

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

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 $\mu\text{g/mL}$ como valor total e 0,32 $\mu\text{g/mL}$ como concentração livre em 1,0 h, área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo (AUC^{0-12}) de 3,98 $\mu\text{g.h/mL}$ 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 $\mu\text{g/mL}$) da OXC e aumentou os valores para ambos os enantiômeros do MHD de C_{max} como valor total (2,60 vs 3,27 $\mu\text{g/mL}$ para o R-(-)- e 11,05 vs 11,94 $\mu\text{g/mL}$ para o S-(+)-MHD), C_{max} como concentração livre (3,11 vs 4,14 $\mu\text{g/mL}$ para o S-(+)-MHD), $C_{média}$ (2,11 vs 2,42 $\mu\text{g/mL}$ para o R-(-)- e 8,10 vs 9,07 $\mu\text{g/mL}$ para o S-(+)-MHD) e AUC^{0-12} (25,36 vs 29,06 $\mu\text{g.h/mL}$ para o R-(-)- e 97,19 vs 111,37 $\mu\text{g.h/mL}$ 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

Introdução

A epilepsia é um transtorno cerebral que afeta cerca de 50 milhões de pessoas no mundo, sendo que 30% dos pacientes são farmacorresistentes 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

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).

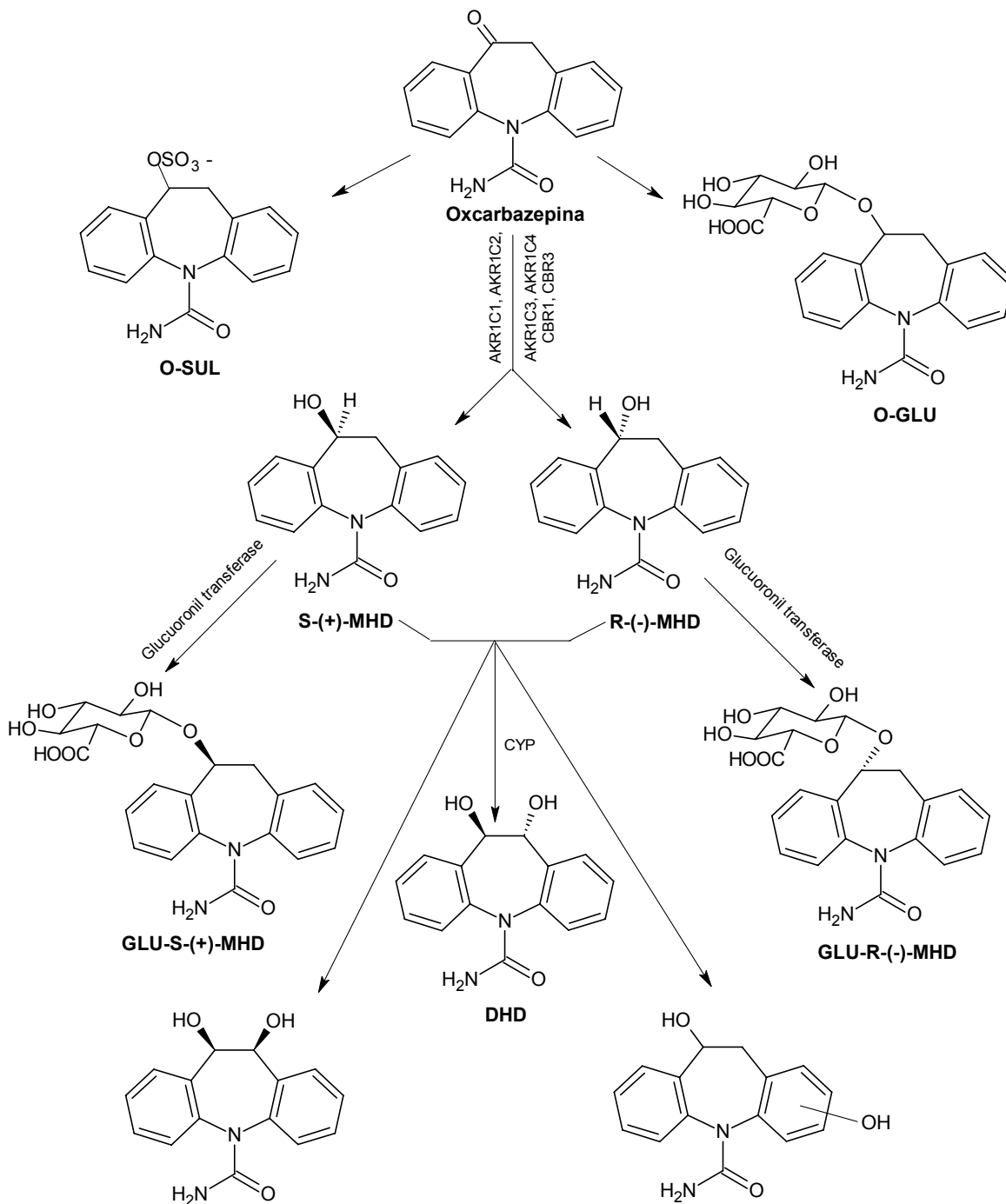


Figura 2.1: Metabolismo da OXC (FLESCH et al., 2011; SCHUTZ et al., 1986; WELLINGTON & GOA, 2001).

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.

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; SCHIMIDT & 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 -etilenodiacetato (^{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.

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-desmethyltramadol and N-desmethyltramadol 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-dyhydro-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.; GUIISO, 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 anticonvulsivant 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.VOLOSOF, 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.VOLOSOF, 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 periictal 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.