+)-MHD como enantiômeros (MAY; KORN-MERKER; RAMBECK, 2003; KRASOWSKI & MCMILLIN, 2014; SCHMUTZ et al., 1994; VOLOSOV et al., 1999; VOLOSOV et al., 2000).

Em pacientes com neuralgia do trigêmeo, a ligação às proteínas plasmáticas é de aproximadamente 59% para a OXC e 39% para o metabólito MHD como mistura enantiomérica (PATSALOS; ELYAS; ZAKRZEWSKA, 1990). A ligação de fármacos quirais às proteínas plasmáticas pode apresentar enantiosseletividade, o que pode afetar a sua atividade farmacológica e o seu perfil farmacocinético (SHEN et al., 2013). Não existem dados clínicos na literatura sobre a ligação às proteínas plasmáticas dos enantiômeros individuais do MHD. Um estudo *in vitro* mostrou valores de ligação às proteínas plasmáticas em torno de 30% para o R-(-)- e o S-(+)-MHD em plasma humano e de rato (FORTUNA et al., 2010).

A ligação de fármacos às proteínas plasmáticas afeta a farmacocinética e a farmacodinâmica em vários aspectos, já que somente a concentração livre está disponível para a distribuição, eliminação e interação com os receptores (VAN STEEG et al., 2009; WRIGHT et al., 1996). Com isso, torna-se necessário o desenvolvimento de métodos para análise da concentração livre de fármacos. Os métodos de separação da concentração livre da ligada da OXC e do MHD até então descritos empregam diálise de equilíbrio ou ultrafiltração (FORTUNA et al., 2010; KLITGAARD & KRISTENSEN et al., 1986; PATSALOS; ELYAS; ZAKRZEWSKA, 1990). Klitgaard e Kristensen (1986) relataram valores de ligação do metabólito MHD como mistura enantiomérica às proteínas plasmáticas de pacientes epiléticos, de 40% utilizando diálise de equilíbrio e 45% utilizando ultrafiltração. Os autores atribuíram essa diferença entre os dois métodos à menor temperatura do ambiente no qual a ultrafiltração foi realizada.

Até o momento não existem dados na literatura sobre a análise da concentração livre da OXC e do MHD por LC-MS/MS. Patsalos, Elyas e Zakrzewska (1990) utilizaram um método de análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC - *High-performance liquid chromatography*) com detecção por ultravioleta

(UV) com limite de quantificação de 50 ng/mL de plasma para a OXC e para o MHD como mistura racêmica. Fortuna et al. (2010) também realizaram a análise quiral dos enantiômeros do MHD por HPLC com detecção por UV e obtiveram limite de quantificação de 40 ng/mL de plasma para ambos enantiômeros individuais.

A maioria dos métodos de análise enantiosseletivos da concentração total do MHD em plasma empregando HPLC com detecção por UV até então descritos não fazem a detecção simultânea da OXC, devido a sua baixa concentração no plasma. Flesch et al. (1992) descreveram um método de análise dos enantiômeros do MHD utilizando uma coluna quiral Chiralcel OD e extração líquido-líquido, o qual obteve limite de quantificação de 100 ng/mL. Esse método foi utilizado pelo mesmo grupo posteriormente para o estudo da farmacocinética da OXC e dos enantiômeros do MHD. Nesse trabalho, foi relatada a impossibilidade do cálculo de alguns parâmetros farmacocinéticos da OXC devido ao alto valor do seu limite de quantificação (260 ng/mL de plasma) (FLESCHE et al., 2011). A análise dos enantiômeros do MHD em plasma e urina utilizando coluna quiral Chiralcel OD e extração líquido-líquido com limite de quantificação de 200 ng/mL também foi descrita por Volosov et al. (1999) e Volosov et al. (2000). Mazzucchelli et al. (2007) mostraram limite de quantificação de 100 ng/mL de plasma para a OXC, para o R-(-)-MHD e para o S-(+)-MHD usando a coluna Chiralcel OD-R para a separação dos analitos. O método desenvolvido e validado por Fortuna et al. (2011), no qual a separação da OXC e dos enantiômeros do MHD foi realizada na coluna LiChroCART 250-4 Chiradex, resultou em limite de quantificação de 200 ng/mL para a OXC, para o R-(-)-MHD e para o S-(+)-MHD.

Os métodos de análise simultânea da concentração total da OXC e dos enantiômeros do MHD em plasma utilizando LC-MS/MS descritos mostram limites de quantificação de 50 ng/mL para a OXC e para os enantiômeros individuais do MHD. Nos referidos estudos foi utilizada uma coluna quiral Chiralcel OD-H e o preparo de amostras realizado por extração em fase sólida (LOUREIRO et al., 2011; PERUCCA et al., 2011).

Considerando a necessidade de métodos mais sensíveis, capazes de quantificar as concentrações da OXC e dos enantiômeros do MHD em todas as amostras coletadas no intervalo de 12h, o presente estudo apresenta o desenvolvimento e a validação dos métodos de análise simultânea da OXC e dos enantiômeros do MHD total e livre em plasma humano utilizando LC-MS/MS acoplado a uma coluna quiral Chiralcel OD-H e extração líquido-líquido, a qual foi

precedida pelo procedimento de ultrafiltração para a análise da concentração livre. O método de análise da concentração total da OXC e dos enantiômero do MHD foi aplicado em estudo de farmacocinética seguindo a administração de 300 mg/12h de OXC por via oral, durante 5 dias, a um voluntário sadio. O método de análise da concentração livre foi utilizado na determinação da fração livre dos fármacos em amostra de plasma coletada no $t_{\max}$ da OXC.

2 OBJETIVO

Desenvolver e validar os métodos de análise da OXC e dos enantiômeros do MHD total e livre em plasma para aplicação em estudo clínico de farmacocinética e determinação da fração livre.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Soluções padrão e reagentes

A OXC (99,6%) foi adquirida da USP (Rockville, USA) e o metabólito racêmico MHD (98%) adquirido da Toronto Research Chemicals (North York, Canadá). A 4-metilprimidona (padrão interno - PI) foi adquirida da Sigma (St. Louis, MO, EUA). Os solventes diclorometano e éter tert-butil metílico foram obtidos da Mallinckrodt Baker (Phillipsburg, NJ), o hexano, o metanol e o etanol foram obtidos da Panreac Química SAL (Barcelona, Espanha) e o isopropanol foi obtido da Tedia Way (Fairfield, USA), sendo que todos os solventes eram de grau cromatografia. O acetato de amônio foi obtido da Mallinckrodt Baker (Phillipsburg, Xalostoc, México). A água utilizada durante o experimento foi obtida em sistema de purificação Sinergy UV[®] (Millipore, Molsheim, França).

Para a análise da concentração plasmática total da OXC e do MHD foram preparadas soluções estoque nas concentrações de 200 e 400 µg/mL de metanol para a OXC e para o MHD, respectivamente. A partir destas soluções foram realizadas diluições para a obtenção das soluções de uso, nas concentrações 0,1; 0,2; 0,4; 2,0; 4,0; 8,0; 16; 24,0 e 40 µg de oxcarbazepina/mL de metanol e 0,5; 0,1; 12; 5; 20; 40; 80; 120 e 200 µg de MHD/mL de metanol. Na análise da concentração livre, foram preparadas soluções estoque nas concentrações de 100 µg/mL de metanol para a OXC e 200 µg/mL de metanol para o MHD. A partir destas soluções foram realizadas diluições para a obtenção das soluções de uso, nas concentrações 0,008; 0,02; 0,04; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 2,4 e 4 µg de oxcarbazepina/mL de metanol e 0,08; 0,2; 0,4; 2,0; 4,0; 8,0; 16; 24 e 40 µg de MHD/mL de metanol. A solução de 4-metilprimidona foi preparada na concentração de 200 µg/mL de metanol e diluída para 40 µg/mL. Todas as soluções padrão foram armazenadas a -20° C.

3.2 Análises cromatográficas

3.2.1 Análise cromatográfica da OXC e dos enantiômeros do MHD total em plasma

A análise da OXC e dos enantiômeros do metabólito MHD como concentração total foi realizada por LC-MS/MS. O sistema HPLC foi constituído por cromatógrafo da Shimadzu (Kyoto, Japão) equipado com bomba LC-10AD, auto injetor modelo SIL-10AD, forno CTO-10AS e sistema controlador modelo SCL 10A.

A separação da OXC e dos enantiômeros do metabólito MHD foi obtida na coluna de fase quiral Chiralcel® OD-H (Daicel Chemical Industries, New York, EUA) de 150 x 4,6 mm, partículas de 10 µm e com pré-coluna C8 de 4 x 4 mm (Merck®, Darmstadt, Alemanha), mantidas à 25°C, empregando a fase móvel constituída por mistura de hexano:etanol:isopropanol (80:15:5, v/v/v) na vazão de 1,3 mL/min. Foi utilizada como infusão pós-coluna uma solução composta de etanol: acetato de amônio aquoso 5 mM (95:5) na vazão de 0,2 mL/min.

O sistema de detecção por espectrometria de massas (MS/MS) utilizado foi o Quattro Micro LC triplo quadrupolo (Micromass, Manchester, Reino Unido) equipado com interface de ionização por eletronebulização (ESI) operando no modo íon positivo. A voltagem do capilar no ESI foi de 3 KV. As temperaturas da fonte e de dessolvatação foram mantidas a 150 e 200°C, respectivamente. O nitrogênio foi utilizado como gás de nebulização na vazão de 369 L/h. O gás argônio foi utilizado como gás de colisão na pressão de aproximadamente $2,64 \times 10^{-3}$ mbar. A voltagem do cone foi mantida em 15 V para a OXC, 20 V para o MHD e em 20 V para o PI. A energia de colisão foi de 15 eV para a OXC e 20 eV para o MHD e para o PI. As condições de otimização do MS/MS foram obtidas por infusão direta das soluções padrão preparadas na fase móvel e introduzidas com bomba de infusão, na vazão de 20 µL/min.

As análises foram executadas no modo MRM (*Multiple Reaction Monitoring*). Os íons protonados $[M + H]^+$ e seus respectivos íons produtos foram monitorados nas transições 253>180 para a OXC, 255>194 para o metabólito MHD e 233>176 para o PI. A aquisição e a quantificação de dados foram realizadas utilizando o programa MassLynx versão 3,5 (Micromass, Manchester, Reino Unido).

3.2.2 Análise cromatográfica da OXC e dos enantiômeros do MHD livre em plasma

A análise da OXC e dos enantiômeros do metabólito MHD livre foi realizada por LC-MS/MS. O sistema LC-MS/MS foi constituído por bomba gradiente binária Waters 1525 μ , injetor automático 2777, forno de coluna TCM/CHM e espectrômetro de massas modelo triplo quadrupolo XEVO TQ-S (Waters, Milford, EUA).

A separação da OXC e dos enantiômeros do metabólito MHD foi obtida na coluna de fase quiral Chiralcel® OD-H (Daicel Chemical Industries, New York, EUA) de 150 x 4,6 mm, partículas de 10 μ m e com pré-coluna C8 de 4 x 4 mm (Merck®, Darmstadt, Alemanha), mantidas à 25°C, empregando a fase móvel constituída por mistura de hexano:etanol:isopropanol (80:15:5, v/v/v) na vazão de 1,0 mL/min. Foi utilizada como infusão pós-coluna uma solução composta de etanol: acetato de amônio aquoso 5 mM (95:5) na vazão de 0,2 mL/min.

O sistema de detecção por MS/MS foi equipado com interface de ionização por ESI operando no modo íon positivo. A voltagem do capilar no ESI foi de 3 KV. As temperaturas da fonte e de dessolvatação foram mantidas a 150 e 200°C, respectivamente. O nitrogênio foi utilizado como gás de nebulização na vazão de 800 L/h. O gás argônio foi utilizado como gás de colisão na pressão de aproximadamente $7,0 \times 10^{-3}$ mbar. A voltagem do cone foi mantida em 15 V para a OXC, 20 V para o MHD e em 20 V para o PI. A energia de colisão foi de 15 eV para a OXC e 20 eV para o MHD e para o PI. As condições de otimização do MS/MS foram obtidas por infusão direta das soluções padrão preparadas na fase móvel e introduzidas com bomba de infusão.

As análises foram executadas no modo MRM. Os íons protonados $[M + H]^+$ e seus respectivos íons produtos foram monitorados nas transições 253>180 para a OXC, 255>194 para o metabólito MHD e 233>176 para o PI. A aquisição e a quantificação de dados foram realizadas utilizando o programa MassLynx versão 4,1 (Micromass, Manchester, Reino Unido).

3.3 Preparo das amostras

As amostras de plasma branco de voluntários sadios (não tratados com a OXC) foram obtidas do Hemocentro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

3.3.1 Preparo das amostras da OXC e dos enantiômeros do MHD total

Alíquotas de 100 μL de plasma foram enriquecidas com 12,5 μL da solução do padrão interno (4-metilprimidona) e extraídas com 3 mL da mistura éter tert-butil metílico: diclorometano (2:1). Os tubos foram agitados durante 40 min em agitador horizontal (agitador de mesa recíprocante modelo MA 139/CTF da Marconi) e em seguida centrifugados por 10 min a 1275g (centrífuga refrigerada Hitachi® modelo CF8DL, Tokyo, Japão). As fases orgânicas foram separadas e concentradas em sistema de evaporação a vácuo (Christ®, modelo RVC 2-25 CD plus, Funkenstörungsgrad, Alemanha). Os resíduos obtidos foram retomados em 500 μL da fase móvel e 15 μL foram submetidos à análise cromatográfica.

3.3.2 Preparo das amostras da OXC e dos enantiômeros do MHD livre

Alíquotas de 200 μL de plasma branco ou de amostras de plasma foram acondicionadas em dispositivo de ultrafiltração Centrifree® (Millipore, Carrigtwohill, Irlanda). As amostras foram centrifugadas a 1875 x g durante 40 minutos em centrífuga com rotor de eixo fixo (ângulo de 36 graus) (modelo NT 825, Nova Técnica, Piracicaba, Brasil), refrigerado a 4 °C para a obtenção do ultrafiltrado do plasma.

Alíquotas de 50 μL do ultrafiltrado foram enriquecidas com 25 μL da solução do padrão interno (4-metilprimidona) e extraídas com 2 mL da mistura éter tert-butil metílico: diclorometano (2:1). Os tubos foram agitados durante 40 min em agitador horizontal (agitador de mesa recíprocante modelo MA 139/CTF da Marconi) e em seguida centrifugados por 10 min a 1275g (centrífuga refrigerada Hitachi® modelo CF8DL, Tokyo, Japão). As fases orgânicas foram separadas e concentradas em sistema de evaporação a vácuo (Christ®, modelo RVC 2-25 CD plus,

Funkenstörungsgrad, Alemanha). Os resíduos obtidos foram retomados em 250 µL da fase móvel e 15 µL foram submetidos à análise cromatográfica.

3.4 Determinação da ordem de eluição dos enantiômeros do MHD

A ordem de eluição dos enantiômeros do MHD foi determinada com base na coleta dos picos individuais obtidos na coluna de fase quiral Chiralcel® OD-H (150 x 4,6 mm, partículas de 10 µm), seguida de posterior injeção na coluna Chiralcel® OD-H (250 x 4,6 mm, partículas de 10 µm) e detecção por UV, conforme descrito por Volosov et al. (2000).

Uma alíquota de 50 µL de solução de MHD racêmico (12,5 µg de cada enantiômero/mL de metanol) foi evaporada até a secura e retomada em 500 µL de fase móvel (hexano:etanol:isopropanol, 80:15:5, v/v/v), dos quais 40 µL foram injetados no sistema HPLC com coluna Chiralcel® OD-H (150 x 4,6 mm) e detecção por UV em 210 nm. Os picos referentes a cada um dos enantiômeros foram coletados em tubos distintos e o solvente evaporado até a secura.

Os resíduos foram retomados em 100 µL de fase móvel composto por uma mistura de hexano:etanol:isopropanol (18:2:1, v/v/v) com ácido acético glacial (0,1%), conforme descrito por Volosov et al. (2000). Uma alíquota de 40 µL foi injetada no sistema HPLC com coluna OD-R (250 x 4,6 mm) e detector por UV em 215 nm.

3.5 Teste de racemização

Para verificar a ocorrência de racemização, os enantiômeros MHD foram separados e coletados no sistema HPLC com detector por UV, operando em 210 nm, utilizando coluna Chiralcel® OD-H (150 X 4,6 mm) e fase móvel hexano:etanol:isopropanol (80:15:5, v/v/v) em fluxo de 1,3 mL/min. As alíquotas referentes aos enantiômeros individuais foram coletadas separadamente e o solvente foi evaporado até a secura. Parte dos resíduos correspondentes aos enantiômeros isolados foi retomada em fase móvel e analisada diretamente no sistema LC-MS/MS; outra parte foi usada para enriquecer alíquotas de 100 µL de plasma branco que foram submetidas ao procedimento de extração descrito anteriormente e analisadas no sistema LC-MS/MS.

3.6 Validação dos métodos de análise da OXC e dos enantiômeros do metabólito MHD total e livre em plasma

Os métodos de análise da OXC e dos enantiômeros do metabólito MHD total e livre em plasma foram validados de acordo com as recomendações da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012) para métodos bioanalíticos.

3.6.1 Efeito matriz

O efeito matriz foi avaliado através da comparação direta das áreas dos picos da oxcarbazepina, dos enantiômeros do MHD e PI injetados diretamente na fase móvel, com as áreas dos picos obtidas de soluções padrão correspondentes aos controles de qualidade baixo (CQB) e controle de qualidade alto (CQA) (37,5 ng e 4 µg de oxcarbazepina/mL de plasma, 93,75 ng e 10 µg de cada enantiômero do MHD/mL de plasma para a análise da concentração total e 12,0 ng e 1,0 µg de oxcarbazepina /mL de plasma, 60,0 ng e 5 µg de cada enantiômero do MHD/mL de plasma para a análise da concentração livre e 40 µg de 4-metilprimidona/mL de plasma) adicionados a extratos de plasma branco oriundos de oito diferentes voluntários, sendo quatro plasmas normais, dois lipêmicos e dois hemolisados. Para cada amostra foi obtido o fator de matriz normalizado por PI (FMN), conforme a fórmula a seguir:

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

O coeficiente de variação (CV) dos FMNs relativos a todas as amostras deve ser inferior a 15%.

3.6.2 Curvas de calibração

As curvas de calibração do método de análise da concentração total foram construídas em triplicata utilizando alíquotas de 100 µL de plasma branco enriquecidas com 12,5 µL de cada solução padrão de uso de OXC, do MHD e do PI

e submetidas ao processo de extração descrito anteriormente. Assim, as concentrações foram 12,5; 25; 50; 250; 500 ng e 1; 2; 3 e 5 µg de OXC/mL de plasma e 31,25; 62,5; 125; 625 ng e 1,25; 2,5; 5; 7,5 e 12,5 µg de cada enantiômero do MHD/mL de plasma.

Para o método de análise da concentração livre, as curvas de calibração foram construídas em triplicata utilizando alíquotas de 50 µL de ultrafiltrado branco enriquecidas com 25 µL de cada solução padrão de uso de OXC, do MHD e do PI e submetidas ao processo de extração descrito anteriormente. Assim, as concentrações foram 4,0; 10; 20; 100; 200; 400; 800 ng e 1,2 e 2 µg de OXC /mL de plasma e 20; 50; 100; 500 ng e 1,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 10,0 µg de cada enantiômero do MHD/mL de plasma.

As equações de regressão linear e os coeficientes de correlação foram obtidos das razões das áreas dos picos padrão/PI plotadas em função das respectivas concentrações plasmáticas.

3.6.3 Linearidade

A linearidade foi avaliada com amostras de plasma enriquecidas com concentrações crescentes dos fármacos (em triplicata) em relação àquelas empregadas na construção das curvas de calibração e, a seguir, submetidas aos procedimentos de extração e análise cromatográfica. Os métodos foram considerados lineares no intervalo de concentrações de 12,5 ng-5 µg de OXC /mL de plasma e de 31,25 ng - 12,5 µg de cada enantiômero do MHD/mL de plasma para a análise do fármaco total e no intervalo de concentrações de 4,0 ng - 2 µg de OXC /mL de plasma e de 20,0 ng - 10,0 µg de cada enantiômero do MHD/mL de plasma para a análise do fármaco livre.

3.6.4 Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) para a análise do fármaco total foi obtido pela análise em dez replicatas de amostras de plasma enriquecidas com OXC e MHD na concentração de 12,5 ng de OXC /mL de plasma e de 31,25 ng de cada enantiômero do MHD/mL de plasma. Para a análise do fármaco livre, dez replicatas de amostras

do ultrafiltrado foram enriquecidas com OXC e MHD na concentração de 4,0 ng de OXC /mL de plasma e de 20,0 ng de cada enantiômero do MHD/mL de plasma. O LQ foi definido como a menor concentração plasmática analisada com CV e erro padrão relativo (EPR) inferiores a 20%. O EPR é calculado conforme a fórmula a seguir:

$$\text{EPR} = \frac{(\text{concentração média experimental} - \text{concentração teórica})}{\text{concentração teórica}} \times 100$$

3.6.5 Recuperação

A recuperação foi avaliada em quintuplicata em amostras de plasma enriquecidas com soluções padrão CQB e CQA de OXC (31,25 ng/mL; 2,4 e 4,0 µg/mL) e MHD (93,75 ng de cada enantiômero/mL; 6 e 10 µg de cada enantiômero/mL). As amostras foram analisadas como acima descrito e a recuperação calculada através da comparação direta das áreas dos picos das amostras extraídas com as alturas dos picos obtidos de soluções padrão adicionadas a extratos de plasma branco.

3.6.6 Precisão e exatidão

A precisão e a exatidão dos métodos foram avaliadas através de estudos intra e interensaios do LQ, CQB, controle de qualidade médio (CQM), CQA e controle de qualidade de diluição (CQD). As soluções foram preparadas nas concentrações de 12,5; 30 ng e 2,4; 3,8 e 8 µg de OXC/mL de plasma e nas concentrações de 31,25; 75 ng e 6; 9,6 e 20 µg de cada enantiômero de MHD/mL de plasma para análise do fármaco total e nas concentrações de 4,0; 12 ng e 0,6; 0,96 e 1,6 µg de OXC/mL de plasma e nas concentrações de 20,0; 60,0 ng e 3; 4,8 e 8,0 µg de cada enantiômero de MHD/mL de plasma para a análise do fármaco livre. Essas soluções foram separadas em alíquotas e armazenadas a -20 °C até a análise. Para a avaliação da precisão e da exatidão intra-ensaio foram analisadas 5 alíquotas de cada uma dessas soluções em uma mesma corrida analítica. Na avaliação da precisão e da exatidão interensaios foram analisadas 5 alíquotas de cada uma das soluções de OXC e MHD durante 3 diferentes corridas em dias distintos.

