

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**RODRIGO VICENTINO PLACIDO**

**INFLUÊNCIA DA EPILEPSIA NA EXPRESSÃO DE TRANSPORTADORES**

**Alfenas/MG  
2017**

**RODRIGO VICENTINO PLACIDO**

**INFLUÊNCIA DA EPILEPSIA NA EXPRESSÃO DE TRANSPORTADORES**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Alfenas – MG, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa B. Boralli Marques

Co-orientadora: Marília Gabriella A. G. Pereira

**ALFENAS  
2017**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Placido, Rodrigo Vicentino.

Influência da epilepsia na expressão de transportadores /  
Rodrigo Vicentino Placido -- Alfenas-MG, 2017.  
68 f.

Orientadora: Vanessa B. Boralli Marques.  
Dissertação (Mestrado em Ciências  
Farmacêuticas) -  
Universidade Federal de Alfenas, 2017.  
Bibliografia.

1. Epilepsia. 2. Portadores de Fármacos. 3. Antagonistas dos  
Receptores Histamínicos. 4. Farmacocinética. I. Marques,  
Vanessa  
B. Boralli. II. Título.

CDD-615.7

**RODRIGO VICENTINO PLACIDO**

**INFLUÊNCIA DA EPILEPSIA NA EXPRESSÃO DE TRANSPORTADORES**

A banca examinadora abaixo assinada aprova o Trabalho apresentado como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Ciências Farmacêuticas

Aprovada em 03 de março de 2017

Profa. Dra. Vanessa B. Boralli Marques

UNIFAL-MG

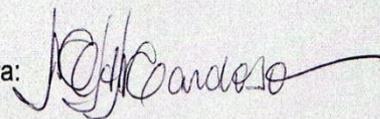
Assinatura:



Profa. Dra. Márcia Helena Miranda Cardoso Podestá

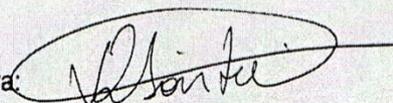
UNIFAL-MG

Assinatura:



Prof Dr Victor Rodrigues Santos

Assinatura:





## AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida, por ter me dado saúde e força para a realização deste mestrado.

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

Ao professor Dr. Norberto García-Cairasco por ter acreditado no potencial do trabalho e ter colaborado para o desenvolvimento, além de ceder seus animais WARs. Aos colaboradores do grupo na USP-RP, Rui, Ana Luisa e Zé.

Aos meus amigos do Laboratório de Pesquisa LATF, as técnicas Patrícia e Márcia. Ao Lellis por toda ajuda e ensinamento em todas as etapas do mestrado e ao laboratório de Nutrição experimental. Às minhas ICs. Ao laboratório de Fisiologia e a professora Sílvia. Ao laboratório de Bioquímica.

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

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

Por fim e não menos importante, aos meus pais Élcio e Maria Conceição por sempre acreditarem em mim e por toda a confiança depositada em mim. Afinal não seria nada sem vocês.

À minha namorada, Isabelly por estar junto comigo durante toda essa caminhada, por também acreditar nos meus sonhos e por todas as dificuldades que enfrentamos juntos.

## RESUMO

A epilepsia é uma patologia com incidência mundial, mas de maior prevalência em países em desenvolvimento; cerca de cinquenta milhões de pessoas no mundo são acometidas por esta patologia. A doença é caracterizada por crises recorrentes, que são breves episódios de movimento involuntário denominado crises convulsivas, e ocorrem devido a descargas elétricas excessivas que acometem as células cerebrais. Pacientes que possuem epilepsia, em alguns casos, não apresentam respostas ao tratamento. Alguns transportadores, como por exemplo a glicoproteína P (Pg-P), presente na barreira hematoencefálica podem estar envolvidos em mecanismos de resistência a fármacos antiepilépticos, que são substratos da Pg-P. Por isso, a avaliação da expressão da Pg-P e sua atividade pode auxiliar no entendimento dos mecanismos patológicos da epilepsia. A avaliação foi realizada comparando-se ratos saudáveis e animais com *background* genético susceptíveis ao desenvolvimento da epilepsia (WAR, sendo 2 grupos, WAR com epilepsia do lobo temporal e WAR resistente à crises) que receberam a fexofenadina (dose de 10mg/kg, por via oral), que é um substrato da Pg-P, e tiveram seu sangue coletado, no período de 0-12 horas. As concentrações de fexofenadina foram determinadas por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas; o preparo de amostra foi realizado através de precipitação de proteínas com acetonitrila. As condições cromatográficas foram: coluna C18, com fase móvel de metanol:acetonitrila:acetato de amônio 10mM (45:45:10, v:v), com fluxo de 0,4mL/min, e monitoramento das seguintes transições para fexofenadina: íon precursor m/z 502 e íons produtos 484, 466 e 171 e padrão interno (losartana), nas seguintes transições m/z 423 para o precursor e íons produtos 207, 192 e 235. O método desenvolvido e validado segundo as normas vigentes na legislação, mostrou ser preciso, exato, estável e adequado ao estudo farmacocinético. Por meio da análise farmacocinética foi possível verificar um aumento da biodisponibilidade (AUC) da fexofenadina, com aumento da meia-vida e diminuição do *clearance* nos ratos WAR resistentes à crises ( $p < 0,05$ ). A análise imunohistoquímica do tecido cerebral, notou-se aumento da expressão de Pg-P nos grupos WAR com ELT e WAR resistente na barreira hematoencefálica. A alteração na expressão da Pg-P pode ser a responsável pela alteração farmacocinética do grupo WAR resistente à crises, uma vez que a entrada do fármaco ao SNC está diminuída, e este achado pode ser um dos motivos da refratariedade ao tratamento farmacológico observada nos pacientes.

