

CAPÍTULO V

*FARMACOCINÉTICA E BIODISPOSIÇÃO DO ACETATO
DE ESLICARBAZEPINA NO MURGANHO*

1. INTRODUÇÃO

Na última década foram introduzidos na prática clínica 10 novos fármacos antiepilépticos que apresentam características farmacológicas favoráveis em relação aos antiepilépticos clássicos ou de primeira geração, designadamente, um perfil farmacocinético melhorado e um menor potencial de interacções e de efeitos adversos. No entanto, apesar do número alargado de antiepilépticos disponíveis de primeira e de segunda geração, com espectros de actividade e perfis de tolerabilidade diferentes, possibilitando a selecção dos fármacos mais adequados às características individuais dos doentes epilépticos, aproximadamente 30% deles continua a manifestar crises, mantendo-se a necessidade de desenvolver fármacos antiepilépticos novos e mais efectivos (BIALER, 2006).

Actualmente, mais de 20 compostos anticonvulsivantes estão em variados estadios de desenvolvimento clínico (PERUCCA, FRENCH e BIALER, 2007). Alguns deles possuem estruturas moleculares não relacionadas quimicamente com os fármacos antiepilépticos existentes, enquanto outros são análogos estruturais de antiepilépticos instituídos na clínica e estão a ser desenvolvidos pelo potencial que apresentam para se implementarem como compostos melhorados (BIALER, 2006; PERUCCA, FRENCH e BIALER, 2007). O ESL ou acetato de S-Lic [S(-)-10-acetoxi-10,11-dihidro-5H-dibenz/b,f/azepina-5-carboxamida] inclui-se na categoria dos derivados estruturais de fármacos antiepilépticos já existentes, sendo considerado uma terceira geração da CBZ e uma segunda geração da OXC (PERUCCA, FRENCH e BIALER, 2007). O ESL, inicialmente conhecido como BIA 2-093, é um composto promissor com acção farmacológica no SNC, o qual que se encontra em fase final de ensaios clínicos como terapia adjuvante para a epilepsia parcial refractária e na fase II de ensaios clínicos como monoterapia para a epilepsia parcial e para a perturbação bipolar (ALMEIDA e SOARES-DA-SILVA, 2007). Presentemente, está também sob desenvolvimento clínico para o tratamento da dor neuropática (ALMEIDA *et al.*, 2008). Quimicamente, o ESL é uma molécula quiral que partilha com a CBZ e a OXC o núcleo dibenzazepina ligado ao substituinte 5-carboxamida, mas é estruturalmente diferente na posição 10,11 (BENES *et al.*, 1999; ALMEIDA e SOARES-DA-SILVA, 2003 e 2007).

No homem, a principal via de biotransformação da CBZ é a oxidação ao metabolito CBZ-E, enquanto a OXC é rápida e quase completamente reduzida ao seu metabolito activo Lic, evitando-se a formação de epóxidos tóxicos (MESDJIAN *et al.*, 1999; SCHACHTER, 1999; ALMEIDA e SOARES-DA-SILVA, 2004; FLESCHE, 2004). A OXC é um pró-fármaco aquiral, no entanto, a sua metabolização a Lic é enantioselectiva, aparecendo no plasma como S-Lic e R-Lic numa razão enantiomérica de aproximadamente 4:1 (FLESCHE, 1992; VOLOSOV *et al.*, 1999; MAY, KORN-MERKER e RAMBECK, 2003). No que respeita ao metabolismo do ESL, estudos farmacocinéticos realizados no homem demonstraram que este pró-fármaco é rápida e extensamente hidrolisado ao metabolito activo S-Lic, o qual é responsável por mais de 90% da exposição farmacológica sistémica total aquando da administração oral do ESL. O enantiómero R-Lic e a OXC aparecem também no plasma, embora numa pequena extensão (ALMEIDA e SOARES-DA-SILVA, 2003, 2004 e 2007; ALMEIDA *et al.*, 2005). De facto, o ESL foi desenhado especificamente para impedir a sua biotransformação em metabolitos tóxicos, como o CBZ-E, formado por metabolização da CBZ, e para minimizar a produção desnecessária de enantiómeros e diastereómeros dos metabolitos da OXC, sem prejuízo da sua potência anticonvulsivante (BENES *et al.*, 1999; HAINZL, PARADA e SOARES-DA-SILVA, 2001). As variações moleculares entre estes três fármacos antiepilépticos são, certamente, responsáveis pelas diferenças verificadas nos perfis metabólicos correspondentes e, conseqüentemente, pelas diferenças encontradas nas respectivas propriedades farmacológicas.

As propriedades anticonvulsivantes do ESL foram identificadas num programa de investigação e de desenvolvimento de novos fármacos antiepilépticos conduzido pelos Laboratórios BIAL (Portela & Ca. S.A.), o qual consistiu em sintetizar séries de ésteres dos metabolitos activos da OXC (S-Lic e R-Lic ou Lic racémica) que, ao actuarem como pró-fármacos, libertassem prontamente *in vivo* os enantiómeros S-Lic e R-Lic. A potência anticonvulsivante dos diversos ésteres sintetizados foi testada em ratos após a correspondente administração oral, demonstrando o acetato de S-Lic (ESL) uma actividade anticonvulsivante similar à da CBZ e superior à da OXC. Por outro lado, comparativamente à CBZ e à OXC, após a administração intraperitoneal em ratos, o ESL mostrou ser menos neurotóxico e apresentou um índice de protecção anticonvulsivante mais elevado (BENES *et al.*, 1999). Em estudos subsequentes, efectuados com culturas de neurónios de hipocampo de rato, o ESL exibiu também menor neurotoxicidade que a CBZ e a OXC (ARAÚJO *et al.*, 2004). Atendendo a que o

sucesso clínico da OXC se deve, particularmente, a um perfil de tolerabilidade melhorado e a um menor potencial para interações farmacológicas comparativamente à CBZ, os resultados obtidos por BENES *et al.* (1999) sugeriram que o ESL poderia ainda trazer vantagens adicionais em relação à OXC, desde logo pela maior potência e menor toxicidade evidenciada em ratos.

A fase seguinte do desenvolvimento pré-clínico do ESL envolveu estudos *in vitro* em microssomas de fígado humano e ensaios *in vitro* e *in vivo* em diferentes espécies de animais de laboratório para confirmar a sua eficácia e segurança e para obter informação relativa à sua farmacocinética, permitindo, assim, estabelecer as doses a administrar ao homem nos primeiros ensaios clínicos (HAINZL, PARADA e SOARES-DA-SILVA, 2001; BIALER *et al.*, 2004). Os estudos de metabolismo realizados por HAINZL e colaboradores (2001) demonstraram diferenças na biotransformação do ESL nas diferentes espécies estudadas. Todavia, de acordo com o tipo de técnica analítica usada, aquiral ou quiral, o passo de hidrólise inicial a Lic ou S-Lic parece ocorrer em todas as espécies. Os resultados decorrentes dos ensaios de metabolismo com o ESL em ratos, murganhos e coelhos mostraram que, *in vivo*, o ESL é hidrolisado rapidamente ao enantiómero S-Lic, o qual é prontamente oxidado em OXC nos ratos. Nos coelhos e nos murganhos a disposição do ESL parece ser qualitativamente similar, porém, mediante tratamento equivalente, as concentrações plasmáticas máximas de S-Lic atingidas nos murganhos foram largamente superiores às alcançadas nos coelhos (HAINZL, PARADA e SOARES-DA-SILVA, 2001).

O desenvolvimento clínico de um novo fármaco é, geralmente, acompanhado por ensaios experimentais em animais de laboratório, pois, muitas vezes, devido a aspectos éticos e de exequibilidade, determinados estudos não podem ser realizados no homem, constituindo a utilização de modelos animais adequados alternativas válidas. Assim, atendendo conjuntamente aos dados pré-clínicos e clínicos disponíveis para o ESL, entre os pequenos animais de laboratório, de um ponto de vista metabólico, o murganho parece ser, neste caso, o modelo animal mais relevante para o homem. Por conseguinte, o murganho foi a espécie animal seleccionada para investigar a farmacocinética e a biodisposição oral do ESL, numa tentativa de complementar a informação farmacocinética decorrente dos ensaios clínicos. Neste capítulo são apresentados os dados relativos à evolução, em função do tempo, das concentrações plasmáticas, cerebrais e hepáticas do ESL e dos seus principais metabolitos gerados *in*

vivo em murganhos, após a administração oral de uma dose única de 350 mg/kg de ESL (ALVES *et al.*, 2008a).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – Fármacos e Excipientes

O ESL [(S)-(-)-10-acetoxi-10,11-dihidro-5H-dibenz/b,f/azepina-5-carboxamida (BIA 2-093); 100% puro por LC; lote 0000012976] foi cedido pelos Laboratórios BIAL (Portela & Ca. S.A.; Porto, Portugal) e suspenso diariamente, imediatamente antes do início das experiências, numa solução aquosa de carboximetilcelulose (CMC) a 0,5%. A CMC foi adquirida à Sigma (St. Louis, MO, USA).

2.2 – Animais e Desenho Experimental

Neste estudo foram usados murganhos CD-1, machos, adultos (30-35 g), provenientes da Harlan-Interfauna (Barcelona, Espanha) e mantidos em armários-biotério ventilados, com ciclos de luz-obscuridade de 12 h e temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), durante pelo menos 5 dias antes do início das experiências. Durante o período de alojamento os murganhos tiveram livre acesso a água e a dieta padronizada para roedores (4RF21, Mucedola, Itália), incluindo no decurso das experiências.

Todos os murganhos foram tratados com uma dose única de 350 mg/kg de ESL administrada por via oral através de uma sonda endogástrica (0,5 mL de suspensão por cada 30 g de peso). As amostras de sangue, o cérebro e o fígado foram colhidos às 0,25, 0,50, 0,75, 1, 2, 4, 6, 10, 16 e 24 h após a administração e foram usados 8 murganhos em cada ponto do tempo. As amostras de sangue foram recolhidas para tubos heparinizados mediante decapitação precedida de deslocamento cervical. O plasma foi separado por centrifugação a 4000 rpm/10 min (4°C) e armazenado a -30°C até à análise. Após a exsanguinação, o cérebro e o fígado foram rapidamente recolhidos, a vesícula biliar removida e eliminada e os tecidos pesados e homogeneizados (1 g/4 mL) em tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 5). Os tecidos homogeneizados foram centrifugados a 4800 rpm/15 min (4°C) e os sobrenadantes recolhidos e armazenados a -30°C até ao momento da análise.

A experimentação animal foi conduzida em conformidade com a Directiva Europeia (86/609/EEC) para a protecção dos animais utilizados para fins experimentais

ou outros fins científicos e todos os procedimentos foram aprovados pela Direcção-Geral de Veterinária.