O CV e EPR do das amostras do LQ deve ser inferior a 20% e inferiores a 15% para o CQB, CQM, CQA e CQD.

3.6.7 Estabilidade

Foram avaliadas as estabilidades após ciclos de congelamento e descongelamento, pós-processamento e estabilidade de curta duração. Para a avaliação da estabilidade da OXC foram preparadas amostras enriquecidas de CQB e CQA (30 ng e 3,84 µg de cada enantiômero/mL de plasma e 75 ng e 9,6 µg de cada enantiômero de MHD/mL de plasma para a análise do fármaco total e 12,0 ng e 0,96 µg de OXC/mL de plasma e 60 ng e 4,8 µg de cada enantiômero de MHD/mL de plasma para a análise do fármaco livre). Para verificar a estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento, as amostras enriquecidas foram congeladas a -20°C por pelo menos 24 h, a seguir foram descongeladas e congeladas novamente por 24 h, repetindo-se esse processo até o terceiro ciclo de congelamento quando foram extraídas e analisadas. Para a avaliação da estabilidade pós-processamento, as amostras extraídas foram mantidas no auto-injetor a 4°C durante 24 h antes da injeção no sistema cromatográfico. Para a avaliação da estabilidade de curta duração as amostras enriquecidas de plasma foram mantidas na bancada do laboratório em temperatura ambiente durante 6 h. As amostras foram também mantidas congeladas a -70°C por 6 meses para a avaliação da estabilidade de longa duração.

Os resultados das análises dos controles de qualidade foram comparados com o valor nominal, devendo estar dentro de $\pm 15\%$ do valor nominal.

3.7 Protocolo clínico

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Processo nº 214) e do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. O estudo foi realizado após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelo sujeito da pesquisa (Apêndice I). Foi investigado um voluntário de 30 anos de idade, não obeso, não tabagista, com funções hepática, renal e cardíaca dentro dos limites de normalidade.

O voluntário sadio recebeu 300 mg/12h de OXC (Trileptal[®] comprimidos de 300 mg Novartis) durante 5 dias. As coletas seriadas de sangue foram feitas após a administração da dose de oxcarbazepina da manhã com 200 mL de água, durante o intervalo de dose de 12h. As amostras de sangue (5mL) foram coletadas via cateter intravenoso em seringas heparinizadas (Liquemine[®] 5000UI, Roche) nos tempos zero; 0,25; 0,5; 0,45 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 5; 6; 8; 10 e 12 h após a administração da 9ª dose do fármaco.

Os plasmas para análise cromatográfica foram obtidos por centrifugação (850g x 10 min) das amostras de sangue. As amostras de plasma foram armazenadas a -70°C até o momento da análise.

3.8 Análise farmacocinética

Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados com base nas concentrações plasmáticas da oxcarbazepina e dos enantiômeros do metabólito MHD obtidas no estado de equilíbrio durante o intervalo de dose de 12h. O volume de distribuição aparente (V_{ss}/F) foi calculado pela fórmula: $V_{ss}/F = CL_{ss}/F \times MRT$, na qual MRT é o tempo médio de residência. Foi empregado o programa WinNonlin, versão 4.0 (Pharsight Corp, Mountain View, Calif, EUA). Os dados de concentração plasmática *versus* tempo após a administração oral da OXC foram analisados por metodologia não compartimental.

A fração livre no plasma (f_u) foi determinada para o voluntário investigado no tempo de observação da concentração plasmática máxima (t_{max}), como se segue:

$$f_u = \frac{\text{concentração plasmática livre}}{\text{concentração plasmática total}}$$

4 RESULTADOS

4.1 Análise da OXC e dos enantiômeros do metabólito MHD total e livre em plasma

O presente estudo apresenta a análise sequencial da OXC e dos enantiômeros do MHD em plasma humano utilizando LC-MS/MS. A Figura 1.1 mostra os íons protonados $[M + H]^+$ e seus respectivos íons produtos monitorados nas transições 253>180 para a OXC e 255>194 para o metabólito MHD.

A

B

C

D

Figura 1.1: Espectro de massas do íon molecular protonado (A) e do íon produto (B) da OXC e do íon molecular protonado (C) e do íon produto (D) do MHD.

A OXC e os enantiômeros do MHD foram separados na coluna de fase quiral Chiralcel® OD-H (150 x 4,6 mm) com fase móvel hexano:etanol:isopropanol (80:15:5, v/v/v), com tempo de corrida de aproximadamente 12 min para a análise da concentração total e 15 min para a determinação da concentração livre. Os cromatogramas obtidos estão apresentados na Figura 1.2 e 1.3.

Figura 1.2: Cromatogramas referentes à análise da OXC e dos enantiômeros do MHD em plasma. (A) Plasma branco enriquecido com OXC (0,25 µg/mL), MHD (0,625 µg de cada enantiômero/mL) e padrão interno (PI - 4-metilprimidona - 40 µg/mL) e (B) Plasma de um voluntário sadio obtido 1h após a administração da última dose de 300 mg oral de OXC.

Figura 1.3: Cromatogramas referentes à análise da OXC e dos enantiômeros do MHD livre em plasma. (A) Ultrafiltrado de plasma branco; (B) Ultrafiltrado de plasma branco enriquecido com OXC (0,2 µg/mL), MHD (0,1 µg de cada enantiômero/mL) e padrão interno (PI - 4-metilprimidona - 40 µg /mL) e (C) Ultrafiltrado de plasma de um voluntário sadio obtido 1h após a administração da última dose de 300 mg oral de OXC.

4.2 Ordem de eluição dos enantiômeros do MHD

A ordem de eluição dos enantiômeros do MHD foi determinada com base na coleta dos picos individuais obtidos na coluna de fase quiral Chiralcel® OD-H (150 x 4,6 mm, partículas de 10 µm), seguida de posterior injeção na coluna Chiralcel® OD-H (250 x 4,6 mm, partículas de 10 µm) e detecção por UV, conforme descrito por Volosov et al. (2000).

Os tempos de retenção de cada enantiômero coletado de acordo com o procedimento desenvolvido no presente estudo e analisados de acordo com o método descrito por Volosov et al. (2000) foram comparados aos dos referidos autores para a identificação da ordem de eluição. No método desenvolvido os analitos foram eluídos na seguinte ordem: R-(-)-MHD, S-(+)-MHD, PI e OXC.

4.3 Racemização

O teste de racemização foi realizado numa etapa anterior à validação do método através da análise de amostras de plasma branco enriquecidas com os enantiômeros individuais e foi demonstrada ausência de racemização durante o procedimento de extração.

4.4 Validação dos métodos de análise da OXC e dos enantiômeros do metabólito MHD total e livre em plasma

Os dados apresentados na Tabela 1.1 indicam que o efeito matriz na ionização da OXC e dos enantiômeros do MHD em plasma humano é praticamente ausente em ambos os métodos. Os dados mostram valores próximos a 100% quando foram comparados o fator da matriz normalizado por PI (FMN) em solução padrão e de soluções padrão adicionadas a extratos de plasma ou ultrafiltrado branco obtidos de oito diferentes indivíduos, sendo 4 plasmas normais, 2 lipêmicos e 2 hemolisados.

Tabela 1.1: Efeito matriz para a OXC e enantiômeros do MHD total e livre em oito diferentes lotes de plasma humano, sendo 4 normais, 2 lipêmicos e 2 hemolisados.

Concentração	Efeito matriz (%)	CV (%)
Concentração total		
OXC (37,5 ng/mL e 4,0 µg/mL)	87,62	14,45
R-(-)-MHD (93,75 ng/mL e 10,0 µg/mL)	98,55	13,58
S-(+)-MHD (93,75 ng/mL e 10,0 µg/mL)	95,85	11,92
Concentração livre		
OXC (12,0 ng/mL e 1,0 µg/mL)	97,26	13,31
R-(-)-MHD (60,0 ng/mL e 5,0 µg/mL)	94,27	4,55
S-(+)-MHD (60,0 ng/mL e 5,0 µg/mL)	98,87	5,74

FMN: Fator da matriz normalizado por PI [(Resposta do analito em matriz/Resposta do PI em matriz)/ (Resposta do analito em solução padrão/Resposta do PI em solução padrão)]; Efeito matriz = FMN *100; Coeficiente de variação (CV) [(Desvio padrão/média) x 100].

As curvas de calibração construídas empregando as razões de alturas *versus* concentração da OXC total (12,5 ng-5,0 µg/mL de plasma) e livre (4,0 ng-2,0 µg/mL de plasma) e dos enantiômeros do MHD total (31,25 ng-12,5 µg de cada enantiômero/mL de plasma) e livre (20,0 ng-6,0 µg de cada enantiômero/mL de plasma) mostraram linearidade nos referidos intervalos, com coeficientes de correlação superiores a 0,99. Os amplos intervalos lineares abrangem todas as concentrações experimentadas. Os coeficientes de variação obtidos nos estudos de precisão e a porcentagem de inexatidão inter e intra-ensaios foram inferiores a 15%, assegurando a reprodutibilidade e repetibilidade dos resultados. Os valores da recuperação do método de extração da OXC e dos enantiômeros do MHD com solução de éter tert-butil metílico:diclorometano foram superiores a 92% para a OXC e superiores a 97% para os enantiômeros do MHD (Tabelas 1.2-1.5).

Tabela 1.2: Limites de confiança do método de análise da OXC total em plasma.

	OXC total
Recuperação (%)	
37,5 ng/mL (n = 5)	101,37
2,4 µg/mL (n = 5)	93,47
4,0 µg/mL (n = 5)	92,82
Linearidade	12,5 ng/mL -5,0 µg/mL
Equação da reta	y=0,353x+0,0003
r	0,995
Limite de Quantificação (ng/mL)	12,5
Precisão (CV %, n = 10)	7,76
Exatidão (EPR %)	0,57
Precisão intra-ensaio (CV %)	
12,5 ng/mL (n = 5)	6,34
30,0 ng/mL (n = 5)	7,40
2,4 µg/mL (n = 5)	8,71
3,84 µg/mL (n = 5)	5,12
8,0 µg/mL (1:2) (n = 5)	7,45
Precisão interensaios (CV %)	
12,5 ng/mL (n = 15)	7,82
30,0 ng/mL (n = 15)	8,71
2,4 µg/mL (n = 15)	11,64
3,84 µg/mL (n = 15)	8,90
8,0 µg/mL (1:2) (n = 15)	7,77
Exatidão intra-ensaio (EPR %)	
12,5 ng/mL (n = 5)	2,4
30,0 ng/mL (n = 5)	2,67
2,4 µg/mL (n = 5)	3,79
3,84 µg/mL (n = 5)	7,02
8,0 µg/mL (1:2) (n = 5)	10,50
Exatidão interensaios (EPR %)	
12,5 ng/mL (n = 15)	0,80
30,0 ng/mL (n = 15)	7,11
2,4 µg/mL (n = 15)	-1,67
3,84 µg/mL (n = 15)	0,85
8,0 µg/mL (1:2) (n = 15)	7,48

Coeficiente de variação (CV) [(Desvio padrão/média) x 100]; r = coeficiente de correlação linear. Erro Padrão Relativo (EPR) = [(C_{experimental}-C_{nominal})/C_{nominal}] $\times$ 10.

Tabela 1.3: Limites de confiança do método de análise da OXC livre em plasma.

	OXC livre
Linearidade	4,0 ng/mL - 2,0 µg/mL
Equação da reta	$Y=2,219x+0,0009$
r	0,998
Limite de quantificação (ng/mL)	4,0
Precisão (CV %, n = 10)	10,52
Exatidão (EPR %)	8,06
Precisão intra-ensaio (CV %)	
4,0 ng/mL (n = 5)	9,4
12,0 ng/mL (n = 5)	5,79
0,6 µg/mL (n = 5)	3,40
0,96 µg/mL (n = 5)	7,93
1,6 µg/mL (1:1) (n = 5)	9,69
Precisão interensaios (CV %)	
4,0 ng/mL (n = 5)	9,18
12,0 ng/mL (n = 5)	7,70
0,6 µg/mL (n = 5)	9,50
0,96 µg/mL (n = 5)	7,59
1,6 µg/mL (1:1) (n = 5)	9,16
Exatidão intra-ensaio (EPR %)	
4.0 ng/mL (n = 5)	9.37
12.0 ng/mL (n = 5)	-12.17
0.6 µg/mL (n = 5)	-9.8
0.96 µg/mL (n = 5)	-12.62
1,6 µg/mL (1:1) (n = 5)	-14,16
Exatidão interensaios (EPR %)	
4,0 ng/mL (n = 5)	10,17
12,0 ng/mL (n = 5)	-10,82
0,6 µg/mL (n = 5)	-3,55
0,96 µg/mL (n = 5)	-13,48
1,6 µg/mL (1:1) (n = 5)	-11,66

Coeficiente de variação (CV) [(Desvio padrão/média) x 100]; r = coeficiente de correlação linear. Erro Padrão Relativo (EPR) = $[(C_{\text{experimental}} - C_{\text{nominal}})/C_{\text{nominal}}] \times 100$.

Tabela 1.4: Limites de confiança do método de análise dos enantiômeros do MHD total em plasma.

	R-(-)-MHD total	S-(+)-MHD total
Recuperação (%)		
93,75 ng/mL (n = 5)	99,37	99,20
6,0 µg/mL (n = 5)	98,02	97,75
10,0 µg/mL (n = 5)	97,25	99,78
Linearidade	31,25 ng - 12,5 µg/mL	31,25 ng - 12,5 µg/mL
Equação da reta	y=0,349x+0,002	y=0,364x+0,002
r	0,992	0,997
Limite de Quantificação (ng/mL)	31,25	31,25
Precisão (CV %, n = 8)	7,40	4,40
Exatidão (EPR %)	0,80	-5,20
Precisão intra-ensaio (CV %)		
31,25 ng/mL (n = 5)	4,83	3,56
75,0 ng/mL (n = 5)	6,97	10,95
6,0 µg/mL (n = 5)	5,08	6,03
9,6 µg/mL (n = 5)	7,77	6,83
20,0 µg/mL (1:2) (n = 5)	2,38	2,30
Precisão interensaios (CV %)		
31,25 ng/mL (n = 15)	5,58	4,11
75,0 ng/mL (n = 15)	11,23	10,48
6,0 µg/mL (n = 15)	5,18	4,22
9,6 µg/mL (n = 15)	5,25	4,64
20,0 µg/mL (1:2) (n = 15)	3,05	2,95
Exatidão intra-ensaio (EPR %)		
31,25 ng/mL (n = 5)	0,48	-1,44
75,0 ng/mL (n = 5)	-5,33	-8,27
6,0 µg/mL (n = 5)	1,01	-0,22
9,6 µg/mL (n = 5)	-3,43	0,88
20,0 µg/mL (1:2) (n = 5)	6,35	12,20
Exatidão interensaios (EPR %)		
31,25 ng/mL (n = 15)	-0,16	-1,44
75,0 ng/mL (n = 15)	-1,07	2,58
6,0 µg/mL (n = 15)	-3,57	-1,40
9,6 µg/mL (n = 15)	-3,28	0,51
20,0 µg/mL (1:2) (n = 15)	7,80	11,29

Coeficiente de variação (CV) [(Desvio padrão/média) x 100]; r = coeficiente de correlação linear. Erro Padrão Relativo (EPR) = [(C_{experimental}-C_{nominal})/C_{nominal}] $\times$ 100.

Tabela 1.5: Limites de confiança do método de análise dos enantiômeros do MHD livre em plasma.

	R-(-)-MHD livre	S-(+)-MHD livre
Linearidade	20,0 ng/mL - 6,0 µg/mL	20,0 ng/mL - 6,0 µg/mL
Equação da reta	$y=0,4039x+0,0019$	$y=0,4286x+0,0012$
r	0,9988	0,9992
Limite de quantificação (ng/mL)	20,0	20,0
Precisão (CV %, n = 10)	6,84	9,20
Exatidão (EPR %)	-9,83	-3,28
Precisão intra-ensaio (CV %)		
20,0 ng/mL (n = 5)	7,71	10,20
60 ng/mL (n = 5)	14,52	8,48
3,0 µg/mL (n = 5)	7,52	8,09
4,0 µg/mL (n = 5)	12,3	8,74
8,0 µg/mL (1:1) (n = 5)	12,29	8,16
Precisão interensaio (CV %)		
20,0 ng/mL (n = 5)	1,89	1,90
60 ng/mL (n = 5)	5,44	1,25
3,0 µg/mL (n = 5)	3,05	2,37
4,0 µg/mL (n = 5)	13,69	1,42
8,0 µg/mL (1:1) (n = 5)	4,19	4,53
Exatidão intra-ensaio (EPR %)		
20,0 ng/mL (n = 5)	7,71	10,20
60 ng/mL (n = 5)	14,52	4,45
3,0 µg/mL (n = 5)	-7,61	-5,91
4,0 µg/mL (n = 5)	-6,98	-2,93
8,0 µg/mL (1:1) (n = 5)	-13,51	-12,76
Exatidão interensaio (EPR %)		
20,0 ng/mL (n = 5)	1,27	6,50
60,0 ng/mL (n = 5)	9,23	9,91
3,0 µg/mL (n = 5)	2,89	2,59
4,0 µg/mL (n = 5)	13,50	10,94
8,0 µg/mL (1:1) (n = 5)	1,55	-1,31

Coeficiente de variação (CV) $[(\text{Desvio padrão}/\text{média}) \times 100]$; r =coeficiente de correlação linear. Erro Padrão Relativo (EPR)= $[(C_{\text{experimental}}-C_{\text{nominal}})/C_{\text{nominal}}] \times 100$.

A OXC e os enantiômeros do MHD total e livre demonstraram estabilidade em plasma e ultrafiltrado durante três ciclos de congelamento e descongelamento, durante 4h em temperatura ambiente e após o processamento durante 24h no auto-injetor, já que foram revelados desvios inferiores a 15% (Tabelas 1.6 e 1.7).

Tabela 1.6: Estudo de estabilidade do método de análise da oxcarbazepina e dos enantiômeros do MHD total em plasma.

Concentração	Estabilidade (% desvio)			
	Curta duração (4 horas)	Pós cong/descong (3 ciclos)	Pós processamento (24 horas)	Longa duração (6 meses)
OXC				
30,0 ng/mL	6,67	6,00	2,67	5,84
3,84 µg/mL	11,21	-0,87	11,31	6,58
R-(-)-MHD				
75,0 ng/mL	-1,87	-12,80	-5,33	4,12
9,6 µg/mL	-12,04	3,53	-6,89	6,42
S-(+)-MHD				
75,0 ng/mL	8,53	1,07	-8,27	3,91
9,6 µg/mL	-5,30	5,25	-4,13	6,28

$$\% \text{ desvio} = [(C_{\text{experimental}} - C_{\text{nominal}}) / C_{\text{nominal}}] \times 100.$$

Tabela 1.7: Estudo de estabilidade do método de análise da OXC e dos enantiômeros do MHD livre em plasma.

Concentração	Estabilidade (% desvio)			
	Curta duração (4 horas)	Pós cong/descong (3 ciclos)	Pós processamento (24 horas)	Longa duração (6 meses)
OXC				
12,0 ng/mL	-11,40	-14,60	-12,40	4,78
0,96 µg/mL	-13,21	-9,45	-12,97	-10,78
R-(-)-MHD				
60,0 ng/mL	-2,70	2,57	14,50	5,87
4 µg/mL	9,10	11,52	14,07	14,04
S-(+)-MHD				
60,0 ng/mL	-0,90	3,47	13,83	6,20
4,0 µg/mL	10,13	13,40	12,53	14,80

$$\% \text{ desvio} = [(C_{\text{experimental}} - C_{\text{nominal}}) / C_{\text{nominal}}] \times 100.$$

4.5 Estudo clínico

O método desenvolvido e validado para a análise da concentração total foi aplicado no estudo da disposição cinética da OXC e dos enantiômeros do MHD no estado de equilíbrio após administração de 300 mg/12h de OXC por via oral a um voluntário sadio. A análise da concentração livre dos fármacos foi realizada somente na amostra coletada no t_{max} da OXC.

As curvas de concentração plasmática *versus* tempo, construídas a partir da análise de amostras seriadas de plasma de um voluntários sadio coletadas no estado de equilíbrio, no intervalo de dose de 12 h após a administração da 9ª dose de 300 mg de oxcarbazepina racêmica por via oral, no quinto dia de tratamento, estão apresentadas na Figura 1.4. Os parâmetros farmacocinéticos e os valores da fração livre da OXC e dos enantiômeros do MHD estão apresentados na Tabela 1.8.

Figura 1.4: Curvas de concentrações plasmáticas *versus* tempo da OXC e dos enantiômeros do MHD em um voluntário sadio tratado com 300 mg/12h de OXC.

Tabela 1.8: Farmacocinética da OXC e dos enantiômeros do MHD em um voluntário sadio tratado com 300 mg/12h de OXC por via oral.