Palavras-chave: Epilepsia. Transportadores. Fexofenadina. Farmacocinética.

## ABSTRACT

Epilepsy is a pathology spread worldwide, but prevalent in developing countries; about fifty million people in the world are affected by this pathology. The disease is characterized by recurrent seizures, which are brief episodes of involuntary movement named as seizures, and occur due to excessive electrical discharges that affect the brain cells. Patients who have epilepsy, in some cases, are not successfully at treatment. Some carriers, such as the P-glycoprotein (Pg-P), present in the blood brain barrier may be involved in resistance mechanisms to antiepileptic drugs, which are substrates of Pg-P. Therefore, the evaluation of Pg-P expression and its activity may help to understand the pathological mechanisms of epilepsy. The evaluation was performed comparing healthy animals and others presenting genetic background susceptible to the development of epilepsy, wistar audiogenic rats (WAR with temporal lobe epilepsy and WAR resistant to seizures) who received fexofenadine (dose of 10mg/kg, oral gavage), a Pg-P substrate, collecting blood, from 0 until 12 hours after administration. The concentrations of fexofenadine were determined by ultra-high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry; sample preparation was performed by protein precipitation with acetonitrile. Chromatographic conditions were: C18column, with mobile phase of methanol:acetonitrile:ammonium acetate 10mM (45:45:10, v:v), with flow of 0.4mL/min, and monitoring the following transitions from fexofenadine: precursor ion m/z 502 and product ions 484, 466 and 171; and internal standard (losartan), following transitions m/z 423 for the precursor and ions products 207, 192 and 235. The developed and validated analytical method validated according to brazilian legislation, being accurate, exact, stable and suitable to the pharmacokinetic study. The results of pharmacokinetic analysis, showed an increase in fexofenadine bioavailability (AUC) and half-life due to a clearance reduction in WAR-resistant to seizures ( $p < 0,05$ ). Immunohistochemical analysis of the brain tissue showed an increase in Pg-P expression on the WAR groups with ELT and WAR resistant in the blood-brain barrier, when compared to control group. The change in Pg-P expression may be responsible for pharmacokinetic alterations on the WAR resistant group, once the drug delivery into the CNS was reduced, and this finding may be one of failure at pharmacological treatment observed in the patients.

Keywords: Epilepsy. Transporters. Fexofenadine. Pharmacokinetics.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Transportadores OATP e locais onde atuam no corpo humano .....	20
Tabela 2- Índice de gravidade das crises generalizadas. A partir da observação desses comportamentos, por estímulo, é dado a cada animal o índice da gravidade da crise convulsiva que o animal apresenta.....	30
Tabela 3- Índice de gravidade das crises límbicas. A partir da observação desses comportamentos identifica-se ou não o aparecimento das crises límbicas. É dado a cada animal, por estímulo, o índice da gravidade das crises.....	30
Tabela 4- Dados obtidos da equação linear da fexofenadina .....	45
Tabela 5- Valores de DPR (CV) (%) e EPR (inexatidão) (%) intra-dia e interdias para precisão e exatidão para fexofenadina em plasma de ratos. ....	46
Tabela 6- Dados referentes ao teste de estabilidade de ciclos de congelamento e descongelamento.....	46
Tabela 7- Dados referentes ao teste de estabilidade de curta duração.....	47
Tabela 8- Dados referentes ao teste de estabilidade pós-processamento. ....	47
Tabela 9- Valores de DPR (CV) (%) e EPR (inexatidão) (%) intra-dia e interdias para o LIQ.....	49
Tabela 10- Parâmetros farmacocinéticos dos grupos controle, WARs com ELT e WARs resistentes para a fexofenadina administrada por via oral em ratos (dose: 10mg/kg). Mediana; intervalo de confiança (IC). ....	50
Tabela 11- Dados farmacocinéticos do grupo controle para a fexofenadina administrada por via oral em ratos (dose: 10mg/kg) (n=5) .....	54
Tabela 12- Dados farmacocinéticos do grupo WAR com ELT para a fexofenadina administrada por via oral em ratos (dose: 10mg/kg) (n=4).....	54
Tabela 13- Dados farmacocinéticos do grupo WAR resistentes para a fexofenadina administrada por via oral em ratos (dose: 10mg/kg) (n=6).....	55