2.3 – Método de Quantificação do ESL e dos seus Metabolitos

As concentrações do ESL e dos seus metabolitos no plasma e nos tecidos de cérebro e fígado de murganho foram determinadas por um método quiral de LC-UV desenvolvido e validado primariamente para este propósito, o qual foi recentemente publicado e anteriormente descrito no capítulo IV (ALVES *et al.*, 2007b). Os limites de quantificação do método para o ESL, S-Lic, R-Lic e OXC foram de 0,4 µg/mL no plasma e de 0,1 µg/mL no sobrenadante dos homogeneizados dos tecidos (~ 0,4 µg/g).

2.4 – Análise Farmacocinética

A farmacocinética é um ramo da farmacologia que descreve “o que o corpo faz ao fármaco”, por oposição à farmacodinamia, a qual descreve “o que fármaco faz ao corpo”. Assim, o conhecimento dos parâmetros farmacocinéticos básicos de um fármaco é fundamental para entender a sua disposição no organismo, os quais podem ser estimados por diferentes aproximações. Neste estudo recorreu-se a uma análise farmacocinética não-compartimental porque este tipo de tratamento permite estimar os parâmetros cinéticos sem a necessidade de ajustar os dados experimentais a um modelo determinístico (YAMAOKA, NAKAGAWA e UNO, 1978; DOMENECH BERROZPE e LAUROBA VILADROSA, 1997). Esta abordagem modelo-independente baseia-se na aplicação da teoria dos momentos estatísticos à análise das curvas concentração-tempo a fim de obter parâmetros representativos das mesmas. Este tratamento estatístico assume que o movimento individual das moléculas de fármaco no organismo é aleatório, de tal forma que após a administração de uma determinada dose de fármaco parte das moléculas são eliminadas de imediato enquanto outras permanecem no sistema biológico durante um certo período de tempo. Portanto, o tempo de residência das moléculas de fármaco no organismo é considerado uma variável aleatória que pode expressar-se como uma curva de distribuição normal, cuja média e variância reflectem o comportamento global das moléculas do fármaco (YAMAOKA, NAKAGAWA e UNO,

1978; CASABÓ ALÓS e MERINO SANJUÁN, 1997). Por outro lado, este tratamento farmacocinético assume que a disposição do fármaco na sua fase terminal segue um processo cinético de primeira ordem, devendo, por isso, obter-se um número suficiente de pares de dados concentração-tempo para definir a fase de eliminação terminal da curva e possibilitar a extrapolação da área sob a curva até ao infinito (DOMENECH BERROZPE e LAUROBA VILADROSA, 1997).

Em farmacocinética podem considerar-se três momentos estatísticos fundamentais: a área sob a curva concentração-tempo (AUC; momento de ordem zero), o tempo médio de residência que uma molécula permanece inalterada no organismo (MRT; momento de ordem um) e a variância do MRT (momento de ordem dois). Os momentos de ordem superior não encerram informação adicional e aumentam a complexidade matemática do sistema (YAMAOKA, NAKAGAWA e UNO, 1978).

Na prática, pela análise farmacocinética não-compartimental os valores da AUC e do MRT determinam-se da seguinte forma:

$$AUC = \int_0^{\infty} C \cdot dt$$

$$MRT = \int_0^{\infty} t \cdot C \cdot dt / \int_0^{\infty} C \cdot dt$$

Globalmente, pelo método independente do modelo podem estimar-se os seguintes parâmetros farmacocinéticos (DOMENECH BERROZPE e LAUROBA VILADROSA, 1997): AUC desde o tempo zero até ao último tempo de amostragem (AUC_{0-t}), AUC desde o tempo zero até ao infinito ($AUC_{0-\infty}$), constante de velocidade da fase terminal de eliminação (K_{el}), semi-vida de eliminação terminal ($t_{1/2}$), MRT, clearance (CL) e volume de distribuição (Vd). No entanto, os dois últimos parâmetros podem ser estimados apenas para o fármaco administrado e não para os metabolitos.

Na análise não-compartimental mediante uma administração extravasal, processo considerado neste estudo, deve atender-se a algumas particularidades. Para o cálculo do Vd e da CL é necessário conhecer a biodisponibilidade do fármaco (F), a qual é desconhecida em muitos casos e, nestas circunstâncias, podem estimar-se os parâmetros Vd/F e CL/F, os quais podem ser úteis para estudos comparativos. No

tratamento farmacocinético não-compartmental o valor da concentração máxima (C_{\max}) e o tempo necessário para alcançar a C_{\max} (t_{\max}) são obtidos directamente a partir dos dados experimentais. O t_{\max} é um parâmetro que está relacionado com a velocidade de absorção enquanto a C_{\max} é um parâmetro que depende da velocidade e da magnitude de absorção (DOMENECH BERROZPE e LAUROBA VILADROSA, 1997).

Tendo por objectivo a caracterização farmacocinética do ESL e dos seus metabolitos no plasma, no cérebro e no fígado de murganho, procurámos, numa primeira fase, obter um número suficiente de pares de dados experimentais concentração *versus* tempo para os compostos de interesse, em cada uma das matrizes biológicas consideradas, após a administração oral do ESL numa dose única de 350 mg/kg. Numa segunda fase, as curvas plasmáticas, cerebrais e hepáticas médias concentração-tempo foram submetidas a uma análise farmacocinética não-compartmental, permitindo, assim, estimar os parâmetros farmacocinéticos mais relevantes. A C_{\max} para os metabolitos do ESL no plasma, no cérebro e no fígado de murganho e o t_{\max} correspondente foram obtidos directamente a partir dos dados experimentais. Outros parâmetros farmacocinéticos relevantes como a AUC_{0-t} , a $AUC_{0-\infty}$, a $t_{1/2}$ e o MRT foram calculados recorrendo ao *software* WINNONLIN[®] versão 4.1 (Pharsight Co, Mountain View, CA, USA).

Para além da caracterização isolada da farmacocinética e da disposição do ESL no plasma, no cérebro e no fígado, procedemos também à caracterização da distribuição plasma-cérebro dos metabolitos do ESL e ao estudo da afinidade destes compostos para o tecido hepático. Assim, para avaliar a velocidade e a extensão de distribuição plasma-cérebro e plasma-fígado foram calculadas, para cada metabolito, as razões entre os valores dos parâmetros cinéticos C_{\max} e $AUC_{0-\infty}$ obtidos nas matrizes biológicas em causa (SEGARRA, MOVSHIN e ZARIF, 2002).

Por fim, com o intuito de avaliar o grau de associação entre as concentrações plasmáticas e as concentrações tecidulares dos metabolitos do ESL foram efectuadas análises de correlação de Pearson, considerando a correlação entre as variáveis estatisticamente significativa quando $p < 0,05$. Paralelamente, foram também realizadas análises de regressão linear simples para estimar as equações que permitem prever as concentrações no cérebro e no fígado perante a disponibilidade das concentrações plasmáticas, as quais são, geralmente, mais acessíveis.

3. RESULTADOS

3.1 – Farmacocinética do ESL no Murganho

3.1.1 – Biodisposição no plasma

As concentrações plasmáticas do ESL e dos seus principais metabolitos S-Lic, R-Lic e OXC foram avaliadas em murganhos, durante um período de 24 h, após a administração por via oral de uma dose única de 350 mg/kg de ESL, sob a forma de uma suspensão aquosa de CMC. No plasma, as concentrações do ESL e do metabolito R-Lic não foram determinadas quantitativamente por se situarem em valores BLQ em todos os pontos de amostragem estudados ($< 0,4 \mu\text{g/mL}$). As concentrações plasmáticas determinadas para os metabolitos S-Lic e OXC são apresentadas na tabela V.1. Na figura V.1 estão representados os perfis plasmáticos médios concentração-tempo obtidos para o ESL, S-Lic, R-Lic e OXC.

Tabela V.1 – Concentrações plasmáticas em murganhos após a administração oral de uma dose única de 350 mg/kg de ESL (n = 8): (A) S-Lic e (B) OXC.

(A)

Tempo (h)	Murganho								M ^a	DP ^b	CV ^c
	1	2	3	4	5	6	7	8			
0,25	16,55	32,06	28,55	12,57	28,33	29,69	28,37	25,86	25,25	6,90	27,32
0,50	17,79	14,60	26,50	20,27	45,63	34,25	20,19	18,90	24,77	10,39	41,96
0,75	35,50	17,90	20,20	23,48	18,28	20,93	28,02	15,21	22,44	6,55	29,19
1	19,68	30,68	27,96	24,01	30,93	21,63	21,41	24,34	25,08	4,31	17,19
2	11,79	17,59	11,37	9,67	13,12	12,24	11,81	14,96	12,82	2,45	19,08
4	10,46	6,91	6,16	11,83	9,38	9,09	12,92	7,84	9,32	2,35	25,19
6	8,98	7,07	9,65	4,72	4,70	6,29	4,82	7,55	6,72	1,94	28,88
10	3,68	4,32	3,51	5,06	5,32	4,69	4,87	3,62	4,38	0,71	16,15
16	8,90	2,29	0,79	1,83	2,49	0,79	1,86	2,82	2,72	2,60	95,65
24	- *	- *	- *	6,72	- *	- *	1,46	- *	1,02	2,36	230,63

* Concentrações plasmáticas $< 0,4 \mu\text{g/mL}$ (LQ); ^a Média, $\mu\text{g/mL}$; ^b Desvio padrão; ^c Coeficiente de variação, %.

(B)

Tempo (h)	Murganho								M ^a	DP ^b	CV ^c
	1	2	3	4	5	6	7	8			
0,25	0,58	1,57	2,00	0,53	1,24	1,14	0,97	1,28	1,16	0,49	41,90
0,50	1,48	1,09	1,81	1,57	2,75	2,74	2,08	1,47	1,87	0,61	32,46
0,75	2,54	1,35	2,02	2,60	1,55	2,77	2,29	1,39	2,06	0,57	27,74
1	2,38	3,81	3,07	2,60	3,17	3,03	2,77	2,99	2,98	0,43	14,38
2	1,84	2,65	1,43	1,22	1,77	2,17	1,88	2,34	1,91	0,47	24,46
4	1,76	0,92	0,92	1,78	1,34	1,13	1,75	1,56	1,40	0,37	26,54
6	1,39	1,29	1,69	0,91	1,13	1,19	0,81	1,27	1,21	0,28	22,73
10	0,69	0,76	0,59	0,98	0,96	0,85	0,81	0,73	0,80	0,13	16,66
16	1,37	0,57	- *	0,66	0,57	0,51	0,46	0,47	0,58	0,38	65,54
24	- *	- *	- *	- *	- *	- *	- *	- *	- *	-	-

* Concentrações plasmáticas < 0,4 µg/mL (LQ); ^a Média, µg/mL; ^b Desvio padrão; ^c Coeficiente de variação, %.