Parâmetro	OXC	R-(-)-MHD	S-(+)-MHD
C_{max} (µg/mL)	1,20	1,90	9,43
t_{max} (h)	0,75	2,5	4,0
AUC⁰⁻¹² (µg.h/mL)	2,30	17,42	94,81
C_{média} (µg/mL)	0,19	1,45	7,90
MRT (h)	3,48	25,89	20,03
t_{1/2} (h)	1,50	17,67	12,40
Kel (h⁻¹)	0,46	0,039	0,06
V_{ss}/F (L)	453,63	-	-
CL_{ss}/F (L/h)	130,36	-	-
Flutuação (%)	610,54	51,93	38,58
f_u	0,37	0,44	0,38
AUC⁰⁻¹²_{S-(+)/R-(-)}		5,44	

C_{max}: concentração plasmática máxima; t_{max}: tempo para alcançar C_{max}; AUC⁰⁻¹²: área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo; C_{média}: Concentração plasmática média no estado de equilíbrio; MRT: Tempo médio de residência; t_{1/2}: meia-vida de eliminação; Kel: constante de velocidade de eliminação; V_{ss}/F: volume de distribuição aparente no estado de equilíbrio; CL_{ss}/F: *clearance* total aparente no estado de equilíbrio; f_u=fração livre.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, os métodos de análise sequencial da OXC e dos enantiômeros do MHD total e livre no plasma utilizando LC-MS/MS e extração líquido-líquido foram desenvolvidos, validados e aplicados em estudo de farmacocinética. Embora métodos de análise da OXC e dos enantiômeros do MHD já tenham sido relatados na literatura, foi necessário o desenvolvimento de métodos com menores limites de quantificação da OXC para a quantificação de amostras durante o intervalo de dose de 12 h, assim como para a determinação da concentração livre. De acordo com May, Korn-Merker e Rambeck (2003), como a OXC é rapidamente eliminada do plasma, a determinação precisa da sua concentração no plasma e os cálculos farmacocinéticos são mais difíceis. Além disso, isso pode explicar algumas discrepâncias e a falta de informações sobre os parâmetros farmacocinéticos da OXC. Flesch et al. (2011) relataram que a maioria das concentrações plasmáticas da OXC, após a administração de dose oral única de 300 mg do fármaco a voluntários sadios, foram abaixo do limite de quantificação, o que tornou impossível o cálculo dos parâmetros *clearance* (CL), volume de distribuição (V) e meia-vida de eliminação ($t_{1/2}$).

Os limites de quantificação obtidos no presente estudo foram de 12,5 ng OXC/mL de plasma e 31,25 ng de cada enantiômero MHD/mL de plasma para a análise da concentração total (Tabelas 1.2 e 1.4), enquanto foi de 4,0 ng de OXC/mL de plasma e de 20,0 ng de cada enantiômero do MHD/mL de plasma para a determinação da concentração livre (Tabelas 1.3 e 1.5). Estes métodos são mais sensíveis do que aqueles relatados na literatura utilizando extração em fase sólida, seguido por LC-MS/MS, os quais mostram os limites de quantificação de 50 ng/mL para a OXC e para cada enantiômero do MHD (LOUREIRO et al, 2011; PERUCCA et al, 2011). Com esses limites de quantificação mais baixos, foi possível determinar a concentração total da OXC em todas as amostras coletadas de um voluntário saudável, no estado de equilíbrio, durante 12 horas após a administração por via oral da 9ª dose de 300 mg de OXC no quinto dia de tratamento e também quantificar a concentração livre da OXC na amostra coletada no $t_{\max}$ para o cálculo da fração livre.

O método de análise da concentração livre é o mesmo utilizado para a análise da concentração total da OXC e dos enantiômeros do MHD, porém precedido da

etapa de ultrafiltração, realizada utilizando o dispositivo de ultrafiltração Centrifree® para separação do fármaco livre do ligado às proteínas plasmáticas. No processo de ultrafiltração, as moléculas pequenas (fármaco livre) contidas no componente aquoso do plasma são forçadas pela pressão do gradiente a passar através da membrana permeável seletivamente e são coletadas no compartimento do ultrafiltrado. O fármaco ligado às proteínas, por ser uma molécula grande, não atravessa a membrana e, conseqüentemente, não atinge o ultrafiltrado (DE MORAES et al., 2012; ZHANG et al., 2013).

A OXC e os enantiômeros do MHD total e livre foram separados na coluna de fase quiral Chiralcel® OD-H (150 x 4,6 mm) com fase móvel hexano:etanol:isopropanol (80:15:5, v/v/v), com tempo de corrida de aproximadamente 12min para a análise da concentração total (Figura 1.2) e 15 min para a análise da concentração livre (Figura 1.3). Outros métodos de análise dos enantiômeros do MHD em plasma humano utilizando a coluna Chiralcel® OD-H apresentaram tempos de corridas superiores a 12 min (FLESCH et al., 1992; VOLOSOV et al., 1999; VOLOSOV et al., 2000). Os valores de recuperação (92% para OXC e maior que 97% para os enantiômeros MHD - Tabelas 1.2 e 1.5) estão de acordo com os observados por Volosov et al. (2000), os quais relataram valores de recuperação acima de 90% ± 5% para os enantiômeros MHD e melhor do que os relatados por Mazzucchelli et al. (2007), com valores de 82% ± 16% para a OXC, 81% ± 7% para o R-(-)-MHD e 70% ± 19% para o S-(+)-MHD, ambos utilizando o mesmo solvente extrator aqui relatado.

Os métodos desenvolvidos e validados apresentam limites de quantificação, estabilidade, precisão e exatidão compatíveis com a aplicação em estudos de disposição cinética e metabolismo da OXC e dos enantiômeros MHD no estado de equilíbrio e com a determinação da fração livre dos fármacos em amostra coletada no $t_{\max}$. O método de análise da concentração total foi utilizado para avaliar a disposição cinética da OXC e dos enantiômeros MHD no estado de equilíbrio, após a administração oral de 300 mg/12 h de OXC em um voluntário sadio. Já o método de análise da concentração livre foi utilizado para a análise da amostra coletada no $t_{\max}$ para determinação da fração livre dos fármacos.

A OXC alcançou a $C_{\max}$ (concentração plasmática máxima) de 1,2 µg/mL em 0,75 h ($t_{\max}$) (Tabela 1.8) no voluntário sadio incluído no estudo. Esses dados confirmam a rápida absorção da OXC após administração oral e sua quase imediata

redução ao metabólito MHD. A disposição cinética do MHD é enantiosseletiva no voluntário sadio investigado, com razão $AUC^{0-12}_{S-(+)/R-(-)}$ de 5,44. Os valores de C_{max} , concentração plasmática média no estado de equilíbrio ($C_{média}$), meia-vida de eliminação e tempo médio de residência (MRT) também mostram diferenças entre os enantiômeros do MHD (Tabela 1.8). A fração livre avaliada no t_{max} da OXC foi 0,37 para a OXC, 0,44 para o R-(-)-MHD e 0,38 para o S-(+)-MHD (Tabela 1.8) no voluntário sadio investigado, mostrando uma maior ligação do S-(+)-MHD às proteínas plasmáticas em relação ao R-(-)-MHD.

6 CONCLUSÃO

Os métodos de análise sequencial da OXC e dos enantiômeros do MHD total e livre em plasma, empregando a coluna de fase quiral Chiralcel® OD-H acoplada ao sistema LC-MS/MS, apresentam limites de confiança compatíveis com a aplicação em estudo clínico da farmacocinética da OXC no estado de equilíbrio em voluntários sadios e do fármaco livre em amostras coletadas no $t_{\max}$ para a determinação da fração livre.

Capítulo 2

**Influência do verapamil na farmacocinética não compartimental da
oxcarbazepina e dos enantiômeros do metabólito 10-
hidroxicarbazepina em voluntários sadios**

1 INTRODUÇÃO

A OXC foi desenvolvida através da variação estrutural da carbamazepina com a finalidade de evitar o metabolismo oxidativo através do sistema CYP, e consequentemente diminuir as interações medicamentosas causadas pela inibição de suas isoformas (SCHIMIDT & SACHDEOT, 2000).

A biodisponibilidade oral da OXC avaliada através das concentrações plasmáticas do MHD é de 99% (FLESCH et al., 2011). A ligação da OXC às proteínas plasmáticas é de aproximadamente 59% e do metabólito MHD como mistura racêmica é em torno de 39% em pacientes com neuralgia do trigêmeo (PATSALOS; ELYAS; ZAKRZEWSKA, 1990). O volume de distribuição parente (V/F) da OXC é de 548,8 L e do MHD de 49,0 L em pacientes epiléticos (BRING & ENSOM, 2008; DICKINSON et al, 1989; WELLINGTON & GOA, 2001).

O átomo de carbono do grupo carbonila da OXC contém um centro pró-quiral, o que resulta na formação estereoespecífica do MHD. O metabolismo da OXC, dependente de redutases citosólicas, resulta em aproximadamente 80% de S-(+)-MHD e 20% de R-(-)-MHD. As principais enzimas envolvidas na redução da OXC são as aldo-ceto redutases família 1 e membros 1 (AKR1C1) e 2 (AKR1C2), que contribuem principalmente na formação do S-(+)-MHD, e as aldo-ceto redutases família 1 e membros 3 (AKR1C3) e 4 (AKR1C4), que produzem preferencialmente o R-(-)-MHD. As carbonil redutases 1 (CBR1) e 3 (CBR3) também contribuem para esse processo de forma não muito clara (Figura 2.1) (FLESCH et al., 1992; MALÁTKOVÁ; HAVLÍKOVÁ; WSÓL; 2014).

A OXC é excretada pelos rins como OXC inalterada (< 1%), MHD (27%) ou como conjugados glucuronídeos da OXC (9%) ou do MHD (49%) (TECOMA, 1994; WELLINGTON & GOA, 2001). Outros metabólitos na urina incluem o DHD (10,11-dihidro-10,11-trans-dihidroxicarbamazepina) formado pela oxidação do MHD (cerca de 4%) (Figura 2.1) (PAGLIA et al., 2007; SCHÜTZ; FELDMANN; FAIGLE, 1986; VOLOSOV et al., 2000).

O *clearance* renal do MHD não exibe enantiosseletividade na administração intravenosa de MHD racêmico ($1,0 \pm 0,3$ L/h para o R-(-)-MHD e $1,1 \pm 0,3$ L/h para o S-(+)-MHD) ou de OXC oral ($0,9 \pm 0,2$ L/h para o R-(-)-MHD e S-(+)-MHD) a voluntários sadios (FLESCH et al., 2011).

Figura 2.1: Metabolismo da OXC (FLESCH et al., 2011; SCHUTZ et al., 1986; WELLINGTON & GOA, 2001).

O-SUL=O-Sulfato; O-GLU=O-Glucuronídeo; S-(+)-MHD=S-10-hidroxicarbazepina; R-(-)-MHD=R-10-hidroxicarbazepina; GLU-S-(+)-MHD=S-10-hidroxicarbazepina glucuronídeo; GLU-R-(-)-MHD=R-10-hidroxicarbazepina glucuronídeo; DHD=10,11-dihidro-10,11-trans-dihidroxicarbazepina; AKR1C1=aldo-ceto redutase família 1 e membro 1; AKR1C2= aldo-ceto redutase família 1 e membro 2; AKR1C3= aldo-ceto redutase família 1 e membro 3; AKR1C4=aldo-ceto redutase família 1 e membro 4; CBR1=carbonil redutase 1; CBR3=carbonil redutase 3.

A OXC e o MHD são substratos da P-gp, uma proteína transportadora de efluxo de membrana, membro da família dos transportadores ABC (*ATP-binding cassette*) e codificada pelo gene ABCB1 (*ATP-binding cassette, subfamília A*), também denominada de *MDR1* (ARONICA; SISODIYA; GORTER, 2012; FORTUNA et al., 2012; MARZOLINI et al., 2004; ZHANG et al., 2011). De acordo com a classificação biofarmacêutica, a OXC pertence à classe 2, por ser pouco solúvel em água (0,07 mg/mL), possuir alta permeabilidade através da monocamada celular Caco-2 e sofrer metabolismo extensivo. Para os fármacos dessa classe, o efeito dos transportadores de efluxo predominam no intestino, mas podem afetar também o fígado (BENET, 2009).

A P-gp está presente nas membranas apicais de vários órgãos, tais como o intestino delgado, cérebro, rins e fígado, influenciando assim nos processos de absorção, distribuição e eliminação e na farmacodinâmica de seus substratos (HILLGREN et al., 2013; KAUR et al., 2014). A P-gp tem uma função importante em proteger órgãos como o cérebro e a placenta da exposição a toxicantes. A P-gp expressa no intestino causa a diminuição da biodisponibilidade oral de fármacos administrados por via oral, os quais são transportados de volta para o lúmen gastrointestinal (ESTUDANTE et al., 2013; KAUR et al., 2014; ZAKERI-MILANI & VALIZADEH, 2014). Uma estratégia utilizada para aumentar a absorção oral de fármacos substratos da P-gp é a sua inibição, que geralmente ocorre por três mecanismos: o bloqueio do sítio de ligação do fármaco de forma competitiva, não competitiva ou alostérica; pela interferência na hidrólise do ATP; e pela alteração da integridade da membrana celular dos lipídios (AMIN, 2013; VARMA et al., 2003; ZAKERI-MILANI & VALIZADEH, 2014).

O verapamil é um inibidor competitivo da P-gp de primeira geração (AMIN, 2013; ZAKERI-MILANI & VALIZADEH, 2014). De acordo com Wahajuddin et al. (2014), o verapamil em função da inibição da P-gp aumenta a biodisponibilidade e reduz o *clearance* do lumefantrine administrado por via oral a ratos. Clinckers et al. (2005) relatam que a administração de verapamil potencializa a atividade anticonvulsivante da OXC em ratos com crises límbicas induzidas pela pilocarpina. O verapamil inibe a atividade da P-gp expressa no intestino e no fígado quando é administrado em dose única ou dose múltipla durante 10 dias em voluntários sadios (LEMMA et al., 2006).

Tendo em vista que a OXC e o MHD são substratos da P-gp e que o verapamil é seu inibidor, o presente estudo visa avaliar a influência do verapamil na farmacocinética não compartimental da OXC e do MHD após tratamento de 5 dias com 300 mg/12h de OXC associada ou não com 80mg/8h de verapamil em voluntários sadios. Os dados obtidos nesse estudo serão utilizados para a análise da farmacocinética populacional e correlação com os sinais dos SPECTs no próximo capítulo.

2 OBJETIVOS

- Avaliar a farmacocinética da OXC e dos enantiômeros do metabólito MHD em voluntários sadios;
- Avaliar a influência do inibidor da P-gp verapamil na farmacocinética da OXC e dos enantiômeros do metabólito MHD em voluntários sadios.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Casuística e protocolo clínico

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP) sob Protocolo CEP/FCFRP nº 214 e pelo CEP do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP). O estudo foi realizado após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice I) pelos sujeitos da pesquisa, os quais tiveram garantido o direito de participar ou não da pesquisa. Foi garantida a liberdade dos sujeitos da pesquisa se recusarem a participar ou retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma.

O cálculo do número de voluntários sadios foi realizado utilizando o programa Power and Sample Size versão 2.1.31 (Vanderbilt, EUA), considerando a variabilidade na farmacocinética da OXC em pacientes epiléticos tratados com dose única (DICKINSON et al., 1989). Considerando o poder do teste de 80%, erro padrão tipo I de 5%, média dos valores de AUC de 4,40 µg.h/mL com desvio padrão de 1,81 µg.h/mL e considerando uma diferença de pelo menos 37% entre os valores de AUC da OXC com e sem a administração do verapamil, deveriam ser incluídos 12 voluntários no estudo (Figura 2.2).

Figura 2.2: Gráfico do tamanho amostral em relação ao poder do teste.

Os voluntários sadios foram internados na Unidade de Pesquisa Clínica (UPC) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a realização das coletas das amostras seriadas de sangue.

Foram incluídos na investigação 12 voluntários sadios adultos (idade entre 22 e 45 anos), não obesos, não tabagistas, com funções hepática, renal e cardíaca dentro dos limites de normalidade. As mulheres em idade fértil somente foram incluídas quando o exame de Beta-gonadotrofina coriônica humana (BHCG) foi negativo. Foram excluídos os voluntários que apresentaram qualquer história de doenças ou insultos neurológicos e psiquiátricos prévios.

O estudo cruzado e aleatório foi desenvolvido em duas ocasiões:

- Na ocasião O (tratamento com OXC como monoterapia), os voluntários sadios receberam 300 mg/12h de OXC (Trileptal® comprimidos de 300 mg Novartis) durante 5 dias. No quinto dia, após jejum de pelo menos 10h, foi administrada a 9ª dose do fármaco com 200 mL de água. Os voluntários permaneceram em jejum até 4h e sem ingestão de água até 1h após a administração do fármaco. As amostras seriadas de sangue (5mL) foram coletadas via cateter intravenoso em seringas heparinizadas (Liquemine® 5000UI, Roche) nos tempos zero; 0,25; 0,5; 0,45 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 5; 6; 8; 10 e 12 h após a administração do fármaco.
- Na ocasião O+V (tratamento com OXC + verapamil), os voluntários sadios receberam 300 mg/12h de oxcarbazepina (Trileptal® comprimidos de 300 mg, Novartis) e 80 mg/8h de verapamil (Dilacorón® comprimidos revestidos de 80 mg, Abbott) durante 5 dias. No quinto dia, após jejum de pelo menos 10h, foi administrada a 9ª dose de verapamil e após 1h a 9ª dose de OXC com 200 mL de água. Os voluntários permaneceram em jejum até 4h e sem ingestão de água até 1h após a administração da OXC. As amostras seriadas de sangue (5mL) foram coletadas via cateter intravenoso em seringas heparinizadas (Liquemine® 5000UI, Roche) nos tempos zero; 0,25; 0,5; 0,45; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 5; 6; 8; 10 e 12 h após a administração do fármaco. Os plasmas para análise cromatográfica foram obtidos por centrifugação (850 g x 10 min) das amostras de sangue. As amostras de plasma foram armazenadas a -70°C até o momento da análise.

3.2 Análise da oxcarbazepina e dos enantiômeros do metabólito MHD total e livre em plasma

As análises da OXC e dos enantiômeros do metabólito MHD total e livre foram realizadas por LC-MS/MS, conforme descrito no Capítulo 1.

3.3 Análise farmacocinética

Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados com base nas concentrações plasmáticas da OXC e dos enantiômeros do metabólito MHD obtidas no estado de equilíbrio durante o intervalo de dose de 12h. O volume de distribuição aparente (V_{ss}/F) foi calculado pela fórmula: $V_{ss}/F = CL_{ss}/F \times MRT$. Os dados de concentração plasmática *versus* tempo após a administração oral da OXC foram analisados por metodologia não compartimental, empregando o programa WinNonlin, versão 4.0 (Pharsight Corp, Mountain View, Calif, EUA).

A fração livre no plasma (f_u) foi determinada para cada voluntário no tempo de observação da concentração plasmática máxima (t_{max}), conforme descrito no Capítulo 1.

3.4 Análise estatística

Os testes estatísticos foram realizados com o auxílio do programa GraphPad InStat para obtenção da mediana, média e intervalo de confiança de 95% (CI 95%). Para a avaliação das razões enantioméricas diferentes da unidade para o MHD e para comparar os parâmetros farmacocinéticos entre as ocasiões O e O+V foi empregado o teste de Wilcoxon bicaudal para dados pareados. Em todos os testes estatísticos o nível de significância foi fixado em 5%.

4 RESULTADOS

4.1 Protocolo clínico

Os voluntários sadios incluídos no presente estudo (n=12) toleraram o protocolo clínico sem apresentarem nenhum efeito adverso clinicamente significativo e todos mostraram parâmetros bioquímicos dentro dos limites da normalidade para as funções renal e hepática (Tabela 2.1). Os dados demográficos individuais estão apresentados na Tabela i (Apêndice II) e os resultados dos exames laboratoriais na Tabela ii (Apêndice III).

Tabela 2.1: Dados demográficos e parâmetros bioquímicos dos voluntários sadios investigados (n=12). Os dados estão expressos como mediana, média (IC 95%).

Variável	Valor
Idade (anos)	29,5 29,42(26,39-32,44)
Peso (Kg)	61,75 68,28(58,92-77,65)
Altura (m)	1,66 1,69(1,61-1,77)
IMC (Kg/m ²)	23,58 23,61(21,98-25,23)
Gênero (H/M)	4/8
Creatinina sérica (mg/dL)	0,86 0,93(0,81-1,06)
AST (U/L)	19,50 20,25(14,58-25,92)
Bilirubina total (mg/dL)	0,57 0,91(0,33-1,48)
Bilirubina direta (mg/dL)	0,20 0,28(0,14-0,42)
Bilirubina Indireta (mg/dL)	0,36 0,62(0,18-1,06)
Glicose (mg/dL)	84,00 84,45(79,12-89,77)
Gama GT (U/L)	19,00 26,55(16,34-24,77)
TSH (U/mL)	0,66 1,50(0,71-2,30)
Colesterol total	150,00 155,67(131,31-180,03)
HDL (mg/dL)	41,50 48,00(30,81-65,19)
LDL (mg/dL)	94,50 98,37(75,66-121,09)
Triglicérides (mg/dL)	69,00 68,11(52,66-83,56)

H=homem, M=mulher; IMC=índice de massa corpórea; AST=aspartato aminotransferase; Gama GT=gama-glutamil transferase; TSH=hormônio estimulante da tireóide; HDL=lipoproteína de alta densidade; LDL=lipoproteína de baixa densidade.

4.2 Disposição cinética e metabolismo da OXC e dos enantiômeros do metabólito MHD no estado de equilíbrio em voluntários sadios na ocasião O

A disposição cinética e o metabolismo da OXC e dos enantiômeros do metabólito MHD foram avaliados, no estado de equilíbrio, em voluntários sadios (n=12) após 300mg/12h de OXC administrada por via oral durante cinco dias. As curvas médias de concentração plasmática *versus* tempo estão apresentadas na Figura 2.3 e os parâmetros farmacocinéticos, expressos pela mediana, média e intervalo de confiança de 95% (IC 95%) estão apresentados na Tabela 2.2. Os parâmetros farmacocinéticos individuais estão apresentados nas Tabelas iii-v (Apêndice IV).

Figura 2.3 - Curvas de concentrações plasmáticas *versus* tempo da OXC e dos enantiômeros do MHD no estado de equilíbrio em voluntários sadios (n=12) após tratamento oral de 300mg/12h de OXC em monoterapia (Ocasião O) ou em associação com o verapamil (Ocasião O+V). Os dados estão expressos como média.

Tabela 2.2: Farmacocinética da OXC e dos enantiômeros do MHD em voluntários sadios tratados com 300 mg/12h de OXC por via oral na ocasião O (OXC em monoterapia). Os valores estão expressos como mediana, média (IC 95%).