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Cascata inflamatória que leva ao desenvolvimento de convulsões e da epilepsia. ....	14
Figura 2- Os transportadores atuando nos tecidos do organismo humano. Em A sua atividade no intestino, em B sua atividade no fígado, em C sua atividade no rim e em D sua atividade na barreira hematoencefálica. ....	22
Figura 3- Estrutura molecular de fexofenadina.....	24
Figura 4- Cirurgia de canulação. Em A preparo do animal; B incisão; C inserção da cânula no animal; D fixação da cânula; E passagem da cânula para o dorso do animal; F confirmação de que está na luz da veia; G colheita de sangue.....	32
Figura 5- Diagrama das diluições dos padrões de fexofenadina, a partir de uma solução mãe de 1 mg/mL. ....	33
Figura 6- Cromatogramas. Em I: cromatograma referente a calibrador na concentração de 500ng/mL de fexofenadina em plasma de rato. O pico A refere-se a fexofenadina e o pico B ao PI. Em II: cromatograma referente a amostra do animal, no tempo 8h. O pico A refere-se a fexofenadina e o pico B ao PI.....	43
Figura 7- Curva analítica da fexofenadina em plasma de rato .....	45
Figura 8- Cromatograma do efeito residual. Em A injetou-se o limite superior de quantificação (500ng/mL). Em B o branco.....	48
Figura 9- Farmacocinética dos grupos controle, WARs com ELT e WARs resistentes. ....	51
Figura 10- Perfil da frequência e gravidade das crises mesencefálicas (IM) e crises límbicas (IL) nos WARs com ELT. A gravidade das crises foi registrada de acordo com a Tabela 2 (IM) e Tabela 3 (IL).....	53
Figura 11- Análise da expressão de Pg-P em cérebro (hipocampo). Microscopia e quantificação da marcação dos grupos: controle, WAR com ELT, WAR resistente. ....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{L}$ : microlitro  
ACTH: corticotropina  
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
AUC: área sobre a curva  
 $Cl_{Tf}$ : *clearance* total aparente  
 $C_{m\acute{a}x}$ : concentração máxima  
CQA: controle de qualidade alto  
CQB: controle de qualidade baixo  
CQM: controle de qualidade médio  
CV: coeficiente de variação  
DAB: Diaminobenzidina  
Dpa: desvio padrão do intercepto com o eixo Y da curva analítica  
DPR: desvio padrão relativo  
ELT: epilepsia do lobo temporal  
EPR: erro padrão relativo  
FDA: Food and Drug Administration  
FMN: fatores de matrizes normalizados  
g: grama  
h: hora  
IC: inclinação da curva analítica  
kDa: quilo Dalton  
kg: quilograma  
LIQ: limite inferior de quantificação  
LSQ: limite superior de quantificação  
m/z: razão massa/carga  
MDR: *multidrug resistance gene*  
mg: miligrama  
min: minuto  
mL: mililitro  
OAT : transportador de ânions orgânicos  
OATP : polipeptídeo transportador de ânions orgânicos  
OCT : transportador de cátions orgânicos  
PBS: tampão fosfato de sódio  
PFA: paraformaldeído  
Pg-P : glicoproteína P  
PI: padrão interno  
PIB: produto interno bruto  
pKa: constante de ionização  
RDC: Resolução da Diretoria Colegiada  
rpm: rotações por minuto  
SNC: sistema nervoso central  
 $t_{1/2}$ : meia-vida  
 $t_{m\acute{a}x}$ : tempo para atingir máxima concentração

UPLC-MS/MS: cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas (*Ultra-performance liquid chromatography tandem mass-spectrometry*)

UV: ultravioleta

WAR: *Wistar Audiogenic Rats*

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
2	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	12
2.1	<b>Epilepsia</b> .....	12
2.2	<b>Modelos de indução de epilepsia em ratos</b> .....	16
2.3	<b>Transportadores</b> .....	19
2.4	<b>Fexofenadina</b> .....	24
2.5	<b>Metodologias de quantificação da fexofenadina em plasma</b> .....	25
3	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	27
4	<b>OBJETIVOS</b> .....	28
4.1	<b>Objetivo geral</b> .....	28
4.2	<b>Objetivo específico</b> .....	28
5	<b>METODOLOGIA</b> .....	29
5.1	<b>Modelo Experimental de epilepsia: <i>Wistar Audiogenic Rats</i> (WARs)</b> .....	29
5.2	<b>Protocolo experimental da análise farmacocinética</b> .....	30
5.3	<b>Padrões e reagentes</b> .....	33
5.4	<b>Metodologia de análise da fexofenadina por UPLC-MS/MS</b> .....	34
5.5	<b>Validação</b> .....	35
5.5.1	Efeito matriz.....	35
5.5.2	Linearidade .....	36
5.5.3	Precisão e exatidão .....	36
5.5.4	Estabilidade .....	37
5.5.5	Efeito residual .....	38
5.5.6	Limite de detecção.....	39
5.5.7	Limite Inferior de Quantificação (LIQ) .....	39
5.6	<b>Análise farmacocinética</b> .....	39
5.7	<b>Análise estatística</b> .....	40
5.8	<b>Imunohistoquímica</b> .....	40
6	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	42
6.1	<b>Canulação</b> .....	42
6.2	<b>Desenvolvimento e validação do método de análise de fexofenadina em plasma de ratos</b> .....	42

6.2.1	Efeito matriz.....	44
6.2.2	Linearidade.....	44
6.2.3	Precisão e exatidão .....	45
6.2.4	Estabilidade .....	46
6.2.5	Efeito residual.....	48
6.2.6	Limite de detecção.....	48
6.2.7	Limite inferior de quantificação (LIQ).....	48
6.3	<b>Considerações sobre método analítico desenvolvido para análise de fexofenadina em plasma de ratos.....</b>	<b>49</b>
6.4	<b>Estudo dos perfis farmacocinéticos nos diferentes grupos experimentais e expressão da Pg-P.....</b>	<b>50</b>
7	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>59</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>60</b>
	<b>Anexo 1.....</b>	<b>68</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A epilepsia é uma patologia com incidência mundial, que afeta entre 1–3% da população, e é um dos transtornos neurológicos mais comuns. A patologia é caracterizada por crises recorrentes espontâneas, que são breves episódios de movimento involuntário denominado crises convulsivas, e ocorrem devido à descargas elétricas excessivas que acometem as células cerebrais. O tratamento é crucial para melhorar as condições de vida dos pacientes, porém, cerca de 30% dos pacientes com epilepsia não apresentam respostas ao tratamento medicamentoso (WHO, 2016).