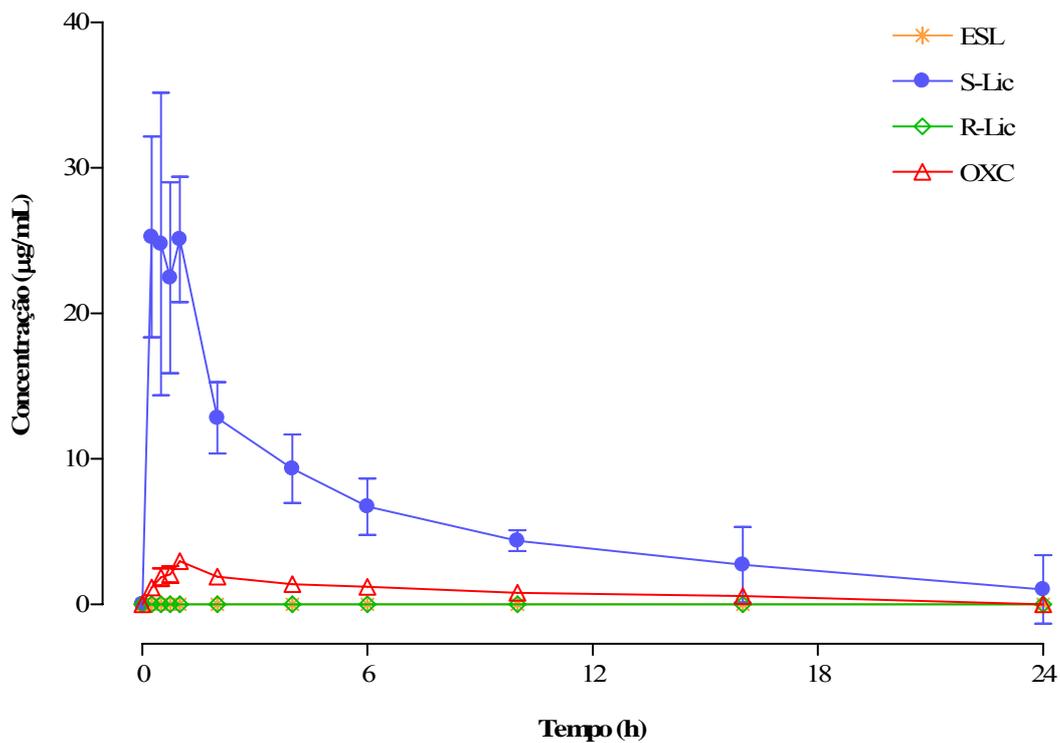


Figura V.1 – Perfis plasmáticos concentração-tempo obtidos para o ESL, S-Lic, R-Lic e OXC, em murganhos, após a administração oral de uma dose única de 350 mg/kg de ESL. Os símbolos representam a média±desvio padrão de 8 determinações por ponto do tempo (n = 8).

Para melhor visualizar a relação existente entre as concentrações plasmáticas dos metabolitos S-Lic e OXC, as razões entre as concentrações médias correspondentes foram calculadas e representadas graficamente em função do tempo (figura V.2).

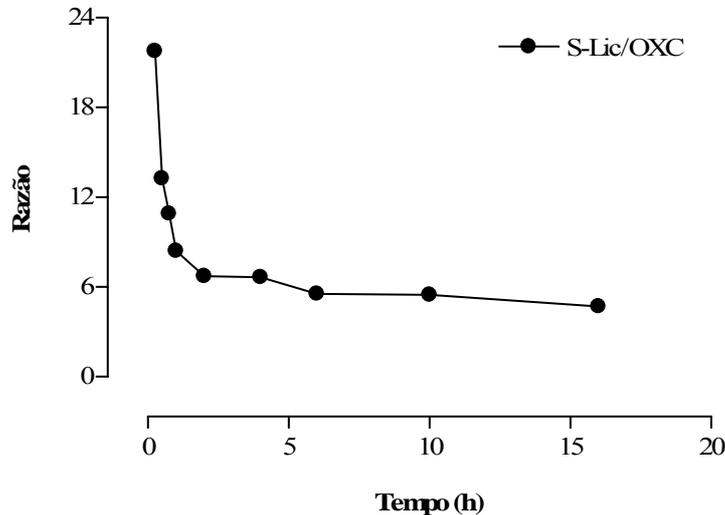


Figura V.2 – Evolução em função do tempo das razões entre as concentrações plasmáticas de S-Lic e OXC, em murganhos, após a administração oral de uma dose única de 350 mg/kg de ESL. O símbolo representa a razão entre as médias de 8 determinações por ponto do tempo (n = 8).

3.1.1.1 – Análise farmacocinética

As concentrações plasmáticas médias obtidas, em função do tempo, para o ESL e para os seus metabolitos foram sujeitas a uma análise cinética não-compartimental. Os parâmetros farmacocinéticos estimados apresentam-se na tabela V.2. Pelo facto de as concentrações plasmáticas correspondentes ao pró-fármaco administrado (ESL) e ao metabolito R-Lic ter sido encontradas em níveis não quantificáveis pelo método analítico usado, apenas foi possível estimar os parâmetros farmacocinéticos relativos aos metabolitos S-Lic e OXC.

Tabela V.2 – Parâmetros farmacocinéticos plasmáticos do ESL e dos seus metabolitos S-Lic, R-Lic e OXC obtidos em murganhos após a administração oral de uma dose única de 350 mg/kg de ESL.

Parâmetros	ESL	S-Lic	R-Lic	OXC
t _{max} (h)	ND	0,25	ND	1,00
C _{max} (µg/mL)	ND	25,25	ND	2,98
AUC _{0-t} (µg.h/mL)	NC	136,87	NC	18,14
AUC _{0-∞} (µg.h/mL)	NC	146,51	NC	25,84
t _{1/2} (h)	NC	6,54	NC	9,24
MRT (h)	NC	8,21	NC	12,90

ND, não disponível; NC, não calculado.

3.1.2 – Biodisposição no cérebro

As concentrações cerebrais do ESL e dos seus metabolitos S-Lic, R-Lic e OXC foram avaliadas em murganhos, durante um período de 24 h, após a administração por via oral de uma dose única de 350 mg/kg de ESL, sob a forma de uma suspensão aquosa de CMC. O método analítico usado não possibilitou a determinação quantitativa das concentrações do ESL e do metabolito R-Lic (< 0,4 µg/g). As concentrações determinadas no cérebro para os metabolitos S-Lic e OXC são apresentadas na tabela V.3. Na figura V.3 estão representados os perfis cerebrais médios concentração-tempo obtidos para o ESL, S-Lic, R-Lic e OXC.

Tabela V.3 – Concentrações cerebrais em murganhos após a administração oral de uma dose única de 350 mg/kg de ESL (n = 8): (A) S-Lic e (B) OXC.

(A)

Tempo (h)	Murganho								M ^a	DP ^b	CV ^c
	1	2	3	4	5	6	7	8			
0,25	1,57	2,66	3,12	0,50	2,52	3,64	1,93	2,71	2,33	0,98	42,02
0,50	3,15	2,36	5,24	5,91	8,40	6,31	5,08	2,14	4,82	2,15	44,66
0,75	7,58	5,51	7,44	8,33	11,60	10,14	6,26	6,16	7,88	2,09	26,56
1	15,40	20,66	11,78	10,63	12,83	11,86	9,54	12,33	13,13	3,49	26,57
2	5,78	5,19	4,01	1,78	5,87	5,71	4,81	4,16	4,66	1,37	29,32
4	4,64	2,36	2,13	4,28	4,30	4,24	6,14	2,27	3,80	1,42	37,34
6	1,78	1,95	2,48	1,12	1,76	2,42	1,04	1,76	1,79	0,52	29,22
10	1,28	1,24	1,19	2,30	1,23	0,91	1,32	0,80	1,28	0,45	35,10
16	1,79	0,65	- *	0,71	0,53	- *	0,42	0,71	0,60	0,56	93,24
24	- *	- *	- *	- *	- *	- *	- *	- *	- *	-	-

* Concentrações cerebrais < 0,4 µg/g (LQ); ^a Média, µg/g; ^b Desvio padrão; ^c Coeficiente de variação, %.

(B)

Tempo (h)	Murganho								M ^a	DP ^b	CV ^c
	1	2	3	4	5	6	7	8			
0,25	- *	0,69	0,93	- *	0,59	0,74	- *	0,62	0,45	0,38	85,87
0,50	0,95	0,51	1,05	1,28	1,62	1,55	1,37	0,61	1,12	0,41	36,88
0,75	1,58	1,00	1,45	2,02	1,84	2,28	1,14	1,10	1,55	0,47	30,06
1	2,97	4,86	2,76	2,55	2,71	3,15	2,56	3,37	3,12	0,76	24,41
2	1,51	1,14	0,81	0,43	1,29	1,43	1,30	1,23	1,14	0,36	31,21
4	1,27	0,49	0,50	1,29	0,91	0,92	1,48	0,68	0,94	0,38	39,86
6	0,52	0,51	0,62	- *	0,61	0,74	- *	0,54	0,44	0,28	63,90
10	- *	- *	- *	- *	- *	- *	- *	- *	- *	-	-
16	- *	- *	- *	- *	- *	- *	- *	- *	- *	-	-
24	- *	- *	- *	- *	- *	- *	- *	- *	- *	-	-

* Concentrações cerebrais < 0,4 µg/g (LQ); ^a Média, µg/g; ^b Desvio padrão; ^c Coeficiente de variação, %.

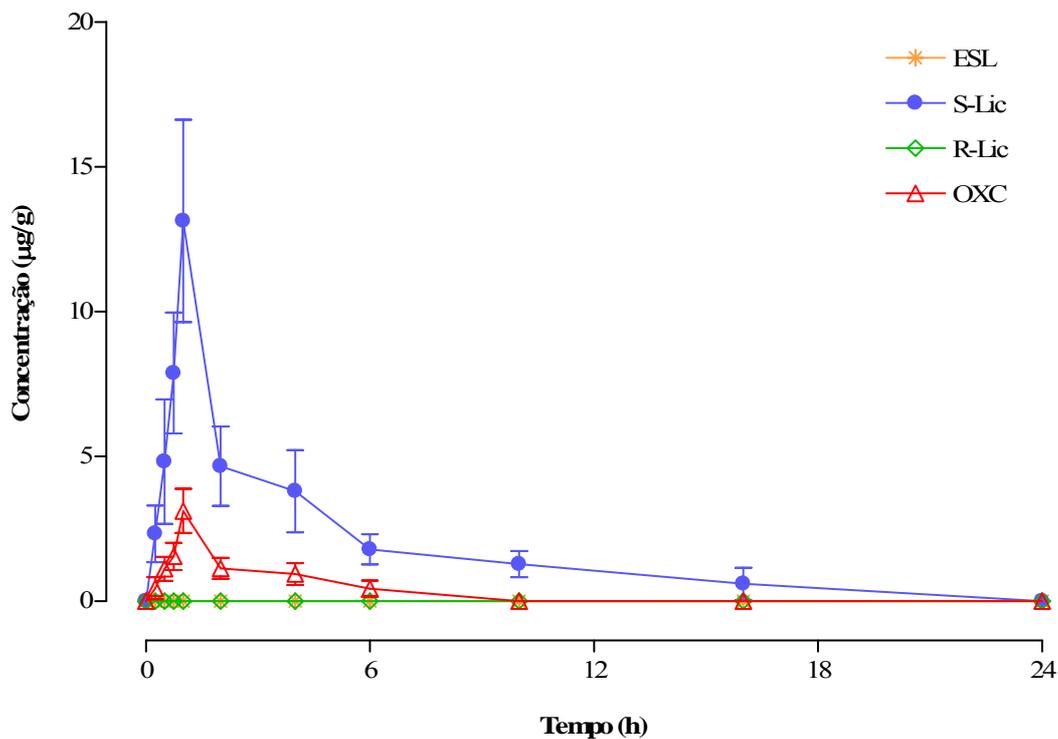


Figura V.3 – Perfis cerebrais concentração-tempo obtidos para o ESL, S-Lic, R-Lic e OXC, em murganhos, após a administração oral de uma dose única de 350 mg/kg de ESL. Os símbolos representam a média±desvio padrão de 8 determinações por ponto do tempo (n = 8).