Parâmetro	OXC	R-(-)-MHD	S-(+)-MHD
C_{max} (µg/mL)	1,35 1,55 (0,99- 2,10)	2,60 2,65 (2,09- 3,21)	11,05* 10,15 (9,02 - 11,27)
C_{max} livre (µg/mL)	0,32 0,40(0,26-0,54)	0,97 0,93 (0,72-1,14)	3,11* 3,28 (2,86-3,69)
t_{max} (h)	1,00 1,10 (0,71-1,50)	3,50 3,46 (2,80-4,11)	3,50 3,54 (2,93-4,15)
AUC⁰⁻¹² (µg.h/mL)	3,98 3,76 (2,87-4,65)	25,36 23,79 (19,01-28,57)	97,19* 97,87 (86,45-109,30)
C_{média} (µg/mL)	0,33 0,31 (0,24-0,39)	2,11 1,98 (1,58-2,38)	8,15* 8,10 (7,20-9,11)
MRT (h)	4,71 4,91 (4,04-5,78)	18,60 18,25 (15,66-20,84)	20,16 20,17 (16,89-23,45)
t_{1/2} (h)	2,45 2,38 (2,03-2,73)	12,13 11,68 (9,66-13,71)	11,66 12,14 (9,53-14,75)
Kel (h⁻¹)	0,28 0,31 (0,25-0,37)	0,06 0,06 (0,05-0,08)	0,05 0,06 (0,04- 0,07)
V_{ss}/F (L)	352,17 483,05 (277,95-688,16)	-	-
CL_{ss}/F (L/h)	75,58 95,63 (62,77-128,49)	-	-
Flutuação (%)	433,23 448,05 (352,86-543,23)	61,08 62,90 (51,92-73,88)	46,14* 50,09 (41,88-58,30)
f_u	0,26 0,27 (0,22-0,31)	0,42 0,42 (0,36-0,49)	0,38* 0,37 (0,36-0,39)
AUC⁰⁻¹²_{S-(+)/R-(-)}		4,26 4,38 (3,73-5,03)	

*Teste de Wilcoxon para dados pareados, $p < 0,05$ (R-(-)-MHD vs S-(+)-MHD).

C_{max}: concentração plasmática máxima; t_{max}: tempo para alcançar C_{max}; AUC⁰⁻¹²: área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo; C_{média}: Concentração plasmática média no estado de equilíbrio; MRT: Tempo médio de residência; t_{1/2}: meia-vida de eliminação; Kel: constante de velocidade de eliminação; V_{ss}/F: volume de distribuição aparente; CL_{ss}/F: *clearance* total aparente; f_u=fração livre.

4.3 Disposição cinética e metabolismo da OXC e dos enantiômeros do metabólito MHD no estado de equilíbrio em voluntários sadios na ocasião O+V

A disposição cinética e o metabolismo da OXC e dos enantiômeros do metabólito MHD foram avaliados, no estado de equilíbrio, em voluntários sadios (n=12) após 300mg/12h oral de OXC associada com verapamil 80mg/8h por via oral durante cinco dias. As curvas médias de concentração plasmática *versus* tempo estão apresentadas na Figura 2.2 e os parâmetros farmacocinéticos representados pela mediana, média e intervalo de confiança de 95% (IC 95%) estão apresentados na Tabela 2.3. Os parâmetros farmacocinéticos individuais estão apresentados nas Tabelas vi-viii (Apêndice V).

Tabela 2.3: Farmacocinética da OXC e dos enantiômeros do MHD em voluntários sadios tratados com 300 mg/12h de OXC associada com verapamil 80mg/8h (Ocasão O+V). Os valores estão expressos como mediana, média (IC 95%).

Parâmetro	OXC	R-(-)-MHD	S-(+)-MHD
C_{max} (µg/mL)	1,77 1,96 (1,55- 2,37)	3,24 2,98 (2,47- 3,49)	11,94* 11,60 (10,48- 12,72)
C_{max} livre(µg/mL)	0,53 0,60 (0,47-0,74)	1,20 1,10 (0,90-1,32)	4,14* 3,86 (3,42-4,30)
t_{max} (h)	0,75 0,92 (0,47-1,36)	2,75 2,75 (1,97-3,53)	2,75 2,96 (2,36- 3,56)
AUC⁰⁻¹² (µg.h/mL)	4,12 4,35 (3,56-5,14)	29,06 26,19 (22,04-30,33)	111,37* 108,35 (98,00-118,70)
C_{média} (µg/mL)	0,34 0,36 (0,29-0,43)	2,42 2,18 (1,84-2,53)	9,07* 8,83 (7,95-9,70)
MRT (h)	3,83 4,20 (3,56-4,85)	15,90 18,56 (14,15-22,97)	20,08* 21,11 (16,84-25,36)
t_{1/2} (h)	1,83 2,02 (1,60-2,44)	10,09 11,75 (8,52-14,98)	12,74* 13,50 (10,35-16,65)
Kel (h⁻¹)	0,38 0,37 (0,30-0,44)	0,07 0,07 (0,05-0,08)	0,06 0,06 (0,04- 0,07)
V_{ss}/F (L)	284,58 311,41 (240,65-382,16)	-	-
CL_{ss}/F (L/h)	72,78 74,86 (59,35-90,37)	-	-
Flutuação (%)	527,85 522,85 (467,90-577,79)	65,44 65,93 (60,84- 71,02)	46,35* 50,94 (46,35-55,53)
f_u	0,31 0,31 (0,26-0,37)	0,45 0,46 (0,42-0,49)	0,39* 0,40 (0,38-0,43)
AUC⁰⁻¹²_{S-(+)/R-(-)}		3,98 4,34 (3,68-5,00)	

*Teste de Wilcoxon para dados pareados, $p < 0,05$ (R-(-)-MHD vs S-(+)-MHD).

C_{max}: concentração plasmática máxima; t_{max}: tempo para alcançar C_{max}; AUC⁰⁻¹²: área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo; C_{média}: Concentração plasmática média no estado de equilíbrio; MRT: Tempo médio de residência; t_{1/2}: meia-vida de eliminação; Kel: constante de velocidade de eliminação; V_{ss}/F: volume de distribuição aparente; CL_{ss}/F: *clearance* total aparente; f_u=fração livre.

A Tabela 2.4 mostra a comparação entre as ocasiões O e O+V na disposição cinética da OXC e dos enantiômeros do metabólito MHD no estado de equilíbrio após 300mg/12h oral de OXC em voluntários sadios (n=12). Os parâmetros farmacocinéticos estão expressos como mediana.

Tabela 2.4: Disposição cinética da OXC e dos enantiômeros do MHD nas ocasiões O (OXC em monoterapia) e O+V (OXC + verapamil). Os valores estão expressos como mediana.

Parâmetro	OXC		R-(-)-MHD		S-(+)-MHD	
	Ocasião O	Ocasião O+V	Ocasião O	Ocasião O+V	Ocasião O	Ocasião O+V
C_{max} (µg/mL)	1,35	1,87	2,60	3,27 [■]	11,05*	11,94* [■]
C_{max} livre (µg/mL)	0,32	0,53 [■]	0,97	1,20	3,11	4,14 [■]
t_{max} (h)	1,00	0,75	3,25	2,75	3,50	2,75
AUC⁰⁻¹² (µg.h/mL)	3,98	4,47	25,36	29,06 [■]	97,19*	111,37* [■]
C_{média} (µg/mL)	0,33	0,37	2,11	2,42 [■]	8,10*	9,07* [■]
MRT (h)	4,71	3,83 [■]	19,01	17,67	20,16	23,33*
t_{1/2} (h)	2,45	1,83	12,45	10,66	12,24	15,22*
Kel (h⁻¹)	0,29	0,38	0,06	0,06	0,05	0,05
V_{ss}/F (L)	352,17	284,58	-	-	-	-
CL_{ss}/F (L/h)	75,58	72,78	-	-	-	-
Flutuação (%)	433,23	527,85	65,88	65,44	48,24*	49,61*
f_u	0,26	0,31	0,42	0,45	0,38*	0,39*

Teste de Wilcoxon para dados pareados, p< 0,05:

* (R-(-)-MHD vs S-(+)-MHD); [■] (Ocasião O vs ocasião O+V).

C_{max}: concentração plasmática máxima; t_{max}: tempo para alcançar C_{max}; AUC⁰⁻¹²: área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo; C_{média}: Concentração plasmática média no estado de equilíbrio; MRT: Tempo médio de residência; t_{1/2}: meia-vida de eliminação; Kel: constante de velocidade de eliminação; V_{ss}/F: volume de distribuição aparente; CL_{ss}/F: *clearance* total aparente no estado de equilíbrio; f_u=fração livre.

A Figura 2.4 mostra a presença de correlação entre a concentração total e livre da OXC, do R-(-)-MHD e do S-(+)-MHD em plasma com r^2 superior a 65%.

Figura 2.4: Correlação entre a concentração plasmática total e livre da OXC, do R-(-)-MHD e do S-(+)-MHD nas ocasiões O (tratamento com OXC em monoterapia) e O + V (tratamento de OXC+verapamil); r^2 = coeficiente de determinação.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo avalia a influência do verapamil na farmacocinética da OXC e dos enantiômeros do metabólito MHD em voluntários sadios tratados com 300 mg/12h de OXC por via oral.

Os voluntários sadios incluídos na investigação (n=12) foram tratados durante cinco dias com 300 mg/12h de OXC, uma ocasião denominada O, e em outra ocasião denominada O+V, os mesmos voluntários receberam durante cinco dias 300 mg/12h de OXC associada com 80 mg/8h de verapamil.

A OXC administrada em monoterapia (ocasião O) atingiu a concentração plasmática máxima (C_{max}) de 1,35 (0,99-2,10) $\mu\text{g/mL}$ como valor total e 0,32 (0,26-0,54) $\mu\text{g/mL}$ como livre em 1,0 (0,71-1,50) h (t_{max}) nos voluntários sadios investigados (Tabela 2.2). Valores de C_{max} de $2,13 \pm 0,94$ $\mu\text{g/mL}$ e t_{max} de 1,5 h (1,0-1,5) foram reportados por Nunes et al. (2012) para a OXC total na investigação de voluntários sadios tratados com 600 mg de OXC a cada 12 h. O AUC^{0-12} obtido foi de 3,98 (2,87-4,65) $\mu\text{g.h/mL}$, valor que está de acordo com o reportado por Nunes et al. (2012) de 7,44 $\mu\text{g.h/mL}$ em voluntários sadios tratados com 600 mg de OXC a cada 12h. A meia-vida de eliminação ($t_{1/2}$) da OXC obtida no presente estudo foi de 2,45 h (2,03-2,73) em voluntários sadios, enquanto Dickinson et al. (1989) reportaram valores de 1,70 h (1,32-2,53) em pacientes com epilepsia. Esses dados confirmam a rápida absorção da OXC após administração oral e sua quase imediata redução ao metabólito MHD.

O *clearance* total aparente (CL_{ss}/F) da OXC nos voluntários sadios investigados foi de 75,58 (62,77-128,49) L/h, enquanto Dickinson et al. (1989) relataram valor de 112,70 L/h em pacientes com epilepsia. O V_{ss}/F da OXC nos voluntários sadios investigados foi de 352,17 (277,95-688,16) L, enquanto Dickinson et al. (1989) reportaram em pacientes com epilepsia valores de V_{area}/F médio de 548,8 L (volume de distribuição calculado na fase em que a eliminação é preponderante), utilizando um modelo farmacocinético de um compartimento. O valor de flutuação encontrado no presente estudo de 433,23% ($(C_{max} - C_{min})/C_{médio} \cdot 100$) pode ser explicado em função do intervalo de dose de 12h relativamente prolongado em relação à meia-vida de eliminação da OXC (2,03-2,74 h).

A disposição cinética do MHD é enantiosseletiva nos voluntários sadios tratados com OXC em monoterapia, com observação de uma maior proporção para

o enantiômero S-(+)-MHD em relação ao R-(-)-MHD (Figura 2.3, Tabela 2.2). A razão $AUC^{0-12}_{S-(+)/R-(-)}$ é de 4,26 (3,73-5,03) (Tabela 2.2). Flesch et al. (2011) reportaram valores de AUC do S-(+)-MHD 3,8 vezes maiores que aqueles obtidos para o R-(-)-MHD em voluntários sadios tratados com dose única oral de 300 mg de OXC. Segundo esses autores, isso pode ocorrer devido a formação preferencial do enantiômero S-(+)-MHD na eliminação pré-sistêmica da OXC, ou seja, na reação de redução do grupo carbonila proquiral. Os valores de C_{max} dos enantiômeros R-(-)- e S-(+)-MHD como concentrações totais foram respectivamente, 2,60 (2,09-3,21) µg/mL e 11,05 (9,02 - 11,27) µg/mL, e como concentrações livres foram 0,97 (0,72-1,14) µg/mL e 3,11 (2,86-3,69) µg/mL, mostrando diferença significativa entre os enantiômeros (Tabela 2.2). Os valores de concentração plasmática média no estado de equilíbrio ($C_{média}$) e da flutuação também mostram diferenças entre os enantiômeros do MHD. Os valores da flutuação entre as concentrações mínima e máxima no estado de equilíbrio encontrados nesse estudo foram de 61,08 (51,92-73,88) % para o R-(-)-MHD e 46,14 (41,88-58,30) % para o S-(+)-MHD (Tabela 2.2), portanto similares aos reportados por Nunes et al. (2012) de 51,1±10,3% para o R-(-)-MHD e 39,0±6,4 % para o S-(+)-MHD. A meia-vida de eliminação do R-(-)-MHD foi 12,45 (9,66-13,71) h e do S-(+)-MHD foi 12,24 (9,53-14,75) h (Tabela 2.2). Flesch et al. (2011) reportaram valores de meia-vida de eliminação de 15,8 h para R-(-)-MHD e 11,2 h para o seu antípoda em voluntários sadios tratados com dose única oral de 300 mg de OXC.

A fração livre avaliada no t_{max} da OXC foi 0,26 (0,22-0,31) para a OXC, 0,42 (0,36-0,49) para o R-(-)-MHD e 0,38 (0,36-0,39) para o S-(+)-MHD (Tabela 2.2) nos voluntários sadios investigados tratados em monoterapia, mostrando enantiosseletividade na ligação às proteínas plasmáticas do MHD, com uma maior ligação do S-(+)-MHD às proteínas plasmáticas. No entanto, Fortuna et al. (2010) reportam, em estudos *in vitro*, valores em torno de 30% para ambos os enantiômeros, com ausência de enantiosseletividade na ligação dos enantiômeros do MHD às proteínas plasmáticas de humanos e ratos. Essas diferenças entre os resultados da presente investigação, um estudo clínico, e os achados do estudo *in vitro*, podem ser explicadas pelo fato de que nos estudos de ligação às proteínas *in vitro* os compostos são adicionados ao plasma fora do organismo, método que pode não necessariamente representar a situação *in vivo* (SRIKANTH et al., 2014). Além disso, o número amostral daquele estudo foi pequeno (n=3).

Na ocasião O+V, na qual houve associação da OXC (300 mg/12h) com o verapamil (80 mg/8h durante 5 dias), os valores de $C_{\max}$ como concentração total, AUC, $t_{\max}$, $C_{\text{média}}$, $t_{1/2}$, K_{el} , CL_{ss}/F , V_{ss}/F e flutuação da OXC não mostraram diferenças significativas em relação a ocasião O. As diferenças observadas com significância estatística entre as ocasiões O e O+V restringem-se aos parâmetros MRT, que foi de 4,71 vs 3,83 h, e à $C_{\max}$ como concentração livre, que foi de 0,32 vs 0,53 para as ocasiões O e O+V, respectivamente (Tabelas 2.3 e 2.4).

A enantiosseletividade na disposição cinética do metabólito MHD na ocasião O+V é similar a ocasião O. Os valores de $C_{\max}$ dos enantiômeros R-(-)- e S-(+)-MHD como concentrações totais foram respectivamente 3,24 (2,47-3,49) e 11,94 (10,48-12,72) $\mu\text{g/mL}$ e como concentrações livres foram 1,20 (0,90-1,32) e 4,14 (3,42-4,30) $\mu\text{g/mL}$. Os parâmetros apresentados na Tabela 2.3 mostram na ocasião O+V, de maneira similar à ocasião O, maiores valores de AUC^{0-12} (111,37 vs 29,06 $\mu\text{g.h/mL}$), de $C_{\max}$ como valores totais (11,94 vs 3,24 $\mu\text{g/mL}$) e livres (4,14 vs 1,20 $\mu\text{g/mL}$), de $C_{\text{média}}$ (9,07 vs 2,42 $\mu\text{g/mL}$), de MRT (20,08 vs 15,90 h), de $t_{1/2}$ (12,74 vs 10,09 h) e menores valores de flutuação (46,35 vs 65,44 h) para o enantiômero S-(+)-MHD quando comparado ao R-(-)-MHD. Os únicos parâmetros que apresentaram diferença com significância estatística entre as ocasiões O e O+V foi o AUC^{0-12} (25,36 vs 29,06 $\mu\text{g.h/mL}$, para as ocasiões O e O+V, respectivamente para o R-(-)-MHD e 97,19 vs 111,37 $\mu\text{g.h/mL}$, para as ocasiões O e O+V, respectivamente para o S-(+)-MHD) e $C_{\max}$ livre para o S-(+)-MHD (3,11 vs 4,14 $\mu\text{g.h/mL}$, para as ocasiões O e O+V, respectivamente) (Tabela 2.4). Nos voluntários tratados com verapamil, a inibição da atividade da P-gp expressa no intestino, representa o provável mecanismo para explicar o aumento na formação de ambos os enantiômeros do MHD como consequência do aumento da biodisponibilidade da OXC (LEMMA et al., 2006; WAHAJUDDIN et al., 2014).

A coadministração do verapamil não alterou a ligação da OXC e dos enantiômeros do MHD às proteínas plasmáticas. A fração livre avaliada no $t_{\max}$ da OXC foi 0,31 (0,26-0,37) para a OXC, 0,45 (0,42-0,49) para o R-(-)-MHD e 0,39 (0,38-0,43) para o S-(+)-MHD (Tabela 2.3) nos voluntários sadios investigados tratados com OXC combinada com verapamil, que da mesma forma que a ocasião do tratamento da OXC em monoterapia, mostrou enantiosseletividade na ligação às proteínas plasmáticas do MHD, com uma maior ligação do S-(+)-MHD às proteínas plasmáticas.

6 CONCLUSÕES

1- A disposição cinética do MHD é enantiosseletiva nos voluntários sadios investigados, tanto na ocasião de tratamento com a OXC em monoterapia quanto na ocasião de tratamento com a OXC associada ao verapamil, com observação de maior proporção para o enantiômero S-(+)-MHD em relação ao R-(-)-MHD, com razões de $AUC^{0-12}_{S-(+)/R-(-)}$ de aproximadamente 4;

2- O verapamil diminui o MRT e aumentou a C_{max} como concentração livre da OXC e aumentou a C_{max} , o AUC e a $C_{média}$ de ambos os enantiômeros do MHD. O aumento dos valores de AUC de ambos os enantiômeros do MHD após a administração do verapamil infere a inibição da P-gp intestinal.

Capítulo 3

Influência do verapamil na farmacocinética populacional e na perfusão cerebral da oxcarbazepina e dos enantiômeros do metabólito 10-hidroxicarbazepina em voluntários sadios

1 INTRODUÇÃO

Apesar da introdução de cerca de 15 novos fármacos antiepiléticos nos últimos 20 anos, cerca de 30% dos pacientes com epilepsia ainda manifestam crises refratárias ao tratamento (PERUCCA & MULA, 2013).

A OXC e os enantiômeros do seu metabólito ativo MHD agem principalmente no bloqueio dos canais de sódio sensíveis à voltagem, resultando na estabilização das membranas neuronais hiperexcitadas, inibição da descarga neuronal repetitiva e diminuição dos impulsos sinápticos de propagação. Além disso, aumentam a condutância ao potássio, modulam os canais de cálcio ativados por alta voltagem e inibem a neurotransmissão glutamatérgica (PERUCCA & MULA, 2013; SCHMIDT & SACHDEOT, 2000). Vale ressaltar que os enantiômeros S-(+)- e R-(-)-MHD mostram efeitos anticonvulsivantes semelhantes *in vitro* e em modelos animais (SCHMUTZ et al., 1994).

A expressão da P-gp na barreira hematoencefálica limita a entrada de fármacos alvo para o SNC, reduzindo assim os potenciais efeitos tóxicos de fármacos utilizados no tratamento de distúrbios neurológicos e psiquiátricos. Entretanto, foi observado que a expressão da P-gp está aumentada nos tecidos cerebrais epileptogênicos de pacientes com epilepsia parcial farmacorresistentes, o que pode contribuir para o mecanismo da farmacorresistência no tratamento da doença por causar efluxo excessivo dos fármacos antiepiléticos através da barreira hematoencefálica (LÖCHER et al., 2011). Feldmann et al. (2013) reportam que pacientes farmacorresistentes exibem maior atividade basal da P-gp associada com a maior frequência das crises na massa cinzenta cerebral e no hipocampo. Esses resultados apoiam a hipótese de que existe uma associação entre a hiperatividade da P-gp em algumas regiões do cérebro e a farmacorresistência na epilepsia do lobo temporal. Estudos experimentais também evidenciam que as convulsões nos ratos aumentam os níveis de mRNA da MDR1 no hipocampo e reduzem as razões de concentração cérebro/plasma de fenitoína. Aumentos significativos nas razões de concentração cérebro/plasma de fenitoína e carbamazepina são observados em camundongos transgênicos com deleção do gene *mdr1a/b* (MARCHI et al., 2005; RIZZI et al., 2002).

Considerando-se o possível envolvimento do aumento da atividade da P-gp em mecanismos de farmacorresistência ao tratamento da epilepsia, a inibição da

atividade da P-gp com bloqueadores seletivos pode tornar-se uma estratégia viável para aumentar a biodisponibilidade e facilitar a distribuição de fármacos no SNC. O verapamil inibe o transporte de fármacos mediado pela P-gp no cérebro (CLINCKERS et al., 2008). Além disso, o verapamil potencializa a atividade anticonvulsivante da OXC e provoca um aumento significativo dos níveis de MHD no cérebro sem alterar os perfis farmacocinéticos no plasma após crises límbicas induzidas pela pilocarpina em ratos (CLINCKERS et al., 2005; CLINCKERS et al., 2008).