A patologia é complexa e de difícil análise dos mecanismos envolvidos. Foram desenvolvidos modelos animais para melhor compreensão da mesma e, estes simulam sintomas, alterações bioquímicas e fisiológicas. Dentre os modelos de indução de epilepsia existem cepas geneticamente susceptíveis a epilepsia, ou seja, que possuem *background* genético para desenvolvimento da epilepsia, dentre elas o grupo WAR, tendo este grupo a vantagem de não necessitar a administração de substâncias químicas (KANDATRAVICIUS, 2014).

Os transportadores, como, por exemplo, a glicoproteína P (Pg-P), que está presente na barreira hematoencefálica, intestino, rim e outros órgãos, exerce atividade de efluxo, impedindo a entrada de substâncias, como os medicamentos, no organismo. Este transportador pode alterar a farmacocinética de fármacos, como por exemplo, da digoxina, que tem sua biodisponibilidade diminuída quando administrada juntamente com a rifampicina (que é um indutor da expressão de Pg-P). A expressão da Pg-P também pode estar alterada em algumas patologias, como o câncer.

Por isso, a avaliação da atividade *in vivo* e expressão da Pg-P pode auxiliar no entendimento dos mecanismos patológicos da epilepsia e da resistência ao tratamento medicamentoso. Ressalta-se que não existem dados em modelos de epilepsia por *background* genético; modelos de indução por quimioconvulsivantes, como a pilocarpina, mostraram expressão aumentada de Pg-P.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

Abaixo segue revisão sobre os temas abordados no trabalho.

### 2.1 Epilepsia

A epilepsia é um grave distúrbio neurológico, sendo um dos mais comuns no mundo. O desenvolvimento da epilepsia é maior em pessoas idosas, porém pode acometer todas as faixas etárias, inclusive neonatos e crianças em que as complicações obstétricas e infecções neonatais podem levar ao desenvolvimento da doença (BRODIE; SCHACHTER; KWAN, 2012).

Este distúrbio acomete cerca de cinquenta milhões de pessoas no mundo. Estes indivíduos necessitam de tratamento, porém 30% destes pacientes apresentam crises refratárias, que não tem resposta ao tratamento disponível. Aproximadamente 80% destes casos ocorrem em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento. A epilepsia representa um impacto significativo na economia, visto que resulta em perdas de produtividade, além de necessitar maiores cuidados em saúde, e poder levar a morte. O custo do tratamento é de aproximadamente 80% do PIB *per capita*, e os gastos superam 2 milhões de dólares ao ano em alguns países. Nos países em desenvolvimento, onde as condições são mais precárias, a doença atinge todas as idades. Quando a patologia acomete indivíduos em idade de trabalho, estes ficam limitados, sem poder trabalhar em muitas áreas devido à limitação imposta pela doença. Além de todos estes problemas, a epilepsia ainda é alvo de discriminações e algumas pessoas não procuram tratamento para que não sejam identificadas com a enfermidade (WHO, 2016).

A epilepsia é caracterizada por crises recorrentes espontâneas, que são breves episódios de movimentos involuntários, que comprometem uma região delimitada de um hemisfério cerebral (parcial) ou ambos os hemisférios cerebrais (generalizada), denominadas crises convulsivas. Por vezes, pode ocorrer perda de consciência e de controle da função intestinal ou da bexiga

(FERNANDES, 2013). Estas crises convulsivas são resultado de descargas elétricas excessivas, que acometem as células cerebrais, podendo ocorrer em diferentes áreas do cérebro. A frequência pode ser variável, podendo ocorrer uma vez ao ano, ou várias vezes ao dia. Podem ser caracterizados em idiopáticas, quando a causa não é conhecida, ou em epilepsia secundária ou sintomática, quando sua causa é devido a danos cerebrais, traumas, acidentes vasculares cerebrais, tumores cerebrais, dentre outros (WHO, 2016).

Atualmente, existem hipóteses de que as crises convulsivas têm relação com inflamações que acometem o cérebro. Estas inflamações funcionam como um gatilho que dá início as crises convulsivas e podem levar ao desenvolvimento da epilepsia. Da mesma forma, outras patologias autoimunes como lúpus eritematoso, doença de Crohn e encefalopatias também podem afetar o sistema nervoso central e, como consequências também levar ao desenvolvimento da epilepsia. Isto se deve aos efeitos dos anticorpos no sistema nervoso central (SNC), que formam complexos, levando à vasculites, trombos e infecções (DEVINSKY, SCHEIN, NAJJAR, 2013).

Além disso, as próprias crises convulsivas induzem a inflamação no tecido cerebral. Com esta inflamação produzida, ocorrerá hiperexcitabilidade neuronal, o que ocasiona novas crises e o estabelecimento da epilepsia. As inflamações, assim como as crises levam à morte celular, trazendo prejuízos ao SNC. Na tentativa de reorganização tecidual, ocorre nova hiperexcitabilidade e conseqüentemente novas crises, formando assim um ciclo, conforme ilustra a Figura 1 (VEZZANI *et al.*, 2011).