Para melhor interpretar a relação entre as concentrações dos metabolitos S-Lic e OXC no cérebro, as razões entre as concentrações médias correspondentes foram calculadas e representadas graficamente em função do tempo (figura V.4).

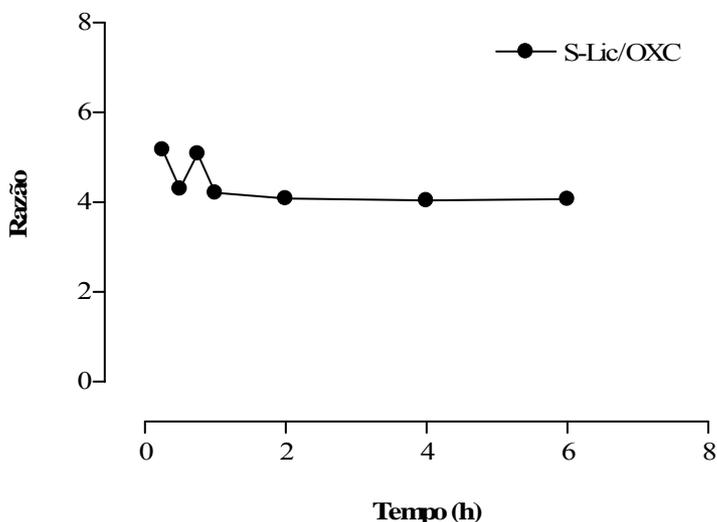


Figura V.4 – Evolução em função do tempo das razões entre as concentrações cerebrais de S-Lic e OXC, em murganhos, após a administração oral de uma dose única de 350 mg/kg de ESL. O símbolo representa a razão entre as médias de 8 determinações por ponto do tempo ($n = 8$).

3.1.2.1 – Análise farmacocinética

As concentrações cerebrais médias obtidas, em função do tempo, para o ESL e para os seus metabolitos foram submetidas a uma análise cinética não-compartmental. Os parâmetros farmacocinéticos estimados apresentam-se na tabela V.4. As concentrações cerebrais correspondentes ao ESL e ao metabolito R-Lic encontravam-se em valores não mensuráveis, pelo que apenas foi possível estimar os parâmetros farmacocinéticos referentes aos metabolitos S-Lic e OXC.

Tabela V.4 – Parâmetros farmacocinéticos cerebrais do ESL e dos seus metabolitos S-Lic, R-Lic e OXC obtidos em murganhos após a administração oral de uma dose única de 350 mg/kg de ESL.

Parâmetros	ESL	S-Lic	R-Lic	OXC
t _{max} (h)	ND	1,00	ND	1,00
C _{max} (µg/g)	ND	13,13	ND	3,12
AUC _{0-t} (µg.h/g)	NC	40,13	NC	6,76
AUC _{0-∞} (µg.h/g)	NC	45,61	NC	8,07
t _{1/2} (h)	NC	6,30	NC	2,04
MRT (h)	NC	6,96	NC	3,43

ND, não disponível; NC, não calculado.

3.1.3 – Biodisposição no fígado

As concentrações hepáticas do ESL e dos seus metabolitos S-Lic, R-Lic e OXC foram avaliadas em murganhos, durante um período de 24 h, após a administração por via oral de uma dose única de 350 mg/kg de ESL, sob a forma de uma suspensão aquosa de CMC. As concentrações do ESL e do metabolito R-Lic foram encontradas em valores BLQ em todos os pontos experimentais (< 0,4 µg/g). As concentrações determinadas no fígado para os metabolitos S-Lic e OXC são apresentadas na tabela V.5. Na figura V.5 estão representados os perfis hepáticos médios concentração-tempo obtidos para o ESL, S-Lic, R-Lic e OXC.

Tabela V.5 – Concentrações hepáticas em murganhos após a administração oral de uma dose única de 350 mg/kg de ESL (n = 8): (A) S-Lic e (B) OXC.

(A)

Tempo (h)	Murganho								M ^a	DP ^b	CV ^c
	1	2	3	4	5	6	7	8			
0,25	22,21	28,50	36,98	12,82	37,57	43,60	51,83	47,99	35,19	13,28	37,73
0,50	23,52	16,90	35,32	43,39	64,35	59,82	31,03	30,60	38,12	16,75	43,95
0,75	49,34	35,96	37,25	44,83	29,68	34,42	37,37	27,30	37,02	7,26	19,62
1	33,22	58,49	57,89	42,44	48,94	40,78	29,54	41,93	44,15	10,48	23,75
2	23,37	25,75	19,19	11,97	19,36	21,62	21,60	26,61	21,18	4,59	21,68
4	17,03	10,20	7,00	18,02	15,84	17,34	21,93	10,37	14,72	5,00	34,00
6	12,83	9,32	12,75	6,06	7,34	9,17	5,07	11,55	9,26	2,97	32,05
10	4,84	4,13	5,12	6,14	5,19	4,64	4,99	3,36	4,80	0,81	16,95
16	13,04	3,27	1,27	2,72	3,74	0,70	1,91	3,22	3,73	3,90	104,57
24	0,53	- *	- *	6,22	- *	- *	1,08	- *	0,98	2,15	220,06

* Concentrações hepáticas < 0,4 µg/g (LQ); ^a Média, µg/g; ^b Desvio padrão; ^c Coeficiente de variação, %.

(B)

Tempo (h)	Murganho								M ^a	DP ^b	CV ^c
	1	2	3	4	5	6	7	8			
0,25	1,08	2,66	2,67	0,96	2,05	3,64	1,24	3,12	2,18	1,01	46,20
0,50	2,33	1,51	2,67	3,65	3,17	2,33	1,53	1,98	2,40	0,75	31,40
0,75	1,13	1,07	1,64	1,70	1,92	1,39	0,99	0,62	1,31	0,43	33,06
1	1,04	1,81	1,76	2,17	1,07	1,18	0,86	1,90	1,47	0,49	33,20
2	3,87	1,71	1,47	1,46	3,06	2,35	2,15	2,10	2,27	0,83	36,62
4	1,40	0,76	1,18	2,03	0,78	1,00	1,15	1,41	1,21	0,41	33,89
6	0,61	0,66	1,03	0,73	1,08	0,72	0,40	0,60	0,73	0,23	31,02
10	0,59	0,50	0,46	1,35	0,56	0,65	0,41	0,47	0,62	0,30	48,66
16	- *	- *	- *	- *	- *	- *	- *	- *	- *	-	-
24	- *	- *	- *	- *	- *	- *	- *	- *	- *	-	-

* Concentrações hepáticas < 0,4 µg/g (LQ); ^a Média, µg/g; ^b Desvio padrão; ^c Coeficiente de variação, %.

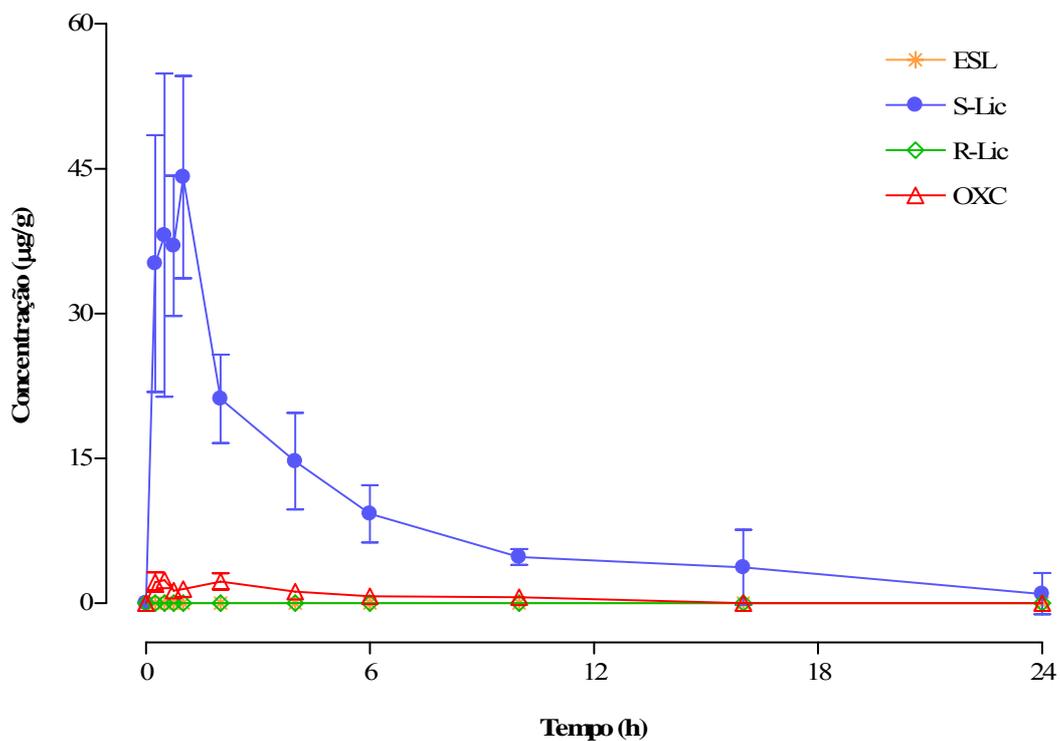


Figura V.5 – Perfis hepáticos concentração-tempo obtidos para o ESL, S-Lic, R-Lic e OXC, em murganhos, após a administração oral de uma dose única de 350 mg/kg de ESL. Os símbolos representam a média±desvio padrão de 8 determinações por ponto do tempo (n = 8).