O presente estudo visa abrir uma nova perspectiva no sentido de avaliar a farmacocinética no plasma e buscar correlações com a perfusão cerebral como uma medida indireta da distribuição do fármaco no SNC. Ou seja, verificar se a monitorização terapêutica de fármacos no plasma representa sua distribuição para o cérebro. Ressalta-se, no entanto, que limitações técnicas e éticas dificultam os estudos clínicos da distribuição de fármacos no cérebro devido à amostragem do líquido cefalorraquidiano não ser possível na grande maioria dos casos. Portanto, a presente proposta consiste no estudo funcional da perfusão cerebral através da tomografia por emissão de fóton único (SPECT-*Single-photon emission computed tomography*) empregando a ^{99m}Tc -etilenodicisteína (^{99m}Tc -ECD) como uma medida da distribuição e do efeito farmacodinâmico da OXC e do MHD no cérebro. Trabalhos anteriores relatam o uso do SPECT para avaliar o efeito da lamotrigina no fluxo sanguíneo cerebral de pacientes com epilepsia idiopática generalizada e sugerem que o fármaco diminui a perfusão nas áreas cortico-tálamo-límbico, córtex órbito-frontal e tronco cerebral (JOO et al., 2006). O SPECT também permitiu sugerir que as propriedades ansiolíticas do canabidiol em voluntários saudáveis são mediadas pela ação nas áreas límbica e paralímbica do cérebro (CRIPPA et al., 2004). Além disso, o SPECT está sendo utilizado para avaliação da função e expressão dos transportadores, incluindo a P-gp (MAIRINGER et al., 2011; KUSUHARA, 2013).

O protocolo desenvolvido no presente estudo será utilizado para posterior investigação de pacientes epiléticos submetidos ao tratamento com OXC e permitir a avaliação abrangente da relação entre a farmacocinética, o sinal do SPECT cerebral e a resposta clínica.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a influência do verapamil na farmacocinética populacional e na perfusão cerebral da OXC e dos enantiômeros do metabólito MHD em voluntários sadios.

2.2 Específicos

- Avaliar a farmacocinética populacional da OXC e seu metabólito MHD, na presença e ausência de verapamil;
- Avaliar a farmacodinâmica da OXC e seu metabólito MHD, na presença e ausência de verapamil, determinada por alterações no fluxo sanguíneo cerebral;
- Avaliar a correlação entre a farmacocinética populacional da OXC e dos enantiômeros do seu metabólito MHD com os sinais dos SPECTs na presença e ausência de verapamil.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Protocolo clínico

O protocolo clínico e o cálculo do número de voluntários sadios foi realizado conforme descrito no capítulo 2, mas com a inclusão da realização dos SPECTs cerebrais em três ocasiões. Na ocasião basal, os voluntários sadios incluídos no estudo (n=12) receberam uma dose intravenosa de ^{99m}Tc -ECD e foram submetidos a um SPECT cerebral basal (SPECT 1) antes do início do tratamento com a OXC. Na ocasião O (tratamento com OXC em monoterapia), os voluntários sadios receberam doses diárias de 300 mg/12h de OXC durante cinco dias. No quinto dia foram realizadas amostras seriadas de sangue nos tempos 0 (pré-dose), 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 5, 6, 8, 10 e 12 horas após a administração da OXC, enquanto o SPECT 2 foi realizado nos tempos 4 (n=5), 6 (n=4) ou 12h (n=3). Na ocasião O+V (tratamento com OXC + verapamil), os voluntários sadios receberam doses diárias de 300 mg/12h de OXC em combinação com 80 mg/8h de verapamil durante cinco dias. No quinto dia foram realizadas amostras seriadas de sangue nos tempos 0 (pré-dose), 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 5, 6, 8, 10 e 12 horas após a administração da OXC, enquanto o SPECT 3 foi realizado nos tempos 4 (n=5), 6 (n=4) ou 12h (n=3). A Tabela 3.1 resume a visão geral dos procedimentos realizados no protocolo clínico.

Tabela 3.1: Informações sobre a duração do tratamento, a dose dos fármacos, número de amostras e tempo de realização dos SPECTs para os 12 voluntários sadios investigados.

Ocasão	Duração do tratamento	Dose	Nº de amostras por voluntário	SPECT realizado por voluntário
Basal	-	-	-	1
O	5 dias	OXC 300mg/12h	16	1 (4h após OXC;n=5 6h após OXC;n=4 12h após OXC;n=3)
O+V	5 dias	OXC 300mg/12h + VER 80mg/8h	16	1 (4h após OXC;n=5 6h após OXC;n=4 12h após OXC;n=3)

Ocasão O (tratamento com OXC em monoterapia); Ocasão O+V (tratamento com OXC + verapamil).

3.2 Aquisição dos SPECTs cerebrais

Os SPECTs cerebrais foram realizados pela injeção intravenosa do radiofármaco de perfusão cerebral ^{99m}Tc -ECD (WICHERT-ANA et al., 2001; WICHERT-ANA et al., 2008a; WICHERT-ANA et al., 2008b). Os sujeitos da pesquisa (n=12) foram colocados confortavelmente em repouso, em silêncio, com os olhos abertos e em ambiente de pouca luz. As imagens de SPECT cerebral utilizadas nestes experimentos foram adquiridas em uma gama-câmara SOPHA (modelo Vision DST, SMV América, Twinsburg, Ohio), composta por duas cabeças detectoras formadas por cristais de iodeto de sódio, equipada com colimador de baixa energia e alta resolução, com fotopico para o isótopo ^{99m}Tc centrado em sua energia característica de 140keV e janela de aceitação de 20%. Cada imagem foi adquirida a partir de 64 projeções (32 por detector) em uma matriz de 128x128, com uma rotação de 180° de cada detector. Foi utilizada uma magnificação (*zoom*) de 2x e um tempo de aquisição de 30 minutos totalizando aproximadamente 100.000 contagens por projeção.

As imagens foram reconstruídas em uma Workstation Philips EBW (Philips Healthcare, Cleveland, Ohio, EUA) através do método denominado OSEM (Ordered-subset Expectation Maximization) implementado através de um algoritmo iterativo de reconstrução. Foram utilizados 8 subgrupos e 3 iterações para a reconstrução das imagens. Todas as imagens foram corrigidas para os efeitos de atenuação dos fótons de raio gama com a matéria através do método de Chang de primeira ordem, no qual é sugerido utilizar um coeficiente de atenuação linear de $0,11 \text{ cm}^{-1}$ e o meio corrigido é tratado como um meio homogêneo. Todas as imagens foram amaciadas a partir de um filtro Butterworth de 9ª ordem e frequência de corte 0,14 ciclos/mm (frequência de Nyquist).

Ao fim da etapa de reconstrução, as imagens foram salvas nos formatos DICOM 3.0 e Nifti (sucessor do formato Analyze), utilizando para esta tarefa o programa para visualização de imagens médicas MRIcro (desenvolvido por Chris Rorden, Neurophychology Lab, Columbia SC, USA). O SPM (*Statistical Parametric Mapping*) é uma ferramenta utilizada atualmente em análises de inferência estatística. Para que a extração dos dados do conjunto de imagens de SPECT cerebral fosse realizada com sucesso, foram realizadas a transformação espacial e a normalização do sinal (Marsbar) como etapas de processamento.

De modo a garantir que todas as imagens analisadas ocupassem a mesma posição espacial, baseada em um espaço anatômico padrão conhecido, algumas etapas de processamentos foram indispensáveis: reorientação, realinhamento, normalização espacial, filtragem por máscara binária e frequência.

Na etapa de reorientação, todas as imagens tiveram as suas coordenadas de origem no Espaço Euclidiano (0,0,0) realocadas para o mesmo ponto de referência, a Comensura Anterior. Isto garante que todas as imagens passaram a ter o mesmo ponto de origem (ou próximo a ele, devido a problemas de localização anatômica).

A etapa de realinhamento foi realizada entre as imagens do mesmo voluntário sadio produzidas nas três diferentes ocasiões para evitar artefatos de movimento que pudessem implicar erros sistemáticos na etapa de análise das imagens. As imagens foram realinhadas utilizando parâmetros de transformação (3 translacionais e 3 rotacionais).

Na etapa de normalização espacial foi aplicada uma transformação de corpo rígido (*affine*) com a utilização de 12 parâmetros definidos para deformar cada uma das imagens inseridas. Cada transformação foi realizada de forma individual,

baseando-se em um mesmo espaço padrão anatômico (MNI - *Montreal Neurological Institute*) através de um modelo de SPECT cerebral fornecido pelo próprio SPM. As novas imagens foram normalizadas utilizando uma caixa delimitada de 2,0 x 2,0 x 2,0 mm³ e uma interpolação tri-linear.

Para eliminar qualquer vestígio de radiação espalhada fora da calota craniana foi aplicada uma máscara binária, com as mesmas dimensões da caixa delimitada utilizada, sobre todas as imagens.

A etapa final neste processamento de 2º nível foi o amaciamento de todas as imagens através de um filtro kernel Gaussiano com FWHM (*full-width at half maximum*) 12x12x12 mm de forma a eliminar qualquer sinal de alta frequência remanescente.

O pré-processamento realizado garante que todas as imagens processadas apresentarão características de localizações espaciais similares, isto é, cada *voxel* analisado corresponde ao mesmo *voxel* semelhantemente localizado em todas as imagens. Para a extração dos dados de cada uma das imagens foi utilizada uma caixa de ferramentas incorporada ao programa SPM denominada Marsbar. Juntamente ao Marsbar foi possível normalizar a intensidade do sinal de cada uma das imagens para uma escala proporcional a média global de 80% de todo o sinal presente na imagem (limite de 0,8) e ponderado por um fator fisiológico de 50 mL/min/100g (fluxo sanguíneo em 100g de tecido cerebral a cada minuto).

Uma vez que não foi indicada previamente na literatura nenhuma região de ativação passível de investigação, foi necessário extrair o sinal cortical médio de todas as possíveis regiões de interesse para cada imagem. Para isso, foi utilizado um “AAL Atlas” no qual possibilitou determinar todas estas regiões anatomicamente localizadas. Foi possível extrair o sinal médio de cada uma das 116 regiões analisadas pelo Marsbar e assim construir as tabelas de contagens médias (de cada região) para cada um dos voluntários sadios investigados e para cada uma das ocasiões trabalhadas (basal, OXC e OXC+VER). O sinal em questão pode ser interpretado como o número corrigido de contagens por *voxel* que puderam ser detectadas.

3.3 Métodos de análise da OXC e dos enantiômeros do MHD total e livre em plasma

As análises da OXC e dos enantiômeros do metabólito MHD total e livre foram realizadas por LC-MS/MS, conforme descrito no Capítulo 1.

3.4 Farmacocinética populacional

A farmacocinética populacional da OXC e dos enantiômeros do MHD foi realizada na Divisão de Farmacologia, LACDR (Leiden Academic Centre for Drug Research) na Universidade de Leiden, Países Baixos. Foi utilizado o método de efeitos mistos não lineares empregando o NONMEM (*Nonlinear Mixed Effect Modelling*) versão 7.2 (ICON Development Solutions, Ellicott City, MD, USA) utilizando o método de estimação condicional de primeira ordem com a opção de interação (FOCE-I; *first-order conditional estimation with the interaction option*). A interface entre o motor de minimização utilizado pelo NONMEM e o processamento dos dados foi realizada com o auxílio do programa PsN (*Perl-speaks-NONMEM*). O programa Pirana versão 2.7.1 foi utilizado no processo de construção do modelo e o R versão 3.0.2 foi utilizado para a manipulação do conjunto de dados, análise estatística e plotagem de diagnóstico.

3.4.1 Critérios de discriminação do modelo

Os critérios de construção do modelo foram: (i) redução no valor da função objetiva (OFV- *objective function value*), referido como a relação de log-probabilidade. Esta proporção é assumida ser qui-quadrado distribuída, o que significa que uma redução na OFV de 3,84 é considerada significativa ($P < 0,05$) (SHEINER & LUDDEN, 1992); (ii) minimização de sucesso; (iii) erro padrão das estimativas; (iv) número de dígitos significativos; (v) término da etapa de covariância; (vi) correlação entre os parâmetros do modelo; (vii) os gradientes aceitáveis na última iteração. O erro padrão dos parâmetros estimados foram aproximados usando a matriz de covariância assintótica.

3.4.2 Desenvolvimento do modelo farmacocinético sequencial

O modelo farmacocinético (PK) da OXC e dos enantiômeros do MHD após a administração oral do fármaco em voluntários sadios foi desenvolvido de forma sequencial (ZHANG et al., 2003) em duas etapas. Primeiramente, o modelo da OXC foi construído e os parâmetros estimados foram utilizados para conduzir o modelo dos enantiômeros do MHD na segunda etapa da modelagem.

Para descrever a farmacocinética da OXC foram testados modelos abertos de um, dois e três compartimentos com processo de eliminação de primeira ordem. A absorção foi inicialmente modelada como de primeira ordem, no entanto, observou-se um atraso nesse processo. Assim, foram testados o modelo com absorção com *lag time* e o modelo do compartimento de trânsito descrito na Equação 1 (SAVIC et al., 2007).

$$k_{tr} = (n+1)/MTT \quad (1)$$

Na Equação 1, k_{tr} é a constante de velocidade de transferência de n^{th} -1 compartimento para o compartimento n^{th} com n sendo o número de compartimentos de trânsito. MTT é a média do tempo de trânsito, o qual representa o tempo médio gasto por moléculas de fármacos que passam do compartimento do depósito para o compartimento central (SAVIC et al., 2007).

A variabilidade inter-individual (IIV - *inter-individual variability*) dos parâmetros farmacocinéticos foi estimada utilizando um modelo exponencial expresso como:

$$\theta_i = \theta_p * \exp(\eta_i) \quad (2)$$

na qual θ_i representa o valor do parâmetro do indivíduo i^{th} , θ_p o valor típico do parâmetro na população e η_i a variabilidade entre os indivíduos, que se supõe seguir uma distribuição normal com média zero e variância ω^2 .

A variabilidade inter-ocasiões (IOV - *inter-occasion variability*) foi testada na absorção, no V_{ss}/F e no *clearance* (CL_{ss}/F) e foi incluída como segue:

$$\theta_i = \theta_p * \exp(\eta_i + \kappa_o) \quad (3)$$

na qual κ_o representa a ocasião o .

A descrição da variabilidade residual foi testada como um modelo de erro proporcional, aditivo e proporcional mais aditivo, tal como descrito nas equações 4, 5 e 6, respectivamente:

$$C_{ij,obs} = C_{ij,pred} * (1 + \varepsilon_{ij,prop}) \quad (4)$$

$$C_{ij,obs} = C_{ij,pred} + \varepsilon_{ij,add} \quad (5)$$

$$C_{ij,obs} = C_{ij,pred} * (1 + \varepsilon_{ij,prop}) + \varepsilon_{ij,add} \quad (6)$$

nas quais $C_{ij,obs}$ e $C_{ij,pred}$ são as concentrações observadas e preditas para o indivíduo i^{th} e para a observação j^{th} ; $\varepsilon_{ij,add}$ e $\varepsilon_{ij,prop}$ são variáveis aleatórias com média zero variância σ^2 .

O verapamil foi tratado como uma covariável discreta e foi testado em parâmetros farmacocinéticos relevantes como a absorção, a biodisponibilidade (F), o CL_{ss}/F e o V_{ss}/F . O aumento da absorção da OXC e MHD após a administração de verapamil foi assumido como sendo devido à diminuição do transporte do fármaco para o lúmen intestinal e para fora do cérebro (CLINCKERS et al., 2005; CLINCKERS et al., 2008; LEMMA et al., 2006).

O modelo de covariável não foi realizado passo a passo para as covariáveis demográficas relevantes (idade, peso, sexo, etc.) devido ao pequeno tamanho da amostra do conjunto de dados analisados ($n=12$). Em vez disso, foi utilizada uma escala alométrica determinada a priori para CL_{ss}/F e V_{ss}/F com base no peso corporal (BW - *bodyweight*), utilizando a seguinte relação:

$$\theta_i = \theta_p * \exp(BW_i/68)^m \quad (7)$$

no qual θ_i é o valor do parâmetro do assunto i^{th} com peso corporal BW_i , θ_p o valor típico do parâmetro na população com um peso corporal de 68 kg, a BW_i é o peso do indivíduo i^{th} , m é o valor do expoente fixo em 0,75 para CL_{ss}/F e em 1 para o V_{ss}/F (ANDERSON & HOLFORD, 2008).

Os parâmetros estimados a partir do modelo farmacocinético da OXC foram fixados para o posterior desenvolvimento do modelo do metabólito. Modelos de um e dois compartimentos foram testados para descrever a farmacocinética de cada enantiômero do MHD (R-(-)-MHD e S-(+)-MHD). Para estimar o *clearance* de formação e o volume de distribuição do MHD, foi utilizado o valor da fração do MHD urinário e os seus O-glucuronídeos de 79% como relatado por Schütz et al. (1986) em dois voluntários sadios após a administração oral de uma dose de 400 mg de OXC marcada com carbono 14.

A variabilidade inter-individual e a variabilidade residual dos enantiômeros do MHD foram implementadas e avaliadas conforme descrito para a OXC. O modelo de covariável foi analisado utilizando uma escala alométrica determinada a priori para CL_{ss}/F e V_{ss}/F com base no peso corporal, como foi executado no modelo de covariável para a OXC.

3.4.3 Avaliação do modelo

A avaliação do modelo foi realizada com base em métodos gráficos e numéricos, incluindo o gráfico da qualidade do ajuste (*goodness-of-fit*), dos dados observados (*dependent variable* - DV) *versus* previsões baseadas na estimativa populacional do modelo (*population prediction* - PRED), do DV *versus* previsões baseadas nas estimativas individuais do modelo (*individual prediction* - IPRED), dos resíduos ponderados condicionais (CWRES - *conditional weighted residuals*) *versus* tempo, dos CWRES *versus* PRED.

Os gráficos espelhos (*mirror plots*), que tem como finalidade avaliar o grau de similaridade entre os dados originais e os dados simulados a partir do modelo final, também foram realizados para avaliação do modelo. Foram realizadas 10 simulações no NONMEM e, de forma aleatória, foram escolhidas 3 réplicas para serem comparadas com os dados originais e avaliar se a estrutura da matriz de variância-covariância nas simulações seguiam os padrões dos dados originais para a população e individual.

A verificação visual preditiva (VPC - *visual predictive check*) foi executada usando simulações de 1000 réplicas do estudo original para confirmar a adequação do modelo, quanto a tendência e variabilidade, e o seu desempenho preditivo. A mediana e os percentis 5 e 95 dos dados simulados foram plotados contra o tempo, com estratificação.

Para avaliar o modelo também foi realizada a análise gráfica de verificação visual preditiva posterior (PPC - *posterior predictive check*) utilizando a AUC como medida de desempenho do modelo. Foram executadas 1000 simulações para cada observação, ou seja, para cada concentração plasmática real da OXC e dos enantiômeros do MHD. Em seguida, os valores de AUC foram calculados e a distribuição nas diferentes ocasiões (OXC ou OXC+VER) foram observadas para avaliar se o modelo descreveria de forma adequada os dados reais observados. A distribuição dos valores de AUC preditos a partir do modelo foi apresentada como mediana e comparada com a mediana dos valores de AUC dos voluntários sadios reais.

O poder preditivo do modelo foi avaliado através do cálculo da distribuição dos erros de predição normalizada (NPDE - *normalised prediction distribution errors*). Os gráficos de NPDE *versus* DV e NPDE *versus* tempo foram utilizados para

verificar a presença de distorções ou tendências nos resultados. A análise do NPDE produz informação sobre o grau de precisão do modelo e prediz o valor médio das observações e a variabilidade dentro deles.

O método de *bootstrap* foi realizado para avaliar a exatidão (confiabilidade) e a precisão (reprodutibilidade) dos parâmetros finais do modelo. Foram geradas 1000 planilhas por re-amostragem com reposição a partir da planilha dos dados originais de modo a replicar o número total de voluntários sadios incluídos na análise inicial. A mediana da estimativa dos parâmetros das 1000 análises foi comparada com a estimativa do modelo final a partir da planilha original. Os coeficientes de variação e os intervalos de confiança de 90% obtidos foram comparados com aqueles gerados pelo NONMEM.

A matriz de correlação para efeitos fixos *versus* efeitos aleatórios e a matriz de correlação entre os parâmetros e as covariáveis foram avaliadas, sendo que não poderiam ultrapassar o valor 0,9, o que indicaria problemas de identificação dos parâmetros. A comparação de modelos hierárquicos e definição do modelo final foi baseada no teste da razão de verossimilhança, ou seja, na alteração significativa da OFV.

3.5 Predição da concentração cerebral dos enantiômeros do MHD

A exposição cerebral aos enantiômeros do MHD foi predita através de um modelo híbrido desenvolvido utilizando as informações atuais dos voluntários sadios incluídos no presente estudo e dados históricos de ratos relatados em trabalho anterior do grupo (CLINCKERS et al., 2008). Os parâmetros farmacocinéticos preditos pela concentração livre dos enantiômeros do MHD no plasma dos voluntários sadios investigados, o volume de distribuição do cérebro de ratos e as constantes de velocidade de transferência entre o compartimento central e do cérebro de ratos foram utilizadas para simular a concentração cerebral dos enantiômeros do MHD.

3.6 Correlação entre a concentração cerebral dos enantiômeros do MHD e a alteração do fluxo sanguíneo cerebral

A avaliação da correlação entre a concentração cerebral dos enantiômeros do MHD e a alteração do fluxo sanguíneo cerebral foi realizada através de um teste de correlação entre a AUC^{0-12} dos enantiômeros do MHD (concentrações cerebrais simuladas) e a mudança relativa do fluxo sanguíneo cerebral (dados dos SPECTs cerebrais) nas três ocasiões do estudo (basal, OXC e OXC+VER).

4. RESULTADOS

4.1 Protocolo clínico

No total, 12 voluntários adultos saudáveis (8 mulheres e 4 homens), com idade entre 22 e 41 anos de idade, e peso variando entre 48,7-95,15 kg, não-obesos, não-fumantes, com funções cardíacas, hepáticas e renais dentro dos limites normais foram incluídos neste estudo (Tabela 2.1, Capítulo 2). Um total de 377 amostras de plasma foi analisado nas ocasiões O e O+V, com um número médio de 32 amostras por indivíduo. Todas as concentrações das amostras analisadas estavam acima do limite de quantificação dos métodos analíticos desenvolvidos e validados (Capítulo 1). Cada voluntário foi submetido a três SPECTs, sendo que os SPECTs 2 e 3 foram realizados em três diferentes tempos: 4 (n=5), 6 (n=4) ou 12h (n=3) após a administração da última dose de OXC.