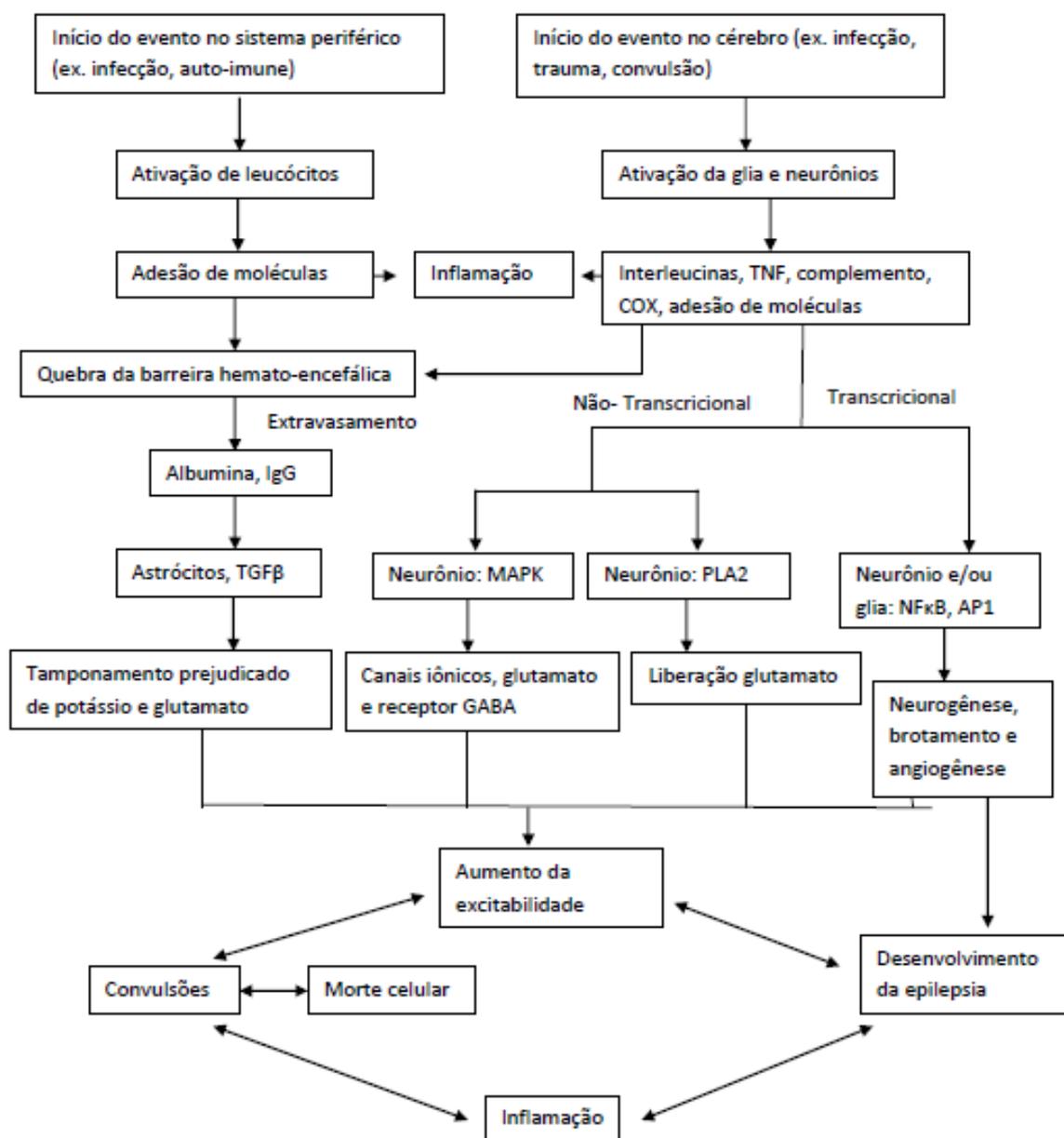


Figura 1- Cascata inflamatória que leva ao desenvolvimento de convulsões e da epilepsia.

Fonte: Adaptado de: VEZZANI *et al.*, 2011.

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

O tratamento da epilepsia é crucial para melhorar a qualidade de vida dos pacientes, pois simples atos, como dirigir, têm restrição para estes

indivíduos. O início do tratamento é conflitante, havendo recomendações distintas: para início após a primeira crise convulsiva, enquanto há grupos que defendem que só se pode considerar que a epilepsia foi instalada e deve ser tratada após a segunda crise convulsiva. O medicamento antiepiléptico a ser utilizado deve combinar segurança e eficácia no tratamento, com o mínimo de efeitos colaterais (PERUCCA; TOMSON, 2011).