Para melhor ilustrar a relação entre as concentrações dos metabolitos S-Lic e OXC no fígado, as razões entre as concentrações médias correspondentes foram calculadas e representadas graficamente em função do tempo (figura V.6).

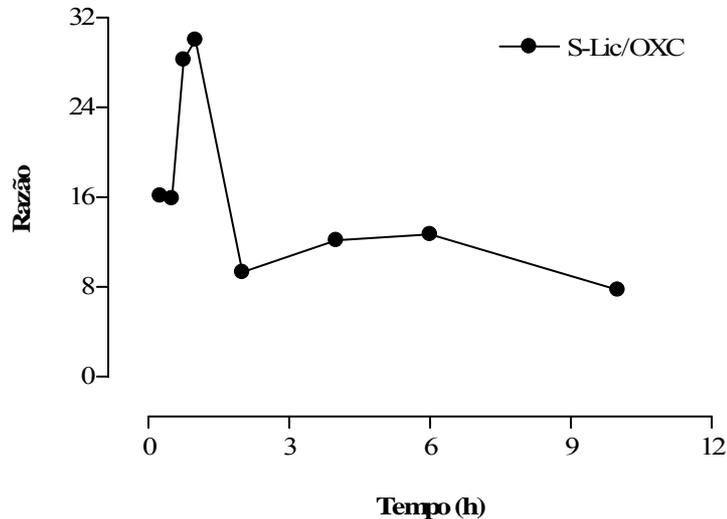


Figura V.6 – Evolução em função do tempo das razões entre as concentrações hepáticas de S-Lic e OXC, em murganhos, após a administração oral de uma dose única de 350 mg/kg de ESL. O símbolo representa a razão entre as médias de 8 determinações por ponto do tempo ($n = 8$).

3.1.3.1 – Análise farmacocinética

As concentrações hepáticas médias obtidas, em função do tempo, para o ESL e para os seus metabolitos foram submetidas a uma análise cinética não-compartimental. Os parâmetros farmacocinéticos estimados apresentam-se na tabela V.6. As concentrações hepáticas correspondentes ao ESL e ao metabolito R-Lic encontravam-se em níveis não mensuráveis, tendo sido estimados apenas os parâmetros farmacocinéticos relativos aos metabolitos S-Lic e OXC.

Tabela V.6 – Parâmetros farmacocinéticos hepáticos do ESL e dos seus metabolitos S-Lic, R-Lic e OXC obtidos em murganhos após a administração oral de uma dose única de 350 mg/kg de ESL.

Parâmetros	ESL	S-Lic	R-Lic	OXC
t_{\max} (h)	ND	1,00	ND	0,50
C_{\max} ($\mu\text{g/g}$)	ND	44,15	ND	2,40
AUC_{0-t} ($\mu\text{g.h/g}$)	NC	198,22	NC	11,65
$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g.h/g}$)	NC	205,71	NC	15,66
$t_{1/2}$ (h)	NC	5,30	NC	4,46
MRT (h)	NC	6,70	NC	6,70

ND, não disponível; NC, não calculado.

3.1.4 – Distribuição plasma-cérebro dos metabolitos S-Lic e OXC

Para tornar mais perceptível o fenómeno de distribuição plasma-cérebro dos metabolitos S-Lic e OXC produzidos no murganho após a administração oral de uma dose única de 350 mg/kg de ESL, os perfis plasmáticos e cerebrais correspondentes são apresentados conjuntamente na figura V.7.

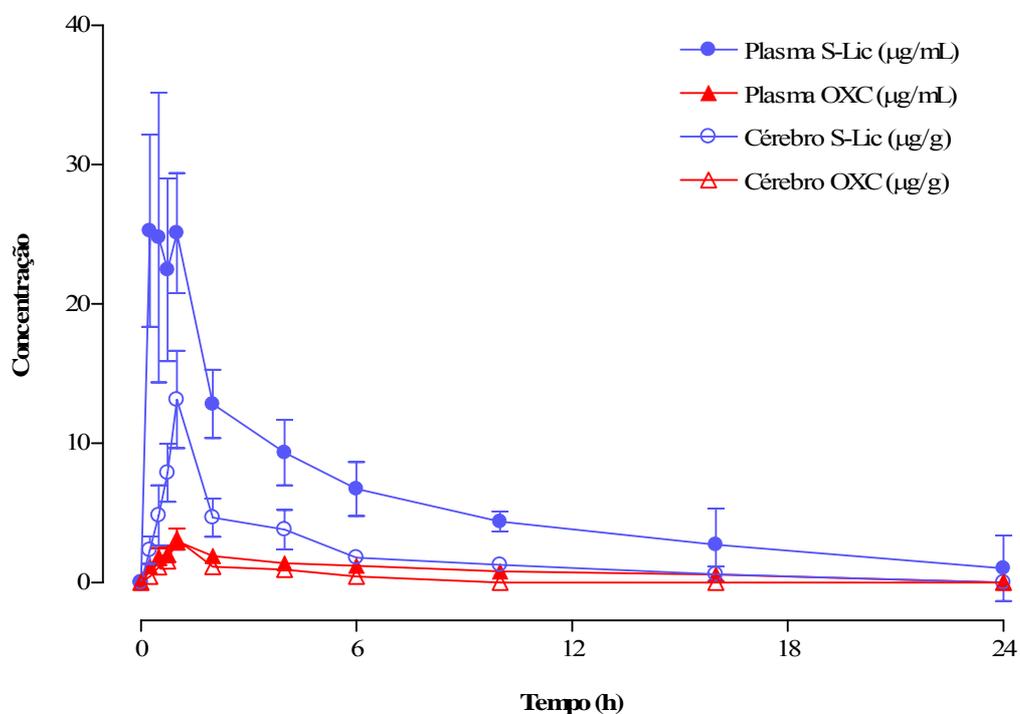


Figura V.7 – Perfis plasmáticos e cerebrais concentração-tempo obtidos para os metabolitos S-Lic e OXC, em murganhos, após a administração oral de uma dose única de 350 mg/kg de ESL. Os símbolos representam a média \pm desvio padrão de 8 determinações por ponto do tempo ($n = 8$).

Para avaliar a associação entre as concentrações plasmáticas e cerebrais obtidas para os metabolitos S-Lic e OXC, procedeu-se a análises de correlação e de regressão linear para diferentes intervalos de tempo. Os resultados decorrentes das análises efectuadas estão resumidos na tabela V.7.

Tabela V.7 – Análises de correlação (A) e de regressão linear (B) entre as concentrações plasmáticas e cerebrais médias obtidas para os metabolitos S-Lic e OXC, em murganhos, após a administração oral de uma dose única de 350 mg/kg de ESL.

(A)

Análise de Correlação				
S-Lic				
[0,25–24] h	[0,5–24] h	[0,75–24] h	[1–24] h	[2–24] h
r=0,719	r=0,868	r=0,968	r=0,989	r=0,986
p<0,05	p<0,01	p<0,0001	p<0,0001	p<0,001
OXC				
[0,25–10] h	[0,5–10] h	[0,75–10] h	[1–10] h	[2–10] h
r=0,979	r=0,978	r=0,984	r=0,985	r=0,951
p<0,0001	p<0,001	p<0,001	p<0,01	p<0,05

r, Coeficiente de correlação de Pearson.

(B)

Análise de Regressão Linear				
S-Lic				
[0,25–24] h	[0,5–24] h	[0,75–24] h	[1–24] h	[2–24] h
$C_c=0,286C_p+0,183$	$C_c=0,375C_p-0,340$	$C_c=0,480C_p-0,923$	$C_c=0,546C_p-1,23$	$C_c=0,413C_p-0,523$
$r^2=0,516$	$r^2=0,754$	$r^2=0,936$	$r^2=0,978$	$r^2=0,973$
OXC				
[0,25–10] h	[0,5–10] h	[0,75–10] h	[1–10] h	[2–10] h
$C_c=1,37C_p-1,20$	$C_c=1,38C_p-1,22$	$C_c=1,39C_p-1,20$	$C_c=1,41C_p-1,21$	$C_c=1,06C_p-0,779$
$r^2=0,959$	$r^2=0,957$	$r^2=0,968$	$r^2=0,970$	$r^2=0,905$

C_c , Concentração no cérebro ($\mu\text{g/g}$); C_p , Concentração no plasma ($\mu\text{g/mL}$); r^2 , Coeficiente de determinação.

Para averiguar a presença de diferenças na velocidade e na extensão de distribuição dos metabolitos S-Lic e OXC para o tecido alvo (cérebro), as razões cérebro/plasma para os parâmetros farmacocinéticos C_{\max} e $AUC_{0-\infty}$ foram calculadas e estão representadas na figura V.8.

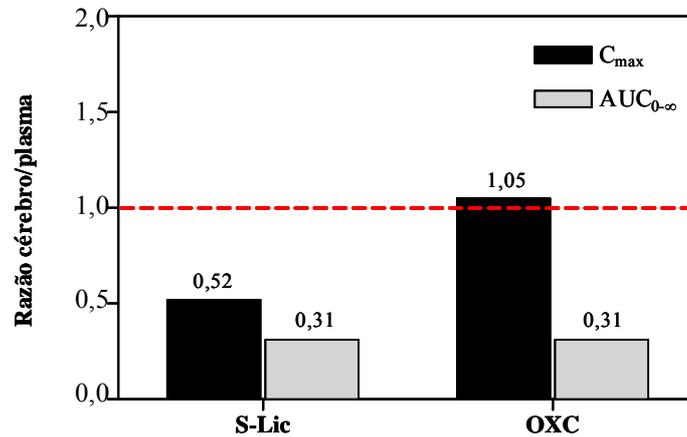


Figura V.8 – Razões cérebro/plasma obtidas para os metabolitos S-Lic e OXC em função dos valores estimados para os parâmetros farmacocinéticos correspondentes C_{\max} e $AUC_{0-\infty}$, após a administração oral de uma dose única de 350 mg/kg de ESL em murganhos.

3.1.5 – Relação entre as concentrações hepáticas e plasmáticas para os metabolitos S-Lic e OXC

Para melhor ilustrar a relação entre as concentrações hepáticas e plasmáticas dos metabolitos S-Lic e OXC formados no murganho após a administração oral de uma dose única de 350 mg/kg de ESL, os perfis correspondentes são apresentados conjuntamente na figura V.9.