4.2 Avaliação do fluxo sanguíneo cerebral

Para avaliar as áreas cerebrais com aumento (hiperperfusão) ou diminuição (hipoperfusão) do fluxo sanguíneo cerebral, as imagens médias do SPECT 2 (ocasião O - OXC em monoterapia) e SPECT 3 (ocasião O+V - oxcarbazepina + verapamil) dos voluntários saudáveis foram comparadas com a média quantitativa do fluxo sanguíneo cerebral do SPECT 1 (basal) (Figura 3.1).

Figura 3.1: Imagens cerebrais de um voluntário sadio geradas por SPECTs realizados nas três ocasiões de estudo: ausência do fármaco, ocasião O (tratamento com oxcarbazepina em monoterapia) e ocasião O+V (tratamento com oxcarbazepina + verapamil). São apresentadas as imagens dos cortes axial, coronal e sagital. D=direita; E=esquerda; A=anterior; P=posterior. Na escala, de azul para amarelo representa o aumento fluxo sanguíneo cerebral.

4.3 Desenvolvimento do modelo de farmacocinética populacional

O modelo de farmacocinética populacional da OXC e dos enantiômeros do MHD após a administração oral de OXC em voluntários sadios foi desenvolvido de forma sequencial (ZHANG et al., 2003). Na primeira etapa, o modelo da OXC foi construído e os parâmetros estimados foram utilizados para conduzir o modelo dos enantiômeros do MHD na segunda etapa. Um diagrama descrevendo o modelo PK para ambos OXC e metabólito está representado na Figura 3.2 e o resumo dos

principais passos da construção do modelo da OXC e dos enantiômeros do MHD está descrito na Tabela 3.2.

Figura 3.2: Visão esquemática do modelo da farmacocinética populacional para a OXC e para os enantiômeros do MHD. V=volume de distribuição; K=constante de velocidade; CL=clearance; F_1 =biodisponibilidade; K_{tr} =constante de velocidade de transferência; Q=clearance intercompartimental.

Tabela 3.2: Resumo esquemático das principais etapas da construção do modelo da farmacocinética populacional da OXC e dos enantiômeros do MHD.

Modelo	Efeito fixo	Absorção	IIV	Efeito de covariável	OFV	ΔOFV
OXC						
1	2	1ª ordem	CL ₅ , V ₅	-	-1007.83	-
2	2	1ª ordem	CL ₅ , V ₅ , F ₁ , MTT	-	-1029.86	-22.03
3	2	1ª ordem + LAG 2	CL ₅ , V ₅ , F ₁ , MTT	-	-1130.28	-122.44
4	2	Trânsito 3* + LAG 2	CL ₅ , V ₅ , F ₁ , MTT	-	-1176.21	-168.38
5	2	Trânsito 3* + LAG 2	CL ₅ , V ₅ , F ₁ , MTT	VER em F1	-1189.98	-182.15
6	2	Trânsito 3* + LAG 2	CL ₅ , V ₅ , F ₁ , MTT	VER em V5	-1184.26	-176.43
7	2	Trânsito 3* + LAG 2	CL ₅ , V ₅ , F ₁ , MTT	VER em Cl5	-184.95	-177.12
8	2	Trânsito 3* + LAG 2	CL ₅ , V ₅ , F ₁ , MTT+ IOV em MTT	VER em F1	-1228.07	-220.87
9	2	Trânsito 3* + LAG 2	CL ₅ , V ₅ , F ₁ , MTT+ IOV em MTT	VER em F1 + EA em CL ₅ , V ₅ , V ₆	-1229.78	-1.70
MHD						
1	1 (R-(-)-MHD) +1 (S-(+)-MHD)	-	-	-	-1260.60	-
2	1 (R-(-)-MHD) +1 (S-(+)-MHD)	-	V ₇	-	-1266.58	-5.98
3	1 (R-(-)-MHD) +1 (S-(+)-MHD)	-	V ₈	-	-1261.86	-1.27
4	1 (R-(-)-MHD) +1 (S-(+)-MHD)	-	V ₇ , V ₈	-	-1278.85	-18.25
5	1 (R-(-)-MHD) +1 (S-(+)-MHD)	-	V ₇ , V ₈	EA em CL ₇ , CL ₈ , V ₇ , V ₈	-1277.96	-17.36
6	1 (R-(-)-MHD) +1 (S-(+)-MHD)	-	V ₇ , V ₈	EA em CL ₇ , CL ₈ , V ₇ , V ₈	-1274.87	-14.27

* Número de compartimentos de trânsito otimizado; IIV=variabilidade inter-individual; OFV=valor da função objetiva; EA=escala alométrica.

O modelo que melhor descreveu a farmacocinética da OXC foi um modelo de dois compartimentos e eliminação de primeira ordem (Figura 3.2). A absorção foi melhor descrita por um modelo de três compartimentos de trânsito. Foi necessário colocar um *lag time* para melhor descrever a absorção em dois indivíduos, um na ocasião com OXC e outra na ocasião com OXC + VER, nos quais foi observado um maior tempo na absorção do fármaco.

A variabilidade interindividual foi melhor descrita por um modelo exponencial e foi estimada para MTT, F, V_{ss}/F central e CL_{ss}/F . A variabilidade inter-ocasião em MTT foi acoplada à variabilidade interindividual por um modelo aditivo. A variabilidade residual foi melhor descrita por um modelo proporcional.

O modelo de um compartimento melhor descreveu a farmacocinética do R-(-)-MHD e do S-(+)-MHD (Figura 3.2). Os valores de CL_{ss}/F de ambos os enantiômeros do MHD mostraram-se altamente correlacionados e, portanto, foram estimados como o mesmo valor (Tabela 3.2).

A variabilidade interindividual foi melhor descrita por um modelo exponencial e foi estimada para o V_{ss}/F , considerando a mesma variabilidade para os volumes de ambos os enantiômeros. A variabilidade residual foi melhor descrita por um modelo proporcional, também com o mesmo erro para ambos os enantiômeros. Os parâmetros CL_{ss}/F e V_{ss}/F mostraram relação com o peso dos voluntários (Tabela 3.2).

As curvas de concentração plasmática vs tempo da OXC, do R-(-)-MHD e do S-(+)-MHD estão apresentadas na Figura 2.3 (Capítulo 2) e os parâmetros estimados pelo modelo final estão apresentados na Tabela 3.3. A coadministração do verapamil provocou um aumento de 12% na biodisponibilidade da OXC. O uso da escala alométrica com base no peso para o CL_{ss}/F , o V_{ss}/F central e o V_{ss}/F periférico melhor descreveu os dados. Baseado nos resultados do *bootstrap*, é possível observar que os parâmetros estimados foram robustos. A estimativa dos parâmetros CL_{ss}/F , V_{ss}/F , Q e F foram similares com as estimativas do modelo e com baixos intervalos de confiança (IC), mostrando que o modelo apresenta estimativas exatas e estáveis. Os altos valores de EPR (erro padrão relativo) e IC nos resultados dos testes de IIV e IOV devem-se ao pequeno número amostral (n=12).

Tabela 3.3: Estimativas dos parâmetros de farmacocinética populacional para a OXC e enantiômeros do MHD.

Parâmetro	Estimativa (IC 95%)	EPR (%)	Bootstrap (IC 95%)
MTT (h)	0,51 (0,39-0,63)	11,7	0,51 (0,39-0,63)
CL _{ss} /F OXC (L h ⁻¹)	84,80 (69,50-100,27)	7,4	84,90 (69,53-100,27)
CL _{ss} /F R-(-)- e S-(+)-MHD (L h ⁻¹)	2,01 (1,87-2,15)	3,6	2,01 (1,77-2,25)
Q OXC (L h ⁻¹)	55,80 (37,26-74,342)	17	55,80 (37,26-74,34)
V _{ss} /F OXC central (L)	131,00 (96,90-165,10)	11,5	131,00 (96,90-165,10)
V _{ss} /F OXC periférico (L)	456,00 (230,60-681,40)	21,9	456,00 (230,60-681,40)
V _{ss} /F R-(-)-MHD (L)	23,60 (14,43-32,77)	19,8	23,59 (21,25-26,02)
V _{ss} /F S-(+)-MHD (L)	31,70 (22,45-40,95)	14,9	31,70 (27,11-36,29)
F ₁ após co-administração do verapamil (%)	12,00 (9,63-12,77)	7,1	12,00 (9,63-12,77)
ALAG1 s10 (µg/mL)	1,49 (1,39-1,46)	1,3	1,43 (1,39-1,46)
ALAG1 s09 (µg/mL)	1,69 (1,65-1,75)	1,8	1,70 (1,65-1,75)
Variabilidade inter-individual (%)			
MTT	17,1	269,2	17,1 (-27,7-31,8)
CL _{ss} /F OXC	18,1	150,8	18,1 (-51,6-59,8)
V _{ss} /F OXC central	23,5	117,6	23,5 (-5,1-43,0)
V _{ss} /F R-(-)- e S-(+)-MHD	22,2	60,9	22,2(4,1-46,5)
F ₁	30	103,5	30,0 (-57,0-64,3)
Variabilidade inter-ocasião (%)			
MTT	44,7	43,4	44,7 (-27,5-92,8)
Erro residual proporcional			
OXC	0,097	10,5	0,097 (0,180-0,220)
R-(-)- e S-(+)-MHD	0,017	2,2	0,017 (0,012-0,022)

EPR=erro padrão relativo; IC=intervalo de confiança; MTT=tempo médio de trânsito (*mean transit time*); CL_{ss}/F=*clearance* aparente; Q=*clearance* inter-compartimental; V_{ss}/F=volume de distribuição aparente; F₁=biodisponibilidade; ALAG1 s10, *lag time* no indivíduo 10; ALAG1 s09, *lag time* no indivíduo 09.

4.4 Avaliação do modelo

Os gráficos de diagnóstico de qualidade do ajuste apresentados na Figura 3.3, de DV *versus* PRED, DV *versus* IPRED, CWRES *versus* PRED e CWRES *versus* tempo, indicam a aceitabilidade do modelo final. Pode-se observar que os CWRES estão aleatoriamente distribuídos em torno de zero para a OXC e para os enantiômeros do MHD. De forma geral, as previsões populacionais e individuais descrevem os dados de forma adequada.

Figura 3.3: Gráficos de diagnóstico de qualidade do ajuste (*goodness-of-fit*) do modelo final da farmacocinética populacional da OXC, do R-(-)-MHD e do S-(+)-MHD – dados observados (*dependent variable* - DV) versus previsões baseadas na estimativa populacional do modelo (*population prediction* - PRED), DV versus previsões baseadas nas estimativas individuais do modelo (*individual prediction* - IPRED), resíduos ponderados condicionais (*conditional weighted residuals* - CWRES) versus tempo, CWRES versus PRED; ○=Ocasão O (tratamento com OXC em monoterapia), ●=Ocasão O+V (tratamento com OXC+verapamil).

Os gráficos espelhos da OXC e dos enantiômeros do MHD representados na Figura 3.4 revelam que a estrutura da matriz de variância-covariância foi bem caracterizada. A avaliação do modelo da OXC e dos enantiômeros do MHD com base nos resultados dos gráficos espelhos revelam a similaridade dos dados originais (OBS) com os simulados (1, 2 e 3), tanto para a população (PRED) como para os indivíduos (IPRED). Os conjuntos de dados simulados reproduziram um padrão de dispersão semelhante ao observado nos dados originais.

Figura 3.4: Gráficos espelhos (*mirror plots*) populacionais (PRED versus DV) e individuais (IPRED versus DV) da OXC, do R-(-)-MHD e do S-(+)-MHD. Gráficos OBS= gráficos dos dados originais; Gráficos 1, 2 e 3=gráficos dos dados simulados; ○=Ocasão O (tratamento com OXC em monoterapia); ●=Ocasão O+V (tratamento com OXC+verapamil).

Os gráficos do VPC do modelo final, com todos os indivíduos, apresentados na Figura 3.5 mostram que as concentrações observadas foram bem previstas pelo modelo, o que indica a adequação das estimativas dos parâmetros e um bom desempenho preditivo do modelo. Foi observada uma predição ligeiramente

aumentada para ambos os enantiômeros do MHD, porém isso é aceitável considerando o pequeno tamanho amostral.

Figura 3.5: Verificação visual preditiva (VPC - *visual predictive check*) para o modelo final da farmacocinética populacional da OXC, do R-(-)-MHD e do S-(+)-MHD. As linhas tracejadas representam o intervalo de confiança de 95% e as linhas contínuas a mediana dos dados simulados (n=1000). Ocasião O=tratamento com OXC em monoterapia; Ocasião O+V=tratamento com OXC+verapamil.

Os resultados do PPC, expressos na Figura 3.6, mostram que o modelo descreveu adequadamente os valores de AUC^{0-12} , tanto para OXC como para os enantiômeros do MHD nas ocasiões de tratamento com OXC em monoterapia e OXC associada ao verapamil. Os histogramas representam a distribuição dos valores de AUC^{0-12} calculados a partir de 1000 simulações. A linha vermelha representa a mediana dos valores de AUC^{0-12} dos dados dos voluntários sadios incluídos neste estudo.

Figura 3.6: Distribuição da exposição da OXC, do R-(-)-MHD e do S-(+)-MHD em voluntários sadios. Os histogramas representam a distribuição dos valores de AUC^{0-12} calculados a partir dos dados de 1000 simulações e a linha contínua representa a mediana dos valores de AUC^{0-12} dos dados observados. Ocasão O=tratamento com OXC em monoterapia; Ocasão O+V=tratamento com OXC+verapamil.

A distribuição NPDE e os histogramas apresentados na Figura 3.7 indicam que a hipótese de uma distribuição normal das diferenças entre as previsões dos dados individuais e dos dados observados é aceitável. Pode-se observar que os erros estão distribuídos de forma normal, a variabilidade da população está bem predita pelo modelo independentemente da planilha com dados originais e não existe distorções nos gráficos NPDE *versus* DV ou NPDE *versus* tempo.

Figura 3.7: Análises da distribuição dos erros de predição normalizada (NPDE - *normalised prediction distribution errors*) para a OXC, o R-(-)-MHD e o S-(+)-MHD. Esquerda: Histograma da distribuição do NPDE, com a densidade da distribuição gaussiana normal sobreposta; Direita: NPDE *versus* previsões baseadas na estimativa populacional (PRED - *population prediction*) e NPDE *versus* tempo. ○=Ocasião O (tratamento com OXC em monoterapia); ●=Ocasião O+V (tratamento com OXC+verapamil).

4.5 Predição das concentrações cerebrais dos enantiômeros do MHD

A predição da exposição cerebral foi realizada utilizando os dados de concentração livre do R-(-)-MHD e do S-(+)-MHD no plasma dos voluntários sadios investigados e os parâmetros farmacocinéticos oriundos de ratos em trabalho anterior do grupo (CLINCKERS et al., 2008). De acordo com a Figura 3.8 e a Tabela 3.4, a associação com o verapamil resulta proporcionalmente em maior aumento nas concentrações do MHD no cérebro do que no plasma.

Figura 3.8: Concentração plasmática livre e cerebral do R-(-)-MHD e do S-(+)-MHD *versus* tempo. Os dados estão expressos como mediana. Ocasão O=tratamento com OXC em monoterapia; Ocasão O+V=tratamento com OXC+verapamil.

Tabela 3.4: Valores de AUC^{0-12} estimados para a concentração plasmática livre e cerebral dos enantiômeros do MHD. Valores expressos como mediana, média (IC 95%).

Parâmetro	R-(-)-MHD		S-(+)-MHD	
	Ocasão O	Ocasão O+V	Ocasão O	Ocasão O+V
AUC^{0-12} plasma livre ($\mu\text{g.h/mL}$)	10,14 9,98 (7,62-12,33)	12,43 11,81 (10,33-13,29)	36,47 36,61 (31,89-41,32)	46,85* 43,69 (39,80-47,68)
AUC^{0-12} cérebro ($\mu\text{g.h/mL}$)	0,37 0,42 (0,27-0,57)	0,73* 0,82 (0,54-1,10)	1,05 1,20 (0,86-1,55)	2,08* 2,40 (1,68-3,12)

*Teste de Wilcoxon para dados pareados, $p < 0,05$ (Ocasão O vs ocasião O+V). AUC^{0-12} : área sob a curva concentração plasmática versus tempo.

4.6 Correlação entre a concentração cerebral dos enantiômeros do MHD e a alteração do fluxo sanguíneo cerebral

Para avaliar a correlação entre a concentração cerebral dos enantiômeros do MHD e a mudança do fluxo sanguíneo cerebral, foram utilizadas as imagens geradas pelos SPECTs cerebrais, como as mostradas na Figura 3.1. No total, foram identificadas 116 áreas do cérebro e delas foram selecionadas 79 áreas com relevância clínica. Os SPECTs cerebrais foram realizados sem fármaco, e no tempo de 4, 6 e 12 horas após a administração da última dose de OXC na ocasião do tratamento com oxcarbazepina (ocasião O) e na ocasião do tratamento com oxcarbazepina e verapamil (ocasião O+V). No entanto, observou-se uma mudança em relação ao sinal basal significativa apenas no tempo de 6 horas após administração da OXC em ambas as ocasiões (Figuras 3.9-3.14). Depois de realizar o teste de regressão linear entre os valores de AUC^{0-6} dos enantiômeros do MHD e a mudança relativa dos sinais dos SPECTs realizados 6h após a administração da OXC daqueles realizados sem fármaco, observou-se que mais de 50% da variação relativa do fluxo sanguíneo cerebral pode ser explicada pela mudança na concentração do MHD em algumas das áreas do cérebro. Observou-se um aumento no fluxo sanguíneo cerebral na amígdala, enquanto houve uma redução nas outras áreas do cérebro, principalmente no cerebelo (Figuras 3.15 e 3.16).

Figura 3.9: Alterações relativas do sinal dos SPECTs cerebrais *versus* tempo na região temporal do cérebro. Ocasião O=tratamento com OXC em monoterapia; Ocasião O+V=tratamento com OXC+verapamil.

Figura 3.10: Alterações relativas do sinal dos SPECTs cerebrais *versus* tempo na região frontal do cérebro. Ocasião O=tratamento com OXC em monoterapia; Ocasião O+V=tratamento com OXC+verapamil.

Figura 3.11: Alterações relativas do sinal dos SPECTs cerebrais *versus* tempo nas regiões basal e tálamo. Ocasão O=tratamento com OXC em monoterapia; Ocasão O+V=tratamento com OXC+verapamil.

Figura 3.12: Alterações relativas do sinal dos SPECTs cerebrais *versus* tempo nas regiões ínsula e parietal. Ocasão O=tratamento com OXC em monoterapia; Ocasão O+V=tratamento com OXC+verapamil.

Figura 3.13: Alterações relativas do sinal dos SPECTs cerebrais *versus* tempo na região occipital. Ocasão O=tratamento com OXC em monoterapia; Ocasão O+V=tratamento com OXC+verapamil.

Figura 3.14: Alterações relativas do sinal dos SPECTs cerebrais *versus* tempo na região do cerebelo. Ocasião O=tratamento com OXC em monoterapia; Ocasião O+V=tratamento com OXC+verapamil.

Figura 3.15: Correlação entre os valores de AUC⁰⁻⁶ do R-(-)-MHD e a mudança relativa do sinal dos SPECTs realizados 6h após a administração da OXC daqueles realizados sem fármaco em diferentes áreas do cérebro. Ocasão O=tratamento com OXC em monoterapia, Ocasão O+V=tratamento com OXC+verapamil.

Figura 3.16: Correlação entre os valores de AUC⁰⁻⁶ do S-(+)-MHD e a mudança relativa do sinal dos SPECTs realizados 6h após a administração da OXC daqueles realizados sem fármaco em diferentes áreas do cérebro. Ocasão O=tratamento com OXC em monoterapia, Ocasão O+V=tratamento com OXC+verapamil.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo descreve pela primeira vez um modelo sequencial da farmacocinética populacional da OXC e dos enantiômeros do metabólito ativo MHD em voluntários sadios após 300mg/12h de OXC por cinco dias associada ou não a 80mg/8h de verapamil. O estudo avalia também a correlação entre a farmacocinética da OXC e dos enantiômeros do seu metabólito MHD na presença e ausência de verapamil e a medida da alteração do fluxo sanguíneo cerebral.

Os valores de AUC^{0-12} obtidos na análise da farmacocinética não compartimental (Capítulo 2) foram utilizados como parte dos procedimentos de validação do modelo de farmacocinética populacional. A farmacocinética populacional da OXC foi melhor descrita por modelo de dois compartimentos. Considerando que o modelo de absorção de primeira ordem mostrou considerável viés, o modelo de trânsito como descrito por Savic et al. (2007), foi introduzido como uma alternativa atrativa para caracterizar os perfis de atraso na absorção, em especial em função da alta variabilidade interindividual observada na velocidade e extensão da absorção da OXC. O número ideal de compartimentos de trânsito no presente estudo foi avaliado através da adição gradual de um compartimento de cada vez e a absorção foi melhor descrita por uma cadeia linear de três compartimentos de trânsito. A farmacocinética dos enantiômeros do MHD foi melhor descrita por modelo de um compartimento, enquanto a introdução de *lag time* melhor descreveu o processo de retardo na absorção observado em dois dos doze voluntários investigados.

A escala alométrica determinada *a priori* com base no peso corporal foi utilizada para obter estimativas razoáveis do CL_{ss}/F e do V_{ss}/F devido ao pequeno tamanho da amostra ($n=12$). O valor exponencial foi fixado em 0,75 para o CL_{ss}/F e em 1 para o V_{ss}/F com base em estudos anteriormente reportados (ANDERSON & HOLFORD, 2008; BOOTH et al., 2007; MAHMOOD, 1998). Sallas et al. (2003) relataram valor exponencial de 0,67 com EPR de 11,5% para o CL_{ss}/F do MHD como mistura isomérica em crianças com epilepsia tratadas com OXC.

A maioria dos estudos descritos na literatura não quantificam as concentrações plasmáticas de OXC devido aos altos limites de quantificação dos métodos analíticos. Neste estudo, as amostras de plasma foram analisadas durante o intervalo de dose de 12 h. O V_{ss}/F da OXC avaliado no presente estudo como

monoterapia foi de 587 L (compartimentos central + periférico) (Tabela 3.3), enquanto Dickinson et al. (1989) relataram valor médio de 548,8 L após a administração crônica de OXC a pacientes com epilepsia. Os valores de V_{ss}/F para os enantiômeros R-(-)- e S-(+)-MHD foram de 23,6 L e 31,7 L, respectivamente, após a administração oral de OXC (Tabela 3.6). Flesch et al. (2011) apresentaram valores de V de 54,7 L e 45,9 L para o R-(-)- e para o S-(+)-MHD, respectivamente, em voluntários sadios tratados com infusão única de 250 mg de MHD racêmico ao longo de 30 min.