Existem diversos fármacos para o tratamento da epilepsia, porém nem todos apresentam a eficácia desejada, e outros apresentam muitos efeitos adversos. A escolha é feita pelo tipo e frequência da crise, idade e estilo de vida. Os fármacos mais utilizados no tratamento são: carbamazepina, fenobarbital, fenitoína e lamotrigina. Porém, em casos em que o paciente não responde ao tratamento, a primeira alternativa é o aumento da dose, que pode gerar efeitos adversos, principalmente em idosos. A segunda alternativa é utilizar politerapia, porém ainda assim pode haver insucesso. Nas crises refratárias, a remoção cirúrgica do foco epiléptico é uma alternativa ao tratamento (PERUCCA; TOMSON, 2011; FERNANDES, 2013). Outros tratamentos com anti-inflamatórios, corticoides e imunoglobinas foram testados e apresentaram resultados variáveis, como no caso do estudo de Brunson *et al.*, 2001 que avaliou o tratamento por corticotropina (ACTH), e este mostrou-se protetor, pois inativou hormônios que são indutores da epilepsia. Porém, no estudo de Verhelst *et al.*, (2005) foi demonstrado que o tratamento com corticoides e imunoglobulinas não foi eficaz no controle de crises convulsivas em crianças com resistência ao tratamento medicamentoso, além de não demonstrar ser seguro (VEZZANI *et al.*, 2011).

A causa da ineficácia do tratamento é muito pesquisada, principalmente, porque ela é observada mais em pacientes idosos. A causa mais aceita no momento, é que exista mecanismo de resistência desempenhado principalmente por transportadores de efluxo, como a glicoproteína-P (Pg-P), fazendo com que o medicamento não atinja o sítio de ação, ou que sua concentração plasmática seja reduzida, e assim não desempenhe sua função farmacológica. Ressalta-se que os medicamentos utilizados no tratamento para epilepsia são substratos destes transportadores, e alguns são até mesmo indutores desses transportadores (REMY *et al.*, 2003). Um grande local da resistência a estes medicamentos é a barreira hematoencefálica, onde a

presença de Pg-P pode estar aumentada, como foi demonstrado em estudo histológicos do tecido cerebral, sendo uma possível causa a resistência (SISODIYA *et al.*, 2002; KWAN *et al.*, 2011). Por isso, novos medicamentos são pesquisados, bem como respostas para essa resistência e para a fisiopatogenia da epilepsia. Um novo medicamento é o perampanel (Fycompa®) que atua de forma seletiva nos receptores AMPA, uma proteína no cérebro responsável pela propagação das crises (FRENCH *et al.*, 2012). Outro medicamento utilizado com restrições no Brasil é o canabidiol, um dos componentes da *Cannabis sativa*, que têm como efeito reduzir as crises convulsivas, sobre nome comercial de Epidiolex®.

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

## 2.2 Modelos de indução de epilepsia em ratos

A epilepsia é uma doença complexa e de difícil análise, uma vez que estudos em humanos são limitados. Devido à dificuldade destes estudos serem realizados em humanos, foram desenvolvidos modelos animais para o estudo da epilepsia. Esses modelos animais simulam sintomas, alterações bioquímicas e fisiológicas que acometem os pacientes com epilepsia. Os modelos experimentais também são úteis para a realização de testes com novos candidatos a fármacos anticonvulsivantes, a fim de avaliar sua segurança e eficácia em estágios pré-clínicos (LÖSCHER, 2011; KANDATRAVICIUS *et al.*, 2014).

Um dos primeiros estudos realizados em modelos animais induziram o *status epilepticus* em roedores, utilizando os quimioconvulsivantes pilocarpina ou ácido caínico. Estes modelos produziram lesões no hipocampo, que são semelhantes às que ocorrem em humanos com epilepsia do lobo temporal (ELT). O ácido caínico é um análogo do L-glutamato é um agonista dos

receptores glutamatérgicos ionotrópicos. Quando administrado sistemicamente, ou via intracerebral, causa despolarização neuronal e, conseqüentemente, o desenvolvimento de crises convulsivas (BEN-ARI *et al.*, 1979). Observou-se que a administração intracerebral do ácido caínico causou menor mortalidade em ratos, quando comparada à administração sistêmica; este modelo é de difícil execução na prática. Notou-se também que, ao se administrar 9mg/kg de ácido caínico aos ratos, dentre os sobreviventes, cerca de 93% deles desenvolveram *status epilepticus* e destes, 80% desenvolveram crises espontâneas (TAUCK, NADLER, 1985; HELLIER *et al.*, 1998; SHARMA *et al.*, 2007). A pilocarpina utilizada para indução de epilepsia em ratos e camundongos é um agonista dos receptores muscarínicos. A administração de pilocarpina ativa receptores muscarínicos inicialmente, mas a propagação/manutenção da crise é causada pelo desbalanço de neurotransmissores excitatórios e inibitórios do SNC, incluindo glutamato e GABA, respectivamente (CAVALHEIRO, 1995). Este processo culmina em alterações histopatológicas no cérebro, principalmente no neocórtex que mimetizam as características histopatológicas em humanos (CAVALHEIRO, 1995). Tanto o ácido caínico, quanto a pilocarpina apresentam a desvantagem de alta mortalidade em animais, que pode ser reduzida diminuindo-se a dose, aplicando-se em menores intervalos e/ou administrando por via intracerebral, além de que pode ser administrado o diazepam como anticonvulsivante para os dois agentes (TURSKI *et al.*, 1984; HELLIER *et al.*, 1998; SHARMA *et al.*, 2007, CASTRO *et al.*, 2011). Estes modelos por indução por quimioconvulsivantes se mostraram bem eficazes para avaliação de fármacos anticonvulsivantes, como benzodiazepínicos e barbitúricos durante o *status epilepticus*. (LEITE, GARCIA-CAIRASCO, CAVALHEIRO, 2002).