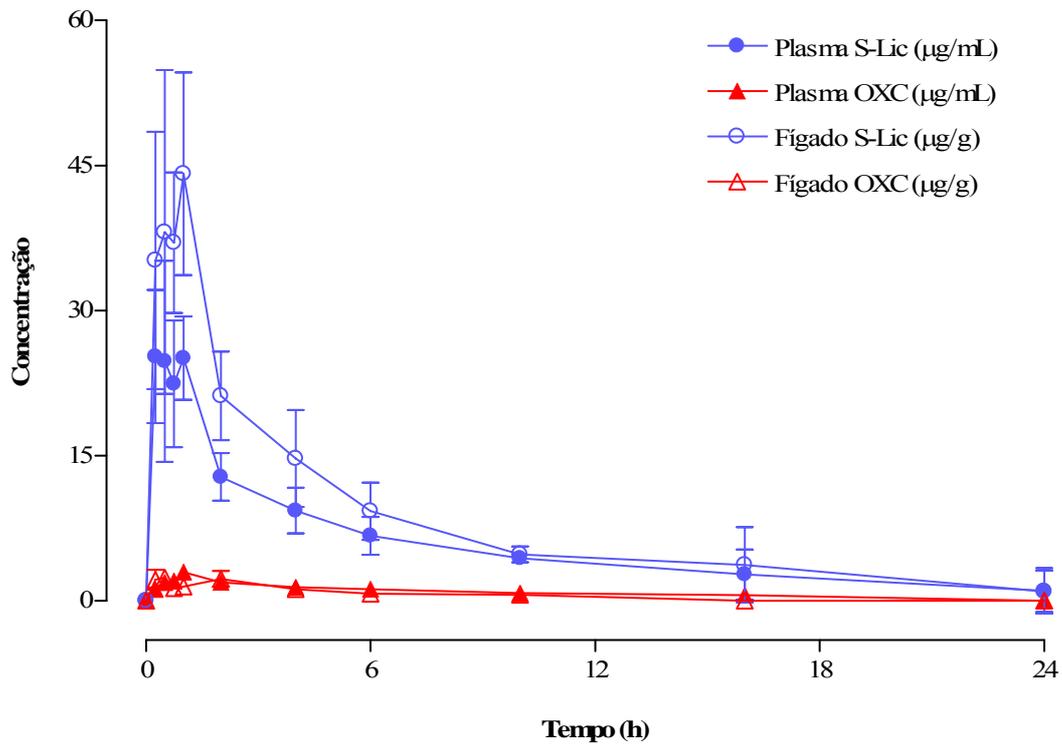


Figura V.9 – Perfis hepáticos e plasmáticos concentração-tempo obtidos para os metabolitos S-Lic e OXC, em murganhos, após a administração oral de uma dose única de 350 mg/kg de ESL. Os símbolos representam a média±desvio padrão de 8 determinações por ponto do tempo (n = 8).

Para estudar a associação entre as concentrações plasmáticas e hepáticas obtidas para os metabolitos S-Lic e OXC, procedeu-se a análises de correlação e de regressão linear para diferentes intervalos de tempo. Os resultados decorrentes das análises realizadas estão resumidos na tabela V.8.

Tabela V.8 – Análises de correlação (A) e de regressão linear (B) entre as concentrações plasmáticas e hepáticas médias obtidas para os metabolitos S-Lic e OXC, em murganhos, após a administração oral de uma dose única de 350 mg/kg de ESL.

(A)

Análise de Correlação				
S-Lic				
[0,25–24] h	[0,5–24] h	[0,75–24] h	[1–24] h	[2–24] h
r=0,989	r=0,996	r=0,998	r=0,998	r=0,994
p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001
OXC				
[0,25–16] h	[0,5–16] h	[0,75–16] h	[1–16] h	[2–16] h
r=0,534	r=0,671	r=0,726	r=0,722	r=0,968
p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	P<0,01

r, Coeficiente de correlação de Pearson.

(B)

Análise de Regressão Linear				
S-Lic				
[0,25–24] h	[0,5–24] h	[0,75–24] h	[1–24] h	[2–24] h
$C_f=1,63C_p-0,959$	$C_f=1,71C_p-1,46$	$C_f=1,78C_p-1,87$	$C_f=1,82C_p-2,04$	$C_f=1,73C_p-1,55$
$r^2=0,979$	$r^2=0,992$	$r^2=0,996$	$r^2=0,997$	$r^2=0,988$
OXC				
[0,25–16] h	[0,5–16] h	[0,75–16] h	[1–16] h	[2–16] h
$C_f=0,597C_p+0,428$	$C_f=0,709C_p+0,116$	$C_f=0,637C_p+0,092$	$C_f=0,651C_p+0,086$	$C_f=1,57C_p-0,891$
$r^2=0,285$	$r^2=0,450$	$r^2=0,527$	$r^2=0,521$	$r^2=0,938$

C_f , Concentração no fígado ($\mu\text{g/g}$); C_p , Concentração no plasma ($\mu\text{g/mL}$); r^2 , Coeficiente de determinação.

Para demonstrar a disposição diferencial no fígado e no plasma dos metabolitos S-Lic e OXC, as razões fígado/plasma correspondentes foram determinadas recorrendo aos valores dos parâmetros farmacocinéticos C_{\max} e $AUC_{0-\infty}$ e são apresentadas na figura V.10.

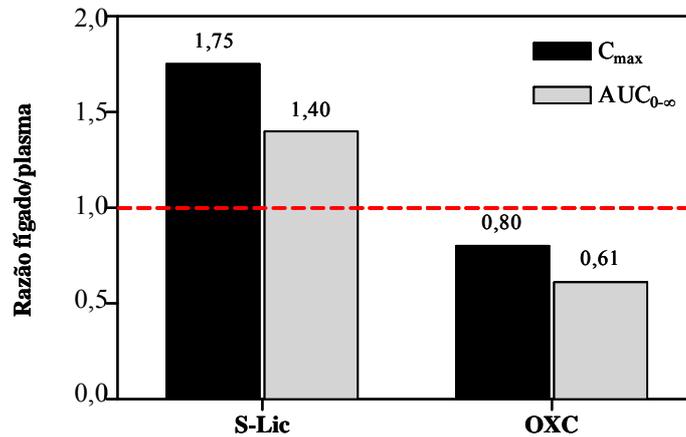


Figura V.10 – Razões hepáticas/plasmáticas obtidas para os metabolitos S-Lic e OXC em função dos valores estimados para os parâmetros farmacocinéticos correspondentes C_{\max} e $AUC_{0-\infty}$, após a administração oral de uma dose única de 350 mg/kg de ESL em murganhos.

4. DISCUSSÃO

O ESL é um composto promissor seleccionado, entre uma série de moléculas relacionadas estruturalmente com a CBZ e a OXC, pela elevada actividade anticonvulsivante e reduzida neurotoxicidade demonstrada em ratos e, presentemente, encontra-se em fase final de desenvolvimento clínico. Desta forma parece evidente que, apesar do aparecimento crescente de inúmeros modelos *in silico* e *in vitro* para apoiar o *screening* de novas moléculas com potencial farmacológico (YAMASHITA e HASHIDA, 2004; BROWN *et al.*, 2006), os modelos *in vivo* continuam a ser alvo de interesse não apenas na fase de desenvolvimento pré-clínico (ROFFEY *et al.*, 2003), mas também no processo de descoberta de novos fármacos. Além disso, os ensaios experimentais em animais de laboratório acompanham, geralmente, todas as fases de desenvolvimento clínico, pois, muitas vezes, devido aos aspectos de natureza ética e de exequibilidade, determinados estudos não podem ser realizados no homem, constituindo boas aproximações a utilização de modelos animais adequados.

4.1 – Farmacocinética do ESL no Murganho

Este estudo foi delineado, concretamente, para investigar a farmacocinética do ESL no murganho e caracterizar a biodisposição dos seus metabolitos. A escolha desta espécie animal deveu-se aos dados previamente publicados por HAINZL e colaboradores (2001), os quais testemunham, claramente, que o metabolismo do ESL é dependente da espécie e as reacções de biotransformação do ESL no murganho parecem aproximar-se mais das que ocorrem no homem, ou seja, hidrólise rápida ao enantiómero S-Lic e formação de OXC e R-Lic em pequenas quantidades (ALMEIDA e SOARES-DA-SILVA, 2003 e 2004; ALMEIDA *et al.* 2005). Em adição, os murganhos apresentam vantagens consideráveis em termos de manutenção e manuseamento, sendo, por isso, a espécie animal vertebrada mais amplamente utilizada na investigação e no ensino biomédico (VAN ZUTPHEN, 2003). Por outro lado, para assegurar a maturação de todos os sistemas biológicos e para evitar quaisquer interferências hormonais, com eventuais repercussões farmacocinéticas, foram usados murganhos adultos machos em todos os ensaios realizados.

No desenho experimental deste trabalho de investigação o bem-estar animal foi também considerado de forma a minimizar o sofrimento induzido nos murganhos e a garantir a qualidade dos próprios resultados. Neste contexto, os murganhos tiveram livre acesso a água e alimento, excepto durante o instante em que se procedeu à administração da suspensão de fármaco. Contrariamente ao que é habitual perante a administração oral de fármacos, não foi instituído, neste caso, nenhum período de jejum prévio ao tratamento. Esta decisão foi tomada atendendo, por um lado, ao bem-estar animal e, por outro, ao facto de a presença de alimentos não influenciar o perfil farmacocinético do ESL no homem (MAIA *et al.*, 2005). A colheita das amostras de sangue, do cérebro e do fígado implicou, inevitavelmente, o sacrifício dos murganhos. Para se proceder à eutanásia recorreu-se ao método deslocamento cervical seguido de imediata exsanguinação. Este é um método físico extremamente rápido e indolor se executado por pessoal treinado, sendo aceitável a sua aplicação em murganhos e em outros pequenos animais de laboratório sem a indução de qualquer tipo de anestesia (HELLEBREKERS, BOOIJ e FLECKNELL, 2003). O deslocamento cervical seguido de imediata exsanguinação possibilitou a recolha de quantidades aceitáveis de sangue, minimizando o sofrimento animal e evitando a administração de anestésicos, os quais poderiam influenciar a farmacocinética do ESL e interferir com a técnica analítica de LC-UV.

Perante a inviabilidade de estudar a evolução em função do tempo das concentrações do ESL e dos seus metabolitos em todos os tecidos de murganho, as matrizes consideradas foram aquelas de maior interesse para a caracterização da farmacocinética do ESL. O cérebro é, desde logo, o alvo terapêutico do ESL ou dos seus metabolitos activos e a quantificação destes compostos no cérebro e no plasma permitirá conhecer a relação entre as concentrações cerebrais e plasmáticas e até relacionar essas concentrações com o efeito farmacológico. O fígado, por sua vez, é o principal órgão de metabolização, de tal forma que a determinação das concentrações hepáticas permitirá identificar as principais vias metabólicas e avaliar a influência do fígado na disposição sistémica do ESL.