Em relação aos valores de *clearance* do MHD, foram encontrados valores de CL_{ss}/F de 2,01 L/h para ambos os enantiômeros do MHD nos voluntários sadios investigados tratados com dose múltipla de OXC (Tabela 3.3). Flesch et al. (2011) relataram valores de 4,3 L/h para o R-(-)-MHD e 3,1 L/h para o S-(+)-MHD em voluntários sadios tratados com infusão única de 250 mg de MHD.

No presente estudo, o verapamil foi administrado durante 5 dias, resultando em um aumento de 12% na biodisponibilidade da OXC (Tabela 3.3). Esse resultado é importante, considerando o possível envolvimento do aumento da expressão da P-gp no mecanismo de farmacorresistência no tratamento da epilepsia (LÖSCHER et al., 2011). A P-gp expressa no lúmen intestinal afeta a biodisponibilidade dos seus substratos administrados por via oral (ESTUDANTE et al., 2013; SCHMUTZ et al., 1994) e o verapamil inibe a sua atividade quando administrado em dose única ou em doses múltiplas (LEMMA et al., 2006; WAHAJUDDIN et al., 2014).

A concentração cerebral do R-(-)- e do S-(+)-MHD foi predita utilizando a concentração livre no plasma dos voluntários sadios investigados neste estudo e os parâmetros farmacocinéticos do MHD em ratos descritos por Clinkers et al. (2008). Assumiu-se que a expressão da P-gp na barreira hematoencefálica de seres humanos e de ratos é semelhante, com base no estudo relatado por Warren et al. (2009), no qual foi analisado o cérebro e células capilares endoteliais isoladas de microvasos cerebrais, para comparar a expressão da P-gp entre humanos, ratos, camundongos, suínos e bovinos. Em concordância com os resultados descritos por Clinkers et al. (2005), a administração de verapamil alterou a concentração cerebral do R-(-)- e do S-(+)-MHD em maior proporção quando comparada a concentração plasmática (Figura 3.8 e Tabela 3.4).

A correlação entre a mudança relativa do fluxo sanguíneo cerebral e a concentração cerebral do MHD foi avaliada utilizando valores de AUC do MHD de

zero a 6 horas (AUC^{0-6}), considerando que o efeito mais pronunciado da OXC e do MHD foi observado em 6 horas após a administração da OXC (Figuras 3.9-3.14). As principais áreas cerebrais (amígdala e cerebelo) que mostraram a correlação citada acima resultaram em hipoperfusão que foi acentuada após a associação do verapamil (Figuras 3.15 e 3.16). De acordo com o estudo descrito por Kim et al. (2013) a OXC não tem nenhum efeito colateral cognitivo significativo em pacientes com epilepsia, o que nos leva a conclusão de que o efeito observado é de fato um efeito farmacológico da OXC e do seu metabólito ativo MHD.

Este estudo teve, portanto, como objetivo estabelecer um protocolo para posterior investigação mais aprofundada de pacientes epiléticos submetidos a tratamento com OXC e permitir a avaliação abrangente da relação entre farmacocinética sistêmica, sinal do SPECT e resposta clínica.

Limitações

- A principal limitação do presente estudo foi o pequeno número de voluntários sadios investigados ($n=12$), embora justificado de modo a evitar exposição à radiação. Consequentemente, o EPR da IIV foi elevado (Tabela 3.5). Além disso, não foi possível realizar o modelo de covariável passo a passo para as covariáveis demográficas relevantes.

- As mudanças no fluxo sanguíneo cerebral após a associação de verapamil provavelmente foram causadas pelo aumento dos níveis cerebrais de MHD. No entanto, a confirmação dessa observação requer um braço experimental adicional com SPECTs oriundos de voluntários tratados somente com verapamil.

6 CONCLUSÕES

- 1- Os valores de V_{ss}/F como monoterapia foram de 587 L para a OXC, 23,6 L para o R-(-)-MHD e 31,7 L para o S-(+)-MHD, enquanto os valores de CL_{ss}/F para ambos os enantiômeros do MHD foram de 2,01 L/h;
- 3- A associação de verapamil aumentou a biodisponibilidade relativa da OXC e dos enantiômeros do MHD;
- 4- A administração do verapamil aumentou as concentrações preditas no cérebro do R-(-)- e do S-(+)-MHD em maior extensão do que aquelas observadas no plasma;
- 5- Apesar da necessidade de uma validação adicional, foi demonstrado que a escala alométrica pode ser utilizada em conjunto com técnicas de imagem para avaliar a disposição cinética de fármacos em tecidos;
- 6- As mudanças no fluxo sanguíneo cerebral, associadas à coadministração de verapamil provavelmente foram causadas pelo aumento dos níveis cerebrais de ambos os enantiômeros do MHD. A confirmação dessa observação requer um braço experimental adicional em que os dados sejam provenientes de SPECTs realizados após a administração apenas do verapamil.

Referências Bibliográficas

1. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012. **Diário Oficial**, 22 de maio de 2012.
2. AMIN, M.L. P-glycoprotein inhibition for optimal drug delivery. **Drug Target Insights**, Auckland, v.7, p.27-34, 2013.
3. ANDERSON, B.J.; HOLFORD, N.H.G. Mechanism-based concepts of size and maturity in pharmacokinetics. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, Palo Alto, v.48, p.303–32, 2008.
4. ARONICA, E.; SISODIYA, S.M.; GORTER, J.A. Cerebral expression of drug transporters in epilepsy. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, Amsterdam, v. 64, n. 10, p.919–929, 2012.
5. BENET, L.Z. Predicting drug disposition via application of a biopharmaceutics drug disposition classification system. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.**, Oxford, v.106, p.162-167, 2009.
6. BOOTH, B.P.; RAHMAN, A.; DAGHER, R.; GRIEBEL, D.; LENNON, S.; FULLER, D.; SAHAJWALLA, C.; MEHTA, M.; GOBBURU, J.V. Population pharmacokinetic-based dosing of intravenous busulfan in pediatric patients. **J. Clin. Pharmacol.**, Stamford, v.47, p.101–11, 200.
7. BRING, P.; ENSOM, H.H. Does oxcarbazepine warrant therapeutic drug monitoring? **Clin. Pharmacokinet.**, Auckland, v. 47, n.12, p.767-778, 2008.
8. CLINKERS, R.; SMOLDERS, I.; MICHOTTE, Y.; EBINGER, G.; DANHOF, M.; VOSKUYL, R.A.; DELLA PASQUA, O. Impact of efflux transporters and of seizures on the pharmacokinetics of oxcarbazepine metabolite in the rat brain. **Br. J. Pharmacol.**, London, p. 1-12, 2008.
9. CLINKERS, R.; SMOLDERS, I.; MEURS, A.; EBINGER, G.; MICHOTTE, Y. Quantitative in vivo microdialysis study on the influence of multidrug transporters on the blood-brain barrier passage of oxcarbazepine: concomitant use of hippocampal monoaminases as pharmacodynamic markers for the anticonvulsant activity. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, Bethesda, v.314, n.2, p.725-731, 2005.
10. CRIPPA, J.A.S.; ZUARDI, A.W.; GARRIDO, G.E.J.; WICHERT-ANA, L.; GUARNIERI, R.; FERRARI, L.; AZEVEDO-MARQUES, P.M.; HALLAK, J.E.C.; MCGUIRE, P.K.; BUSATTO, G.F. Effect of Cannabidiol (CBD) on Regional Cerebral Blood Flow. **Neuropsychopharmacology**, London, v. 29, p.417-426, 2004.

11. DE MORAES, N.V.; LAURETTI, G.R.; NAPOLITANO, M.N.; SANTOS, N.R.; GODOY, A.L.P.C.; LANCHOTE, V.L. Enantioselective analysis of unbound tramadol, O-desmethyiltramadol and N-desmethyiltramadol in plasma by ultrafiltration and LC-MS/MS: application to clinical pharmacokinetics. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v.880, n.1, p.140–7, 2012.
12. DICKINSON, R.G.; HOOPER, W.D.; DUNSTAN, P.R.; EADIE, M.J. First dose and steady-state pharmacokinetics of oxcarbazepine and its 10-hydroxy metabolite. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, Berlin, v.37, p.69-74, 1989.
13. ESTUDANTE, M.; MARAIS, J.G.; SOVERAL, G.; BENET, L.Z. Intestinal drug transporters: An overview. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, Amsterdam, v. 65, n. 10, p. 1340-1356, 2013.
14. FELDMANN, M.; ASSELIN, M.C.; LIU, J.; WANG, S.; MCMAHON, A.; ANTON-RODRIGUEZ, J.; WALKER, M.; SYMMS, M.; BROWN, G.; HINZ, R.; MATTHEWS, J.; BAUER, M.; LANGER, O.; THOM, M.; JONES, T.; VOLLMAR, C.; DUNCAN, J.S.; SISODIYA, S.M.; KOEPP, M.J. P-glycoprotein expression and function in patients with temporal lobe epilepsy: a case-control study. **Lancet Neurol.**, v.12, p. 777-785, 2013.
15. FLESCHE, G.; CZENDLIK, C.; RENARD, D.; LLOYD, P. Pharmacokinetics of the Monohydroxy Derivative of oxcarbazepine and its enantiomers after a single intravenous dose given as racemate compared with a single oral dose of oxcarbazepine. **Drug Metab. Dispos.**, Bethesda, v. 39, p.1103–1110, 2011.
16. FLESCHE, G.; FRANCOTE, E.; HELL, F.; DEGEN, P.H. Determination of the R(-) and S(+) enantiomers of the monohydroxylated metabolite of oxcarbazepine in human plasma by enantioselective high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v. 581, p.147-151, 1992.
17. FORTUNA, A.; ALVES, G.; FALCÃO, A.; SOARES-DA-SILVA, P. Evaluation of the permeability and P-glycoprotein efflux of carbamazepine and several derivatives across mouse small intestine by the Using chamber technique. **Epilepsia**, Malden, v. 53, n. 3, p.529–538, 2012.
18. FORTUNA, A.; ALVES, G.; ALMEIDA, A.; LOPES, B.; FALCÃO, A.; SOARES-DA-SILVA, P. A chiral liquid chromatography method for the simultaneous determination of oxcarbazepine, eslicarbazepine, R-licarbazepine and other new chemical derivatives BIA 2–024, BIA 2–059 and BIA 2–265, in mouse plasma and brain. **Biomed. Chromatogr.**, Chichester, v. 26, p.384–392, 2011.

- 19.FORTUNA, A.; ALVES, G.; FALCÃO, A.; SOARES-DA-SILVA, P. Binding of licarbazepine enantiomers to mouse and human plasma proteins. **Biopharm. Drug Dispos.**, Chichester, v.366, p.362–6, 2010.
- 20.HILLGREN, K.M.; KEPPLER, D.; ZUR, A.A.; GIACOMINI, K.M.; STIEGER, B.; CASS, C.E.; ZHANG, L.; INTERNATIONAL TRANSPORTER CONSORTIUM. Emerging transporters of clinical importance: an update from the International Transporter Consortium. **Clin. Pharmacol. Ther.**, New York, v.94, n.1, p.52-63, 2013.
- 21.JOO, Y.E.; HONG, S.B.; TAE, W.S.; HAN, S.J.; SEO, D.W.; LEE, K.H.; LEE,M.H. Effect of lamotrigine on cerebral blood flow in patients with idiopathic generalized epilepsy. **Eur. J. Med. Mol. Imag.**, Berlin, v.33, n.6, p.724-729, 2006.
- 22.KAUR, V.; GARG, T.; RATH, G.; GOYAL, A.K. Therapeutic potential of nanocarrier for overcoming to P-glycoprotein. **J. Drug Target**, London, v.7, p.1-12, 2014.
- 23.KIM, S.M.; SONG, J.; LEE, C.; LEE, H.W.; KIM, J.Y.; HONG, S.B.; JUNG, K.Y. Effect of oxcarbazepine on background EEG activity and cognition in epilepsy. **J. Epilepsy Res.**, Seoul, v.3, n.1, p.7–15, 2013.
- 24.KLITGAARD, N.A.; KRISTENSEN, O. Use of saliva for monitoring oxcarbazepine therapy in epileptic patients. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, Berlin, v.31, p.91–94, 1986.
- 25.KRASOWSKI, M.D.; MCMILLIN, G.A. Advances in anti-epileptic drug testing. **Clin. Chim. Acta**, Amsterdam, v.436, p.224-236, 2014.
- 26.KUSUHARA H. Imaging in the study of membrane transporters. **Clin. Pharmacol. Ther.**, New York, v.94, p.33-36, 2013.
- 27.LEMMA G.L; WANG, Z.; HAMMAN, M.A.; ZAHEER, N.A.; GORSKI, J.C.; HALL, S.D. The effect of short- and long-term administration of verapamil on the disposition of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein substrates. **Clin. Pharmacol. Ther.**, New York, v.79, n.3, p.218-230, 2006.
- 28.LÖSCHER, W.; LUNA-TORTÓS, C.; RÖMERMANN, K.; FEDROWITZ, M. Do ATP-binding cassette transporters cause pharmacoresistance in epilepsy? Problems and approaches in determining which antiepileptic drugs are affected. **Curr. Pharm. Des.**, Schiphol, v.17, n.26, p.2808–28, 2011.

29. LOUREIRO, A.I.; FERNANDES-LOPES, C.; WRIGHT, L.C.; SOARES-DA-SILVA, P. Development and validation of an enantioselective liquid-chromatography/tandem mass spectrometry method for the separation and quantification of eslicarbazepine acetate, eslicarbazepine, R-licarbazepine and oxcarbazepine in human plasma. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v.879, p.2611-2618, 2011.
30. MAHMOOD, I. Interspecies scaling: predicting volumes, mean residence time and elimination half-life. Some suggestions. **J. Pharm. Pharmacol.**, West Sussex, v.50, p.493-499, 1998.
31. MAIRINGER, S.; ERKER, T.; MULLER, M.; LANGER, O. PET and SPECT radiotracers to assess function and expression of ABC transporters in vivo. **Curr. Drug Metab.**, Hilversum, v.12, p.774-792, 2011.
32. MALÁTKOVÁ, P.; HAVLÍKOVÁ, L.; WSÓL, V. The role of carbonyl reducing enzymes in oxcarbazepine in vitro metabolism in man. **Chem. Biol. Interact.**, Limerick, v.220, p.241-247, 2014.
33. MARCHI, N.; GUIZO, G.; RIZZI, M.; PIRKER, S.; NOVAK, K.; CZECH, T.; BAUMGARTNER, C.; JANIGRO, D.; CACCIA, S.; VEZZANI, A. A pilot study on brain-to-plasma partition of 10,11-dihydro-10-hydroxy-5H-dibenzo(b,f)azepine-5-carboxamide and MDR1 brain expression in epilepsy patients not responding to oxcarbazepine. **Epilepsia**, Malden, v.46, n.10, p.1613-1620, 2005.
34. MARZOLINI, C.; PAUS, E.; BUCLIN, T.; KIM, R.B. Polimorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): Recent advances and clinical relevance. **Clin. Pharmacol. Ther.**, New York, v.75, n.1, p.13-33, 2004.
35. MAY, T.; KORN-MERKER, E.; RAMBECK, B. Clinical pharmacokinetics of oxcarbazepine. **Clin. Pharmacokinet.**, Auckland, v.42, n.12, p.1023-1042, 2003.
36. MAZZUCHELLI, I.; FRANCO, V.; FATTORE, C.; MARCHISELLI, R.; PERUCCA, E.; GATTI, G. A novel enantioselective microassay for the high-performance liquid chromatography determination of oxcarbazepine and its active metabolite monohydroxycarbazepine in human plasma. **Ther. Drug Monit.**, Hagerstown, v.29, n.3, p.319-324, 2007.
37. NUNES, T.; ROCHA, J.; FALCÃO, A.; ALMEIDA, L.; SOARES-DA-SILVA, P. Steady-state plasma and cerebrospinal fluid pharmacokinetics and tolerability of eslicarbazepine acetate and oxcarbazepine in healthy volunteers. **Epilepsia**, Malden, p.1-9, 2012.
38. PATSALOS, P.N.; ELYAS, A.A.; ZAKRZEWSKA, J.M. Protein binding of oxcarbazepine and its primary active metabolite, 10-hydroxycarbazepine, in patients with trigeminal neuralgia. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, Berlin, v.39, p. 413-415, 1990.

39. PERUCCA, E.; ELGER, C.; HALÁSZ, P.; FALCÃO, A.; ALMEIDA, L.; SOARES-DASILVA, P. Pharmacokinetics of eslicarbazepine acetate at steady-state in adults with partial-onset seizures. **Epilepsy Res.**, Amsterdam, v.96, p.132-139, 2011.
40. PERUCCA, P.; MULA, M. Antiepileptic drug effects on mood and behavior: molecular targets. **Epilepsy Behav.**, San Diego, v.26, p.440-449, 2013.
41. RIZZI, M.; CACCIA, S.; GUIZO, G.; RICHICHI, C.; GORTER, J.A.; ARONICA, E.; ALIPRANDI, M.; BAGNATI, R.; FANELLI, R.; D'INCALCI, M.; SAMANIN.; VEZZANI, A. Limbic seizures induce P-glycoprotein in rodent brain: functional Implications for pharmacoresistance. **J. Neurosci.**, Washington, v.22, n.14, p.5833-39, 2002.
42. SALLAS, W.M.; MILOSAVLJEV, S.; D'SOUZA J.; HOSSAIN, M. Pharmacokinetic drug interactions in children taking oxcarbazepine. **Clin. Pharmacol. Ther.**, New York, v.74, n.2, p.138-49, 2003.
43. SAVIC, R.M.; JONKER, D.M.; KERBUSCH, T.; KARLSSON, M.O. Implementation of a transit compartment model for describing drug absorption in pharmacokinetic studies. **J. Pharmacokinet. Pharmacodyn.**, New York, v.34, n.5, p.711-726, 2007.
44. SCHMIDT, D.; SACHDEOT, R. Oxcarbazepine for treatment of partial epilepsy: a review and recommendations for clinical use. **Epilepsy Behav.**, San Diego, v.1, p.396-405, 2000.
45. SCHMUTZ, M.; BRUGGER, F.; GENTSCH, C.; MCLEAN, M.J.; OLPE, H.R. Oxcarbazepine: preclinical anticonvulsant profile and putative mechanisms of action. **Epilepsia**, Malden, v.35, s.47-50, 1994. Supplement 5.
46. SCHÜTZ, H.; FELDMANN, J.F.; FAIGLE, J.W. The metabolism of ¹⁴C-oxcarbazepine in man. **Xenobiotica**, London, v.16, n.8, p.769-778, 1986.
47. SHEN Q, WANG L, ZHOU H, JIANG H, YU L, ZENG S. Stereoselective binding of chiral drugs to plasma proteins. **Acta Pharmacol. Sin.**, New York, v.8, p.998-1006, 2013.
48. SRIKANTH, C.H.; CHAIRA, T.; SAMPATHI, S.V.B.S.; BAMBAL, R.B. Correlation of in vitro and in vivo plasma protein binding using ultracentrifugation and UPLC-tandem mass spectrometry. **Analyst.**, Cambridge, v.138, n.20, p.6106-16, 2013.
49. TECOMA ES. Oxcarbazepine. **Epilepsia**, Malden, v. 40, p.37-46, 1999. Supplement 5.

50. VAN STEEG, T.J.; BORALLI, V.B.; KREKELS, E.H.J.; SLIJKERMAN, P.; FREIJER, J.; DANHOF, M.; DE LANGE, E.C.M. Influence of plasma protein binding on pharmacodynamics: Estimation of *in vivo* receptor affinities of β blockers using a new mechanism-based PK–PD modelling approach. **J. Pharm. Sci.**, Easton, v.98, n.10, p.3816–28, 2009.
51. VARMA, M.V.; ASHOKRAJ, Y.; DEY, C.S.; PANCHAGNULA, R. P-glycoprotein inhibitors and their screening: a perspective from bioavailability enhancement. **Pharmacol. Res.**, London, v.48, n.4, p.347-59, 2003.
52. VERROTTI, A.; COPPOLA, G.; PARISI, P.; MOHN, A.; CHIARELLI, F. Bone and calcium metabolism and antiepileptic drugs. **Clin. Neurol. Neurosurg.**, Amsterdam, v.112, p.1-10, 2010.
53. VOLOSOV, A.; BIALER, M.; XIAODONG, S.; PERUCCA, E.; SINTOV, A.; YAGEN, B. Simultaneous stereoselective high-performance liquid chromatographic determination of 10-hydroxycarbamazepine and its metabolite carbamazepine-10,11-*trans*-dihydrodiol in human urine. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v.738, p.419-425, 2000.
54. VOLOSOV, A.; XIAODONGO, S.; PERUCCA, E.; YAGEN, B.; SINTOV, A.; BIALER, M. Enantioselective pharmacokinetics of 10-hydroxycarbamazepine after oral administration of oxcarbazepine to healthy chinese subjects. **Clin. Pharmacol. Ther.**, New York, v.66, n.6, p.547-553, 1999.
55. WAHAJUDDIN; RAJU, K.S.; SINGH, S.P.; TANEJA, I. Investigation of the functional role of P-glycoprotein in limiting the oral bioavailability of lumefantrine. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v.58, n.1, p.489–494, 2014.
56. WARREN, MS, ZERANGUE N, WOODFORD K, ROBERTS LM, TATE EH, FENG B, LI, C.; FEUERSTEIN, T.J.; GIBBS, J.; SMITH, B.; DE MORAIS, S.M.; DOWER, W.J.; KOLLER, K.J. Comparative gene expression profiles of ABC transporters in brain microvessel endothelial cells and brain in five species including human. **Pharmacol. Res.**, London, v.59, n.6, p.404-13, 2009.
57. WELLINGTON, K.; GOA, K.L. Oxcarbazepine: an update of its efficacy in the management of epilepsy. **CNS Drugs**, Auckland, v.15, p.137-63, 2001.
58. WICHERT-ANA L.; AZEVEDO-MARQUES, P.M.; OLIVEIRA L.F.; FERNANDES, R.M.F.; VELASCO, T.R.; SANTOS, A.C.; ARAÚJO, D.; KATO, M.; BIANCHIN, M.M.; SAKAMOTO, A.C. Interictal hyperemia correlates with epileptogenicity in polymicrogyric cortex. **Epilepsy Res.**, Amsterdam, v.79, p.39-48, 2008a.