A estimulação elétrica é um modelo físico de indução de epilepsia em animais que possui a vantagem de apresentar uma baixa mortalidade e alta reprodutibilidade da indução, além de possuir uma fácil aplicação no caso da indução de epilepsia aguda, quando comparado aos quimioconvulsivantes, porém esta metodologia é trabalhosa e de alto custo para o estudo da epilepsia crônica (KANDATRAVICIUS *et al.*, 2014). Dentre os modelos por estimulação elétrica, está a indução por eletrochoque, que consiste na utilização de eletrodos, que são introduzidos no rato (orelha ou intracerebral, por exemplo), e

produzem uma descarga elétrica capaz de desencadear a crise. Foi demonstrado que a colocação dos eletrodos nas orelhas dos ratos produz melhores resultados (BROWNING, NELSON, 1985). Outro modelo físico de indução de epilepsia é o *Kindling* ou abrasamento, que se refere a um fenômeno de estimulação de crise por repetidas estimulações elétricas em uma região do cérebro, sendo este o modelo de estimulação elétrica mais utilizado atualmente (SLOVITER *et al.*, 2007). Os danos causados pela crise epiléptica podem ser ocasionados por morte celular e danos aos neurônios e sinapses (Sayin *et al.*, 2003), podendo causar além da atrofia, um quadro de epilepsia intratável. Portanto o progresso da doença pode causar a deterioração intelectual (AVANZINI *et al.*, 2013).

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

foi criado pelo grupo do Prof. Dr. Norberto García-Cairasco e denomina-se a *Wistar Audiogenic Rats* (WARs) (DORETTO *et al.*, 2003; ROMCY-PEREIRA, GARCIA-CAIRASCO, 2003; UMEOKA *et al.*, 2011).

### 2.3 Transportadores

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

No fígado, os transportadores desempenham o papel de carregar as substâncias para dentro do hepatócito, para que possam ser metabolizadas e auxiliam na secreção na bile, enquanto no rim auxiliam na secreção das substâncias a favor da eliminação, para a urina em formação. Nestes transportadores podem ocorrer interações, como por exemplo, competição entre dois fármacos pelo transportador e interações entre fármacos e alimentos. Estas interações podem causar a inibição do transportador e impedir que um fármaco que é substrato do transportador adentre na célula via transportador (influxo), ou que seja expulso pelo transportador (efluxo). Também pode ocorrer a indução, onde a atividade do transportador será aumentada, e conseqüentemente aumentando a absorção (influxo) ou

umentando a excreção (efluxo) (MÜLLER; FROMM, 2011). Dresser *et al.* (2002) avaliaram que o suco de toranja (*grapefruit*) é capaz de causar a inibição de transportadores no intestino, como a Pg-P e causou o aumento da biodisponibilidade oral da fexofenadina.

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

Dentre os transportadores de influxo está o polipeptídeo transportador de ânions orgânicos (OATP); este é subdividido em 11 membros da família e localizam-se nos mais variados tecidos conforme Tabela 1.

Tabela 1- Transportadores OATP e locais onde atuam no corpo humano

OATP	DISTRIBUIÇÃO NO TECIDO
OATP1A2	Cérebro, rim, fígado e intestino
OATP1B1	Fígado
OATP1B3	Fígado
OATP1C1	Cérebro, testículo e corpo ciliar
OATP2A1	Ubíquo
OATP2B1	Fígado, placenta, intestino, coração e pele
OATP3A1	Ubíquo
OATP4A1	Ubíquo
OATP4C1	Rim
OATP5A1	Desconhecido
OATP6A1	Testículo

Fonte: Modificado de KALLIOKOSKI; NIEMI, 2009.

Os OATP apresentam grande importância na absorção intestinal, no metabolismo e *clearance* hepático (pela entrada e saída dos hepatócitos), na distribuição para tecidos e na excreção renal. Os transportadores irão determinar o efeito farmacológico ou tóxico das substâncias, pela entrada do

fármaco no tecido e caso ocorra seu acúmulo no organismo (GIACOMINI; SUGIYAMA, 2010).

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

Dentre os transportadores de efluxo, está a glicoproteína-P (Pg-P), inicialmente descoberta na década de 1970 quando observou-se a resistência ao tratamento ao câncer (JULIANO; LING, 1976). Para seu funcionamento utiliza o ATP como fonte de energia, fazendo a expulsão das moléculas contra gradiente de concentração. A Pg-P está presente no fígado, intestino, rim, barreira hematoencefálica e placenta. Devido à sua função de efluxo e, por estar presente em várias partes do organismo, a Pg-P faz um papel protetor do organismo, promovendo a excreção de fármacos na urina, bile e trato gastrointestinal, também diminuindo a absorção, além de impedir o acesso a compartimentos como o sistema nervoso central, protegendo-o do acesso de substâncias diversas (O'BRIEN *et al.*, 2012).

Diversas substâncias são substratos da Pg-P, e, algumas ainda podem ser inibidores ou indutores da atividade do transportador. Quando ocorre a inibição da Pg-P no intestino e rim (a inibição pode ser competitiva no sítio ou impedindo a hidrólise do ATP), esta deixa de atuar na proteção do organismo em eliminar o fármaco e assim pode ser observado aumento de concentrações plasmáticas de substâncias por ela transportadas. A maior concentração plasmática pode causar toxicidade ao indivíduo. Já quando ocorre a indução, aumentará sua expressão e/ou atividade. Caso a indução ocorra em intestino e rim haverá diminuição da concentração plasmática da substância. A Pg-P pode causar a resistência ao tratamento medicamentoso, pois se houver aumento da expressão da Pg-P na barreira hematoencefálica a biodisponibilidade será

aumentada, porém o acesso ao SNC central estará diminuído, impedindo o sucesso farmacológico. Os próprios antiepilépticos podem causar estimulação na expressão da Pg-P, mas isso ainda não foi completamente elucidado (STEPIEN *et al.*, 2012).