Os dados farmacocinéticos apresentados e discutidos neste capítulo são relativos a séries de experiências em que uma dose única de ESL (350 mg/kg) foi administrada por via oral a grupos de 8 murganhos. A selecção da dose de ESL a administrar aos murganhos não foi aleatória, mas antes apoiada em informação prévia que indicou a ausência de toxicidade e uma exposição sistémica ao metabolito activo (Lic)

comparável com aquela que ocorre no homem após tratamento com doses terapêuticas. A margem terapêutica definida para a Lic, metabolito activo da OXC e do ESL, tem sido estabelecida no intervalo de 8-35 µg/mL de plasma, embora alguns autores considerem mais apropriada a gama de concentrações plasmáticas de 15-35 µg/mL. Todavia, acima de 30 µg/mL já foram relatados efeitos adversos (MAY, KORN-MERKER e RAMBECK, 2003). De facto, pela administração oral de uma dose única de 350 mg/kg de ESL em murganhos, as concentrações plasmáticas de Lic (ou do enantiómero S-Lic) permaneceram dentro da margem terapêutica definida para o homem para além das primeiras 4 h pós-dose.

4.1.1 – Biodisposição no plasma

Da análise das concentrações plasmáticas obtidas em murganhos após a administração oral de uma dose única de 350 mg/kg de ESL pode constatar-se que, *in vivo*, nesta espécie animal, o pró-fármaco ESL é rápida e extensamente metabolizado, pois, em nenhum momento, mesmo aos tempos pós-dose mais curtos, foi possível quantificá-lo no plasma com a técnica analítica de LC-UV usada (figura V.1). Assim, as concentrações de ESL atingidas no plasma encontravam-se em valores inferiores a 0,4 µg/mL (LQ). Estes resultados estão em conformidade com os dados obtidos em ratos, murganhos e coelhos após a administração oral de ESL (20 mg/kg), nos quais o composto administrado não foi detectado mesmo recorrendo a uma técnica analítica de LC-MS com um LQ de 0,017 µg/mL (HAINZL, PARADA e SOARES-DA-SILVA, 2001). Da mesma forma, mediante a administração oral ao homem de doses de ESL compreendidas entre 20 e 1200 mg, as concentrações plasmáticas correspondentes apresentam-se, geralmente, em valores não mensuráveis e inferiores a 0,05 µg/mL (LQ) (ALMEIDA e SOARES-DA-SILVA, 2003 e 2004; ALMEIDA *et al.*, 2005; ELGER *et al.*, 2007). Ao investigar a farmacocinética do ESL em indivíduos com insuficiência hepática moderada verificou-se que as concentrações plasmáticas do pró-fármaco administrado (ESL) foram mensuráveis em seis ($C_{max} = 0,415 \mu\text{g/mL}$; $n = 6$) de oito doentes, enquanto que isso só aconteceu em um indivíduo do grupo controlo ($C_{max} = 0,166 \mu\text{g/mL}$; $n = 1$). Estes resultados sugerem que o fígado contribui para a metabolização do ESL e que o seu metabolismo pré-sistémico está ligeiramente diminuído na presença de insuficiência hepática. Todavia, a hidrólise do ESL em S-Lic

durante a primeira passagem não é dependente do fígado, pois, não foram observadas diferenças nos perfis concentração-tempo do ESL e do enantiómero S-Lic em doentes com ou sem *shunt* porto-sistémico (ALMEIDA *et al.*, 2008). De facto, estudos *in vitro* demonstraram que a hidrólise do ESL é não-enzimática e pode ser detectada quase instantaneamente no plasma de rato (HAINZL, PARADA e SOARES-DA-SILVA, 2001).

Pela observação dos perfis plasmáticos médios concentração-tempo resultantes da disposição oral do ESL no murganho é evidente que os metabolitos apresentados no plasma em quantidades mensuráveis foram o enantiómero S-Lic e a OXC, aparecendo o enantiómero R-Lic em concentrações inferiores a 0,4 µg/mL (LQ). Ao comparar os perfis obtidos, facilmente se reconhece que o enantiómero S-Lic é o principal metabolito plasmático (figura V.1). Esta afirmação é também apoiada pelos valores largamente superiores à unidade encontrados para as razões entre as concentrações plasmáticas médias de S-Lic e OXC, calculadas para todos os pontos experimentais em que foi possível a quantificação simultânea de ambos os metabolitos, atingindo valores superiores a 21 aos 15 min e superiores a 4 às 16 h. Ao considerar, globalmente, a evolução em função do tempo das razões entre as concentrações plasmáticas de S-Lic e OXC é indiscutível a existência de um perfil bifásico, caracterizado por um declínio abrupto até à 1 h seguindo-se um decréscimo gradual (figura V.2). Estes resultados revelam que o sistema entrou em equilíbrio 1 h após a administração do ESL, pois, a partir desse momento a relação entre as concentrações plasmáticas dos metabolitos formados manteve-se aproximadamente constante.

Mediante a administração oral de uma dose única de 350 mg/kg de ESL, sob a forma de uma suspensão aquosa de CMC, as concentrações plasmáticas máximas de S-Lic (25,25 µg/mL) foram obtidas aos 15 min (t_{max}), o que é indicador de uma pronta incorporação do ESL a partir do tracto gastrointestinal do murganho e de rápida hidrólise ao seu principal metabolito activo (S-Lic). HAINZL e colaboradores (2001) sugerem que a desacetilação do pró-fármaco ESL ao enantiómero S-Lic pode mesmo ocorrer no tracto gastrointestinal durante o processo de absorção. No que respeita à OXC, as concentrações plasmáticas máximas (2,98 µg/mL) foram alcançadas mais tardiamente (1 h), ocorrendo um deslocamento do t_{max} para a direita relativamente ao enantiómero S-Lic. Ao considerar os parâmetros farmacocinéticos C_{max} e $AUC_{0-\infty}$, os valores para as razões plasmáticas S-Lic/OXC foram respectivamente de 8,47 e 5,67. Atendendo ao parâmetro $AUC_{0-\infty}$, o metabolito S-Lic foi responsável por

aproximadamente 85% da exposição sistémica total ao fármaco enquanto a OXC representou cerca de 15%. A $t_{1/2}$ e o MRT estimados apresentaram os valores de 6,54 h e 8,21 h para o metabolito S-Lic e de 9,24 h e 12,90 h para a OXC.

A análise conjunta dos dados farmacocinéticos obtidos no plasma revela que o ESL é absorvido prontamente pela administração oral ao murganho e rapidamente convertido ao enantiómero S-Lic, mantendo a sua estereoquímica. Por sua vez, o enantiómero S-Lic formado parece ser parcialmente oxidado a OXC. Esta ideia é apoiada pela ausência de concentrações mensuráveis do pró-fármaco administrado desde o primeiro tempo de amostragem e pelo deslocamento para a direita do t_{max} plasmático da OXC (1 h) em relação ao observado para o enantiómero S-Lic (0,25 h). Além disso, os parâmetros farmacocinéticos $t_{1/2}$ e MRT estimados apresentaram valores mais elevados para a OXC que para o enantiómero S-Lic (tabela V.2). No entanto, os resultados obtidos não permitem elucidar qual a origem das concentrações residuais do enantiómero R-Lic detectado no plasma.

4.1.2 – Biodisposição no cérebro

Como sucede com outros fármacos com actividade no SNC, o ESL ou os seus metabolitos activos necessitam de transpor a barreira BHE e de atingir determinadas concentrações no tecido cerebral (biofase) para exercerem a acção terapêutica pretendida. Portanto, o estudo da cinética cerebral do ESL e dos seus metabolitos constitui, neste contexto, um aspecto de grande interesse.

A observação dos perfis cerebrais médios concentração-tempo obtidos em murganhos após a administração oral de uma dose única de 350 mg/kg de ESL mostra que apenas foi possível quantificar os metabolitos S-Lic e OXC no tecido cerebral (figura V.3). Consequentemente, a exposição cerebral ao composto administrado (ESL) e ao metabolito R-Lic foi residual e sempre em concentrações inferiores a 0,4 µg/g (LQ). Estes resultados estão de acordo com o esperado, pois, já no plasma tinham sido encontradas concentrações mensuráveis apenas para os metabolitos S-Lic e OXC. Ao comparar a evolução em função do tempo das concentrações cerebrais médias de S-Lic e OXC parece evidente que o enantiómero S-Lic é o principal metabolito responsável pela exposição cerebral (figura V.3). De facto, ao relacionar as concentrações cerebrais médias de S-Lic e OXC obtidas em função do tempo constata-se que as razões

respectivas são superiores à unidade, em todos os pontos experimentais em que foi possível quantificar simultaneamente os dois metabolitos. No cérebro, contrariamente ao evidenciado no plasma, os valores calculados para as razões entre as concentrações médias de S-Lic e OXC mostraram uma elevada consistência, variando aproximadamente entre 4 e 5 (figura V.4). Em conformidade com o observado no plasma, as razões cerebrais entre as concentrações médias dos metabolitos S-Lic e OXC também se apresentaram sensivelmente estáveis a partir da 1 h pós-dose, sugerindo que o equilíbrio no compartimento cerebral é alcançado a partir daquele momento, reflectindo o equilíbrio do sistema (1 h).

Pela análise cinética não-compartimental dos perfis cerebrais médios concentração-tempo obtidos para os metabolitos S-Lic e OXC, após a administração oral de uma dose única de 350 mg/kg de ESL em murganhos, constatou-se que as concentrações cerebrais máximas de S-Lic (13,13 $\mu\text{g/g}$) e de OXC (3,12 $\mu\text{g/g}$) foram atingidas à 1 h (t_{max}). Atendendo aos parâmetros C_{max} e $\text{AUC}_{0-\infty}$, os valores para as razões cerebrais S-Lic/OXC foram, respectivamente, de 4,21 e 5,65. Assim, considerando o parâmetro farmacocinético $\text{AUC}_{0-\infty}$, o enantiómero S-Lic foi responsável por 85% da exposição cerebral total ao fármaco enquanto a OXC representou aproximadamente 15%. A $t_{1/2}$ e o MRT estimados apresentaram os valores de 6,30 h e 6,96 h para o metabolito S-Lic e de 2,04 h e 3,43 h para a OXC, indicando que em resultado da biodisposição do ESL no murganho, o metabolito farmacologicamente activo (S-Lic) permanece na biofase, na sua forma inalterada, durante mais tempo que a OXC (tabela V.4).