59. WICHERT-ANA, L.; AZEVEDO-MARQUES, P.M.; OLIVEIRA L.F.; TERRA-BUSTAMANTE, V.C.; FERNANDES, R.M.F.; SANTOS, A.C.; ARAÚJO, W.M.; BIANCHIN, M.M.; SIMÕES, M.V.; SAKAMOTO, A.C. Ictal technetium-99 m ethyl cysteinate dimer single-photon emission tomographic findings in epileptic patients with polymicrogyria syndromes: A Subtraction of ictal-interictal SPECT coregistered to MRI study. **Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging**, Berlin, v.35, p.1159-1170, 2008b.
60. WICHERT-ANA, L.; VELASCO, T.R.; TERRA-BUSTAMANTE, V.C.; JÚNIOR, V.A.; KATO, M.; LEITE, J.P.; ASSIRATI, J.A.; MACHADO, H.R.; BASTOS, A.C.; SAKAMOTO, A.C. Typical and atypical patterns in perictal SPECT of patients with unilateral temporal lobe epilepsy. **Epilepsia**, Malden, v.42. n.5, p.660-666, 2001.
61. WRIGHT, J.D.; BOUDINOT, F.D.; UJHELYI, M.R. Measurement and analysis of unbound drug concentrations. **Clin. Pharmacokinet.**, Auckland, v.30, n.6, p.445-462, 1996.
62. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Epilepsy in the who european region: Fostering epilepsy care in Europe**. Cruquius, 2011. 74 p.
63. ZAKERI-MILANI, P.; VALIZADEH, H. Intestinal transporters: enhanced absorption through P-glycoprotein-related drug interactions. **Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.**, London, v.10, n.6, p.859-871, 2014.
64. ZHANG, L.; ZHANG, Z.Q.; DONG, W.C.; JING, S.J. Accuracy assessment on the analysis of unbound drug in plasma by comparing traditional centrifugal ultrafiltration with hollow fiber centrifugal ultrafiltration and application in pharmacokinetic study. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v.1318, p.265-269, 2013.
65. ZHANG, C.; ZUO, Z.; KWAN, P.; BAUM, L. In vitro transport profile of carbamazepine, oxcarbazepine, eslicarbazepine acetate, and their active metabolites by human P-glycoprotein. **Epilepsia**, Malden, v.52, n.10, p.1894-1904, 2011.
66. ZHANG, L.; BEAL, S.L.; SHEINER, L.B. Simultaneous vs. sequential analysis for population PK/PD data I: best-case performance. **J. Pharmacokinet. Pharmacodyn.**, v.30, n.6, p.387-404, 2003.

Apêndices

APÊNDICE I: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO*****PESQUISA CIENTÍFICA*****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

NOME DO VOLUNTÁRIO / IDADE:...../.....
REGISTRO E/OU DOCUMENTO DE IDENTIFICAÇÃO.....

**NOME DA PESQUISA: Influência do verapamil na farmacocinética da
oxcarbazepina e dos enantiômeros da 10-hidroxicarbazepina e suas relações
com a perfusão cerebral em voluntários sadios**

PESQUISADORES:

Aluna: Natalícia de Jesus Antunes (FCFRP-USP) – (16) 3602-4195 / (16) 8173-9140

Orientadora: Profa Dra Vera Lucia Lanchote (FCFRP-USP) - (16) 3602-4195

Coordenadores Clínicos: Prof. Dr. Osvaldo Massaiti Takayanagui (FMRP-USP) –
(16) 36022349 e Dr. Veriano Alexandre Junior (FMRP-USP) - 36022613

Coordenador do SPECT: Prof. Dr. Lauro Wichert-Ana (FMRP-USP) – (16) 3602-
2596

OBSERVAÇÕES: Projeto Integrado entre a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto–USP e Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto–USP.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Venho através desta, convidar você a participar do Estudo: *“Influência do verapamil na farmacocinética da oxcarbazepina e dos enantiômeros da 10-hidroxicarbazepina e suas relações com a perfusão cerebral em voluntários sadios”*.

1- “Em alguns casos, quando ocorre a mistura de remédios, pode acontecer de um remédio modificar o efeito do outro. Assim, o nosso estudo procura entender se o verapamil, um remédio usado para tratar a pressão alta modifica o efeito da oxcarbazepina que é um remédio utilizado no tratamento da epilepsia e também comparar a quantidade desse remédio no sangue com a quantidade do cérebro. Para isso todas as pessoas que irão participar deste estudo vão ter que fazer exames de saúde antes de começar o estudo para saber se existe algum problema. O estudo será realizado em três fases. Na primeira fase o Sr (Sra) receberá uma dose do radiofármaco Etilenodicisteína marcado com Tecnécio-99m (^{99m}Tc -ECD) na veia, que é utilizado para investigar várias doenças e também para estudar como o remédio é distribuído no cérebro, e fazer uma tomografia cerebral, um exame que fornece imagens do cérebro. Este radiofármaco possui pequena quantidade de radiação equivalente à metade da radiação de um Raio X de tórax. Raramente este radiofármaco pode causar alguns sintomas, tais como febre, dor de cabeça, dor no peito, vermelhidão na pele, tontura e náuseas. Na segunda fase o Sr. (Sra) fará um tratamento de cinco dias, com 300 mg de oxcarbazepina de 12 em 12h. No quinto dia do tratamento serão feitas 12 coletas de sangue de aproximadamente 1 colher de sopa por vez até 12h após a tomada do remédio e será realizada 1 tomografia. Na terceira fase, o Sr (Sra) fará um tratamento de cinco dias, com 300 mg de oxcarbazepina de 12 em 12h e 80 mg de verapamil de 8 em 8h. No quinto dia do tratamento serão feitas 12 coletas de sangue de aproximadamente 1 colher de sopa por vez até 12h após a tomada do remédio e será realizada 1 tomografia. Para realizar este estudo o Sr. (Sra) precisa ser internado duas vezes, sendo um dia de cada vez. Para colhermos o sangue, o Sr. (Sra) será picado uma só vez, sendo mantida um tubinho de plástico na sua veia para as retiradas posteriores de sangue,

num volume total equivalente a três colheres das de sopa. Durante o estudo você pode ter algumas reações adversas como sonolência, dores de cabeça, tontura, visão dupla, náusea, vômito e fadiga causados pela oxcarbazepina ou hipotensão, edema periférico, bradicardia, insuficiência cardíaca congestiva (acontece quando o coração enfraquece e falha ao bombear o sangue corretamente), tontura, dor de cabeça, nervosismo, parestesias (sensações de frio, calor, formigamento e pressão na pele), constipação e náuseas causados pelo verapamil. Esclarecemos que é pouco provável que tais efeitos colaterais ocorram, entretanto é importante que o(a) senhor(a) esteja consciente dos mesmos, caso aconteçam. Neste caso, procurar imediatamente os Pesquisadores listados acima. A sua colaboração permitirá entender melhor como a oxcarbazepina se distribui no cérebro, possibilitando no futuro descobrir se o verapamil pode melhorar o efeito da oxcarbazepina no tratamento das crises epiléticas.

2- Você tem a garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa e o tratamento a que será submetido;

3- Você tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar no estudo sem que isso traga prejuízo à continuação do seu cuidado e tratamento;

4- Os pesquisadores tem o compromisso de lhe proporcionar informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar sua vontade de continuar participando;

5- Os pesquisadores se comprometem a manter sigilo da sua participação e de publicar os resultados da pesquisa para a comunidade médica e científica pertinente;

6- Você tem a garantia da disponibilidade de tratamento médico e a indenização que legalmente teria direito, por parte da Instituição à saúde, em caso de danos que a justifiquem, diretamente causados pela pesquisa.

Declaro que em/...../..... concordei voluntariamente em participar como voluntário do projeto de pesquisa acima referido e que fui devidamente informado de todos os detalhes.

OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:.....

Ribeirão Preto,.....de.....de 201.....

Assinatura do voluntário

RG ou CPF:

Dr. Veriano Alexandre Junior

CPF: 803.088.809-00

Prof. Dr. Osvaldo Massaiti Takayanagui

CPF: 744.838.898-34

Prof. Dr. Lauro Wichert Ana

CPF: 375.558.121-34

Natalícia de Jesus Antunes

CPF: 054.756.186-58

Profa Dra Vera Lucia Lanchote

CPF: 033.163.688-33

TESTEMUNHAS NÃO LIGADAS À PESQUISA:

1

Assinatura

Identificação

2

Assinatura

Identificação

APÊNDICE II: Dados demográficos dos voluntários sadios investigados (n=12).**Tabela i:** Dados demográficos dos voluntários sadios incluídos na investigação (n=12).

Voluntário	Idade (anos)	Peso (Kg)	Altura (m)	IMC (Kg/m²)	Sexo
1	31	63,500	1,64	23,5	M
2	27	59,450	1,58	23,67	F
3	30	60,000	1,58	24,03	F
4	34	83,400	1,69	29,20	F
5	30	95,150	1,97	24,40	M
6	26	58,350	1,68	20,67	F
7	29	58,550	1,66	21,25	F
8	30	48,700	1,57	19,76	F
9	41	64,65	1,66	23,46	F
10	27	90,950	1,87	26,01	M
11	22	77,450	1,75	25,29	M
12	26	59,250	1,64	22,03	F

APÊNDICE III: Parâmetros bioquímicos usados para a avaliação da normalidade funcional dos sistemas/órgãos hematológico, renal, hepático e endócrino dos voluntários sadios investigados (n=12).

Tabela ii: Parâmetros bioquímicos dos voluntários sadios investigados (n=12).

Parâmetros Valor de Referência	Voluntários											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Creatinina 0,7-1,5 mg/dL	1,30	1,00	0,79	0,82	0,86	1,04	0,84	0,91	0,59	0,79	0,68	0,60
AST Até 32 U/L	35,00	20,00	15,00	15,00	21,00	14,00	23,00	19,00	12,00	17,00	16,00	19,00
Bilirrubina total 0,2-1,2 mg/dL	2,54	0,59	0,49	0,43	0,51	0,57	1,82	0,64	0,93	0,58	0,44	0,45
Bilirrubina direta Até 0,3 mg/dL	0,59	0,20	0,17	0,17	0,16	0,21	0,60	0,27	0,30	0,19	0,19	0,16
Bilirrubina indireta Até 0,9 mg/dL	1,95	0,40	0,32	0,27	0,35	0,36	1,21	0,36	0,63	0,38	0,68	0,28
Glicemia 70-100 mg/dL	84,00	84,00	82,00	88,00	76,00	89,00	80,00	78,00	80,00	83,00	73,00	86,00
Gama GT H: 10-50 U/L M: 7-32 U/L	29,00	23,00	18,00	19,00	12,00	22,00	20,00	18,00	28,00	19,00	20,00	19,00
TSH 0,4-4,0 µgIU/mL	1,03	0,67	3,28	1,25	0,66	1,33	1,10	0,91	2,58	4,00	1,68	0,93
Colesterol total Até 200g/dL	147,00	135,00	155,00	150,00	152,00	180,00	124,00	130,00	197,00	221,00	207,00	198,00
HDL 40-80 mg/dL	40,00	38,00	48,00	38,00	43,00	-	38,00	36,00	43,00	46,00	91,00	52,00
LDL 50-140 mg/dL	98,00	83,00	92,00	97,00	99,00	-	76,00	80,00	144,00	148,00	92,00	125,00
Triglicérides < 150 mg/dL	45,00	69,00	73,00	78,00	46,00	75,00	49,00	69,00	55,00	134,00	120,00	107,00
Beta HCG	-	-	neg	neg	-	-	neg	neg	neg	neg	neg	neg

APÊNDICE IV: Dados individuais da disposição cinética e metabolismo da OXC e dos enantiômeros do metabólito MHD no estado de equilíbrio após 300mg/12h oral de OXC em voluntários sadios na ocasião O.

Tabela iii: Dados individuais da disposição cinética e metabolismo da OXC no estado de equilíbrio após 300mg/12h oral de OXC em voluntários sadios na ocasião O.

Pacientes	C _{max} (µg/mL)	t _{max} (h)	AUC ⁰⁻¹² (µg.h/mL)	C _{média} (µg/mL)	MRT ^{0-∞} (h)	t _{1/2} (h)	Kel (h ⁻¹)	Vss/F (L)	CLss/F (L/)	Flutuação (%)	f _u
1	2,79	0,50	4,90	0,41	3,76	1,27	0,54	231,60	61,59	655,65	0,18
2	1,51	1,00	4,88	0,41	5,52	2,29	0,30	338,01	61,23	348,30	0,23
3	1,59	0,50	3,92	0,33	4,77	2,73	0,25	366,34	76,80	463,27	0,39
4	0,88	1,00	2,21	0,18	4,65	2,98	0,23	628,25	135,11	460,65	0,32
5	1,20	0,75	2,30	0,19	3,48	1,50	0,46	453,64	130,35	610,74	0,37
6	2,87	1,00	5,78	0,48	4,02	2,50	0,28	208,76	51,93	573,45	0,25
7	1,18	1,5	4,21	0,35	4,40	2,26	0,31	314,30	71,43	318,62	0,23
8	0,72	1,00	3,23	0,27	6,58	2,40	0,29	612,05	93,02	219,66	0,26
9	0,81	0,50	2,94	0,24	8,02	3,20	0,22	817,64	101,95	309,53	0,23
10	0,45	2,5	1,25	0,10	5,60	2,24	0,31	271,10	55,10	405,80	0,30
11	2,95	1,00	4,04	0,34	3,24	2,51	0,28	1314,04	234,65	670,91	0,13
12	1,65	2,00	5,46	0,45	4,92	2,69	0,26	240,90	74,35	339,97	0,31

Tabela iv: Dados individuais da disposição cinética e metabolismo do R(-)-MHD no estado de equilíbrio após 300mg/12h oral de OXC em voluntários sadios na ocasião O.

Voluntários	C _{max} (µg/mL)	t _{max} (h)	AUC ⁰⁻¹² (µg.h/mL)	C _{média} (µg/mL)	MRT ^{0-∞} (h)	t _{1/2} (h)	Kel (h ⁻¹)	Flutuação (%)	f _u
1	3,01	3,00	27,32	2,28	18,81	12,37	0,06	57,32	0,39
2	3,28	2,50	32,07	2,67	21,87	14,29	0,05	45,17	0,43
3	3,93	1,50	34,35	2,86	18,40	11,89	0,06	62,39	0,54
4	2,59	3,00	24,43	2,04	19,21	12,53	0,05	59,78	0,42
5	1,90	2,50	17,42	1,45	25,69	17,67	0,04	51,93	0,44
6	2,41	4,00	19,75	1,65	21,63	15,01	0,05	78,55	0,62
7	3,60	3,50	26,30	2,19	13,77	9,03	0,08	100,21	0,38
8	2,61	3,50	26,41	2,20	21,01	13,31	0,05	41,25	0,19
9	1,60	4,00	15,95	1,33	16,23	9,26	0,07	41,91	0,45
10	1,13	4,00	10,07	0,84	17,62	10,34	0,07	72,94	0,42
11	2,04	5,00	18,51	1,54	12,21	7,40	0,09	69,37	0,37
12	3,68	5,00	32,89	2,74	12,52	7,10	0,10	73,98	0,42

Tabela v: Dados individuais da disposição cinética e metabolismo do S-(+)-MHD no estado de equilíbrio após 300mg/12h oral de OXC em voluntários sadios na ocasião O.

Pacientes	C _{max} (µg/mL)	t _{max} (h)	AUC ⁰⁻¹² (µg.h/mL)	C _{média} (µg/mL)	MRT ^{0-∞} (h)	t _{1/2} (h)	Kel (h ⁻¹)	Flutuação (%)	f _u
1	11,65	3,0	111,08	9,26	20,57	13,28	0,05	48,27	0,37
2	12,03	3,0	121,22	10,10	29,78	19,47	0,04	36,17	0,38
3	11,00	1,5	113,69	9,47	17,88	10,85	0,06	38,71	0,43
4	7,43	3,0	74,32	6,19	20,48	12,57	0,05	42,63	0,40
5	9,43	4,0	94,81	7,90	20,90	12,40	0,06	38,58	0,38
6	11,24	4,00	98,27	8,19	28,17	19,40	0,04	62,33	0,37
7	11,18	3,5	92,65	7,72	18,03	10,93	0,06	69,50	0,35
8	11,70	3,5	117,81	9,82	22,21	13,26	0,05	38,50	0,39
9	8,30	3,0	82,64	6,89	14,52	7,92	0,09	44,07	0,35
10	6,80	4,00	62,73	5,23	17,86	10,61	0,06	71,86	0,36
11	9,90	5,00	96,11	8,01	10,18	5,21	0,13	62,23	0,32
12	11,10	5,0	109,19	9,10	16,11	9,78	0,07	48,22	0,39

APÊNDICE V: Dados individuais da disposição cinética e metabolismo da OXC e dos enantiômeros do metabólito MHD no estado de equilíbrio após 300mg/12h oral de OXC associada com verapamil 80mg/12h por via oral em voluntários sadios na ocasião O+V.

Tabela vi: Dados individuais da disposição cinética e metabolismo da OXC no estado de equilíbrio após 300mg/12h oral de OXC associada com verapamil 80mg/12h por via oral em voluntários sadios na ocasião O+V.

Pacientes	C _{max} (µg/mL)	t _{max} (h)	AUC ⁰⁻¹² (µg.h/mL)	C _{média} (µg/mL)	TRM ^{0-∞} (h)	t _{1/2} (h)	Kel (h ⁻¹)	V _{ss} /F (L)	CL _{ss} /F (L/h)	Flutuação (%)	f _u
1	2,27	0,50	4,59	0,38	3,34	1,64	0,42	218,45	65,40	572,08	0,32
2	1,87	0,25	3,84	0,32	5,51	3,07	0,23	429,12	77,88	560,92	0,28
3	2,86	1,00	6,09	0,51	5,04	3,34	0,21	247,97	49,20	539,76	0,30
4	1,67	0,75	3,75	0,31	3,70	1,45	0,48	296,24	80,06	515,93	0,12
5	1,17	0,75	2,43	0,20	3,97	1,71	0,41	491,07	123,69	553,19	0,45
6	2,57	1,00	6,01	0,50	3,66	1,99	0,35	183,66	50,18	492,08	0,30
7	3,20	0,50	5,76	0,48	3,24	1,64	0,42	168,83	52,11	651,55	0,25
8	2,02	1,00	5,25	0,44	4,79	2,49	0,28	272,93	56,98	436,53	0,45
9	1,35	3,00	3,90	0,32	6,38	2,28	0,30	490,17	76,83	393,07	0,31
10	1,43	0,50	2,48	0,21	3,12	1,51	0,46	248,80	68,73	671,84	0,37
11	1,50	0,75	3,78	0,31	4,06	1,96	0,35	368,89	118,23	460,40	0,32
12	1,63	1,00	4,35	0,36	3,62	1,18	0,59	320,74	79,00	426,81	0,29

Tabela vii: Dados individuais da disposição cinética e metabolismo do R(-)-MHD no estado de equilíbrio após 300mg/12h oral da OXC associada com verapamil 80mg/12h por via oral em voluntários sadios na ocasião O+V.

Pacientes	C _{max} (µg/mL)	t _{max} (h)	AUC ⁰⁻¹² (µg.h/mL)	C _{média} (µg/mL)	MRT ^{0-∞} (h)	t _{1/2} (h)	Kel (h ⁻¹)	Flutuação (%)	f _u
1	3,28	2,5	29,85	2,49	21,64	14,40	0,05	54,31	0,45
2	3,26	1,0	29,33	2,44	15,50	9,96	0,07	62,96	0,43
3	4,36	1,0	35,52	2,96	22,69	13,41	0,05	70,71	0,41
4	3,42	2,0	29,22	2,43	21,71	15,05	0,05	67,92	0,42
5	1,97	3,5	19,77	1,65	36,53	24,62	0,03	52,09	0,53
6	2,58	4,00	22,64	1,89	15,51	8,92	0,08	74,98	0,44
7	3,22	5,0	29,36	2,45	11,08	6,31	0,11	70,71	0,40
8	3,52	2,5	28,90	2,41	13,95	8,33	0,08	74,75	0,47
9	2,71	3,5	22,71	1,89	13,19	7,83	0,09	76,63	0,58
10	1,52	1,5	13,24	1,10	21,63	14,66	0,05	61,07	0,44
11	2,23	3,5	19,87	1,66	16,29	10,23	0,07	62,45	0,46
12	3,73	3,00	33,82	2,82	13,03	7,32	0,09	62,60	0,46

Tabela viii: Dados individuais da disposição cinética e metabolismo do S-(+)-MHD no estado de equilíbrio após 300mg/12h oral de OXC associada com verapamil 80mg/12h por via oral em voluntários sadios na ocasião O+V.

Pacientes	C _{max} (µg/mL)	t _{max} (h)	AUC ⁰⁻¹² (µg.h/mL)	C _{média} (µg/mL)	TRM ^{0-∞} (h)	t _{1/2} (h)	Kel (h ⁻¹)	Flutuação (%)	f _u
1	11,70	2,5	113,64	9,47	26,67	17,90	0,04	42,25	0,42
2	12,34	2,5	122,05	10,17	16,95	10,69	0,06	47,37	0,39
3	12,19	2,5	112,64	9,39	24,28	15,91	0,04	48,20	0,38
4	9,98	2,0	87,36	7,28	24,05	16,55	0,04	59,46	0,39
5	9,66	3,0	99,63	8,30	35,69	22,91	0,03	40,28	0,48
6	15,35	4,0	138,61	11,55	15,51	9,26	0,07	58,35	0,34
7	11,40	5,0	110,09	9,17	11,36	6,01	0,11	59,25	0,39
8	12,32	2,5	107,61	8,97	17,42	10,31	0,07	57,48	0,43
9	12,42	3,5	115,26	9,60	17,56	10,94	0,06	53,97	0,43
10	8,52	1,5	78,75	6,56	22,61	14,54	0,05	48,61	0,37
11	10,70	3,5	94,64	7,89	26,03	18,38	0,04	58,56	0,39
12	12,64	3,0	119,97	7,58	15,15	8,59	0,08	50,62	0,44