4.1.3 – Biodisposição no fígado

Ao observar a evolução em função do tempo das concentrações hepáticas do ESL e dos seus metabolitos em murganhos, após a administração oral de uma dose única de 350 mg/kg de ESL, reconhece-se que o enantiómero S-Lic é o principal composto encontrado no fígado, aparecendo a OXC como um metabolito *minor* (figura V.5). De facto, as razões entre as concentrações hepáticas médias de S-Lic e OXC estimadas atingiram um valor superior a 30 à 1 h e mantiveram-se em valores maiores que 7 às 10 h (figura V.6). Tal como nas matrizes biológicas previamente examinadas,

também no fígado as concentrações do pró-fármaco administrado (ESL) e do metabolito R-Lic foram encontradas em níveis não mensuráveis em todos os pontos de amostragem estudados. Portanto, as concentrações hepáticas referentes a estes compostos apresentavam valores inferiores a 0,4 µg/g (LQ). Estes resultados confirmam que o ESL, quando administrado oralmente, é rápida e extensamente metabolizado no murganho, sofrendo uma extensa desacetilação pré-sistémica ao enantiómero S-Lic com preservação da estereoquímica. Por sua vez, a OXC formada deverá ter origem na oxidação parcial do enantiómero S-Lic. Todavia, com os resultados aqui obtidos permanece por esclarecer qual a origem das concentrações residuais do enantiómero R-Lic detectado após a administração oral do ESL ao murganho. No homem a OXC é reduzida enantioselectivamente aos enantiómeros S-Lic e R-Lic, representando o enantiómero R aproximadamente 20% (FLESCH *et al.*, 1992; VOLOSOV *et al.*, 1999; MAY, KORN-MERKER e RAMBECK, 2003). Assim, a OXC poderia ser apontada como o precursor do metabolito R-Lic detectado no murganho. Contudo, as concentrações baixas de OXC formadas pela disposição oral do ESL no murganho, associado ao facto de os murganhos serem incapazes de reduzir eficientemente a OXC (HAINZL, PARADA e SOARES-DA-SILVA, 2001), sugerem que o enantiómero R-Lic possa ser produzido por uma via metabólica diferente.

Mediante uma análise cinética não-compartimental dos perfis hepáticos médios concentração-tempo obtidos para os metabolitos S-Lic e OXC, após a administração oral de uma dose única de 350 mg/kg de ESL em murganhos, verificou-se que as concentrações máximas de S-Lic (44,15 µg/g) e de OXC (2,40 µg/g) foram alcançadas, respectivamente, à 1 h e 0,5 h pós-dose. Considerando os parâmetros farmacocinéticos C_{max} e $AUC_{0-\infty}$, os valores encontrados para as razões hepáticas S-Lic/OXC foram, respectivamente, de 18,40 e 13,14. Assim, atendendo ao parâmetro $AUC_{0-\infty}$, o enantiómero S-Lic foi responsável por 93% da exposição hepática total ao fármaco enquanto a OXC representou cerca de 7%. A $t_{1/2}$ e o MRT estimados apresentaram os valores de 5,30 h e 6,70 h para o metabolito S-Lic e de 4,46 h e 6,70 h para a OXC (tabela V.6).

4.1.4 – Distribuição plasma-cérebro dos metabolitos S-Lic e OXC

As moléculas dos fármacos depois de entrarem na circulação sistémica podem ser distribuídas pelos diferentes órgãos e tecidos do organismo. No entanto, a velocidade e a extensão de distribuição dos fármacos é muito variável, podendo influir múltiplos factores nas características de distribuição, entre eles, a taxa de perfusão sanguínea, a capacidade de transposição das membranas celulares e a ligação às proteínas plasmáticas e tecidulares. De um ponto de vista farmacocinético atribui-se particular importância à caracterização da distribuição de um fármaco ou dos seus metabolitos activos quando o efeito farmacológico é exercido num determinado tecido (tecido alvo). Assim, para a obtenção de informação fidedigna relativa ao processo de distribuição é requerido, para além da quantificação dos compostos de interesse no plasma, o correspondente doseamento a nível tecidual, implicando, comumente, o recurso a animais de laboratório.

Para compreender a natureza do processo de distribuição plasma-cérebro dos metabolitos S-Lic e OXC gerados no murganho após a administração oral do ESL, os perfis plasmáticos e cerebrais correspondentes foram comparados visualmente (figura V.7) e correlacionados em diferentes intervalos de tempo (tabela V.7). Globalmente, verifica-se um certo paralelismo entre os perfis plasmáticos e cerebrais para ambos os metabolitos. Esta observação é apoiada pela correlação linear entre as concentrações plasmáticas e cerebrais encontrada para os metabolitos S-Lic e OXC desde o primeiro ponto de amostragem (0,25 h). Todavia, enquanto que para a OXC o grau de associação linear entre as duas variáveis é forte logo a partir das 0,25 h pós-dose ($r=0,979$; $p<0,0001$), para o enantiómero S-Lic obteve-se uma estreita correlação somente a partir das 0,75 h ($r=0,968$; $p<0,0001$). Adicionalmente, para quantificar a relação existente entre as concentrações plasmáticas e cerebrais para os metabolitos S-Lic e OXC procedeu-se às análises de regressão linear correspondentes, permitindo predizer as concentrações cerebrais perante a disponibilidade dos níveis plasmáticos (tabela V.7).

Para avaliar a extensão de distribuição dos metabolitos S-Lic e OXC para o cérebro as razões cérebro/plasma correspondentes foram calculadas recorrendo ao parâmetro farmacocinético $AUC_{0-\infty}$ e apresentaram o valor de 0,31 para os dois metabolitos (figura V.8). Estes dados sugerem que a distribuição plasma-cérebro do enantiómero S-Lic e da OXC ocorre na mesma proporção e que a extensão de exposição

cerebral corresponde a aproximadamente 30% da exposição sistémica, demonstrando-se que a BHE restringe a exposição cerebral aos metabolitos do ESL. Contudo, ainda que a distribuição plasma-cérebro para os metabolitos S-Lic e OXC ocorra proporcionalmente na mesma percentagem, ao considerar outros parâmetros farmacocinéticos tais como C_{max} , t_{max} , $t_{1/2}$ e MRT torna-se perceptível que o enantiómero S-Lic tem maior dificuldade que a OXC na travessia da BHE em ambas as direcções (tabelas V.2 e V.4). Efectivamente, os valores calculados para a razão entre as concentrações cerebrais e plasmáticas máximas para o enantiómero S-Lic (0,52) e para a OXC (1,05) evidenciam a dificuldade relativa do enantiómero S-Lic no acesso ao cérebro (figura V.8). Adicionalmente, o t_{max} cerebral do enantiómero S-Lic apareceu deslocado para a direita em relação ao observado no plasma (0,25 h para 1 h), enquanto os t_{max} cerebral e plasmático obtidos para a OXC foram coincidentes (1 h). Além disso, atendendo à $t_{1/2}$ e ao MRT estimados no cérebro, é incontestável que o enantiómero S-Lic abandona o cérebro mais lentamente que a OXC (tabela V.4). HAINZL e colaboradores (2001) ao investigarem a farmacocinética do ESL no rato também constataram que a OXC é acumulada menos eficientemente que a Lic no cérebro. Estas observações decorrentes da farmacocinética do ESL no murganho e no rato parecem ser duplamente favoráveis. Pois, se por um lado é desejável uma residência mais duradoira do metabolito farmacologicamente activo (S-Lic) no local de acção, por outro é também relevante a menor residência cerebral de metabolitos neurotóxicos como a OXC. De facto, tem sido demonstrado que a OXC exerce efeitos tóxicos em culturas de neurónios de hipocampo de rato (AMBRÓSIO *et al.*, 2000; ARAÚJO *et al.*, 2004).

Os dados obtidos com a execução deste trabalho não permitem explicar as diferenças identificadas na travessia da BHE para o enantiómero S-Lic e para a OXC, porém, as diferenças de polaridade por eles apresentadas talvez possam estar envolvidas. No entanto, as concentrações cerebrais de S-Lic e de OXC podem ser influenciadas por outros mecanismos para além da difusão passiva. Estudos realizados por CLINCKERS *et al.* (2005) demonstraram que a OXC é um substrato para transportadores existentes ao nível da BHE envolvidos no efluxo de múltiplos fármacos, os quais limitam activamente a entrada e a acumulação de OXC no cérebro.

4.1.5 – Relação entre as concentrações hepáticas e plasmáticas para os metabolitos S-Lic e OXC

Os fármacos administrados oralmente são absorvidos a partir do tracto gastrointestinal para a circulação portal e, inevitavelmente, têm de passar pelo fígado antes de atingirem a circulação sistémica, ficando sujeitos ao efeito do metabolismo de primeira passagem e à eventual ocorrência de acumulação hepática, o que poderá condicionar o comportamento cinético do fármaco. Assim, nas condições experimentais definidas, considerou-se oportuno o estudo da relação entre as concentrações hepáticas e plasmáticas obtidas para os metabolitos S-Lic e OXC. Para tal, os perfis hepáticos e plasmáticos foram comparados visualmente (figura V.9) e correlacionados em diferentes intervalos de tempo (tabela V.8). No que respeita ao metabolito S-Lic verificou-se, logo a partir do primeiro tempo de amostragem, a existência de uma forte correlação linear entre as concentrações hepáticas e plasmáticas (0,25 h) ($r=0,989$; $p<0,0001$). Relativamente à OXC não foi observada qualquer correlação linear significativa entre as concentrações hepáticas e plasmáticas nos intervalos de tempo de 0,25-16 h, 0,5-16 h, 0,75-16 h e 1-16 h. Todavia, uma boa correlação entre as concentrações hepáticas e plasmáticas de OXC foi observada a partir das 2 h ($r=0,968$; $p<0,01$).

Os resultados das análises de regressão linear efectuadas são apresentados na tabela V.8, evidenciando valores de coeficiente de determinação próximos da unidade sempre que foi demonstrada a presença de correlação linear.

Para investigar a influência do fígado na disposição sistémica dos metabolitos S-Lic e OXC foram comparados alguns dos parâmetros farmacocinéticos hepáticos e plasmáticos mais relevantes (tabelas V.2 e V.6). Os valores dos parâmetros C_{max} e $AUC_{0-\infty}$ hepáticos referentes ao enantiómero S-Lic mostraram ser, respectivamente, 1,75 e 1,40 vezes superiores aos encontrados no plasma. Em contraste, para a OXC, os valores estimados para os parâmetros C_{max} e $AUC_{0-\infty}$ hepáticos foram inferiores aos encontrados no plasma, sendo as razões fígado/plasma respectivamente de 0,80 e 0,61 (figura V.10). Estes resultados indicam que no murganho o metabolito S-Lic parece sofrer acumulação hepática enquanto a OXC tende a acumular-se no plasma. Assumindo-se que o fígado actua como um reservatório do enantiómero S-Lic, este efeito poderá ser clinicamente favorável na medida em que permitirá manter as

concentrações plasmáticas de S-Lic por mais tempo e, conseqüentemente, prolongar a exposição cerebral ao metabolito farmacologicamente activo do ESL (S-Lic). Em relação aos níveis mais elevados de OXC presentes no plasma, estes poder-se-ão dever à extrusão efectiva da OXC a partir dos hepatócitos ou à sua produção noutros locais para além do fígado. Isto é apoiado pelo facto de a $t_{1/2}$ e o MRT estimados para a OXC apresentarem no plasma valores 2 vezes superiores àqueles apresentados no fígado (tabelas V.2 e V.6). A propensão para a acumulação hepática de Lic e para a acumulação plasmática de OXC já foi demonstrada anteriormente por HAINZL e colaboradores (2001) ao estudarem a farmacocinética do ESL no rato.