Abaixo, na Figura 2, estão representados os transportadores nos variados tecidos do organismo humano.

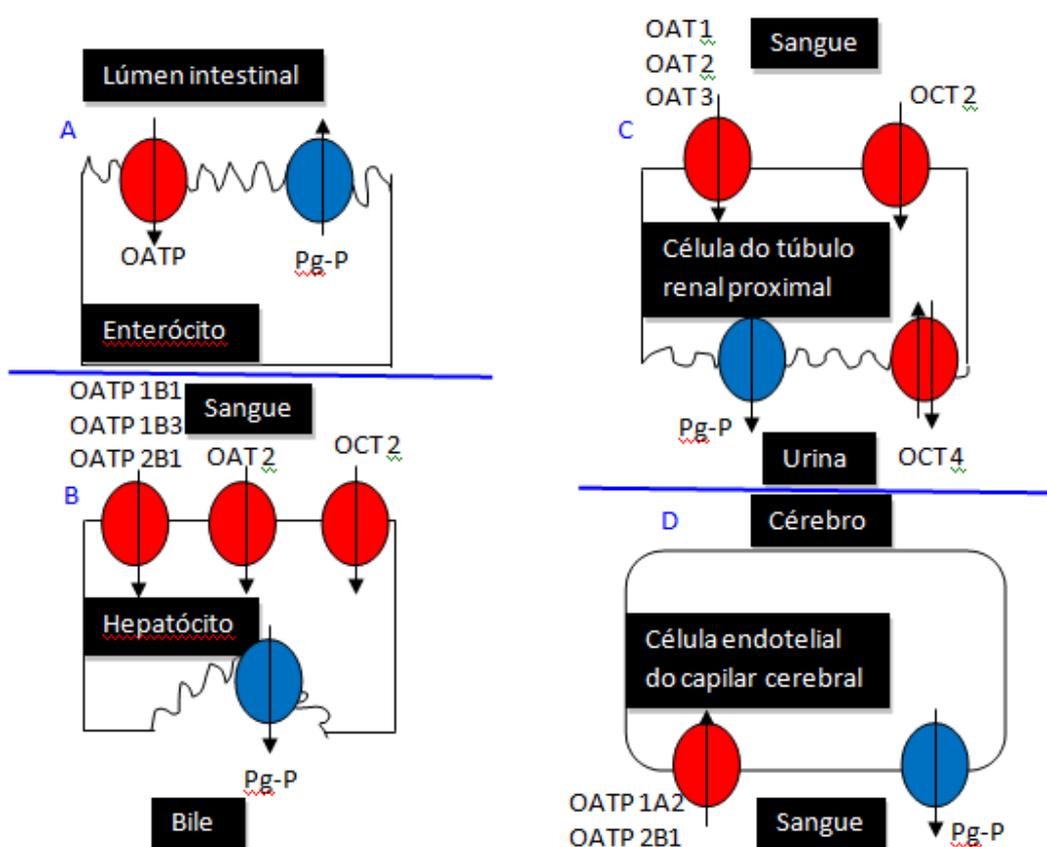


Figura 2- Os transportadores atuando nos tecidos do organismo humano. Em A sua atividade no intestino, em B sua atividade no fígado, em C sua atividade no rim e em D sua atividade na barreira hematoencefálica.

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

O fármaco se liga ao sítio ativo da Pg-P, na sequência o ATP se liga a enzima, onde é clivado pela ATPase e isso promove a mudança

conformacional da enzima e liberação da substância na parte extracelular (ALLER *et al.*, 2009).

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

A Pg-P é codificada pelo genes MDR1 e MDR2. Em tecidos do SNC de pacientes epiléticos submetidos à cirurgia, foi observado um aumento da expressão de Pg-P em comparação a indivíduos saudáveis, além de maior expressão da Pg-P na barreira hematoencefálica em pacientes epiléticos (ZHANG *et al.*, 2012).

A glicoproteína P (Pg-P), proteína transmembrana de 170kDa, está presente em diversos órgãos, onde desempenha sua atividade de efluxo de substâncias. Sua expressão pode ser aumentada ou diminuída devido a interações com substâncias que promovam tal alteração, ou por patologias que também podem alterá-la. Greiner *et al.*, (1999) demonstraram que a biodisponibilidade de digoxina estava diminuída quando esta foi administrada juntamente com a rifampicina. Isto se deu pelo aumento da expressão de Pg-P, que foi comprovado por técnicas de imunohistoquímica e *western blotting*, uma vez que a rifampicina é indutora da Pg-P e aumentou sua expressão no epitélio intestinal, e com isso a digoxina sofreu mais os efeitos de efluxo desta proteína.

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

Lazarowski *et al.* (2004) notaram um aumento da expressão da Pg-P cerebral após a indução da epilepsia com ácido mercaptopropiônico (MP) em ratos. Seus achados indicam que as crises epiléticas causem uma liberação de transmissores que ativam o gene responsável pela expressão de Pg-P

(MRD-1 *multidrug resistance*), e isto causa hiperexpressão da proteína, levando aos casos refratariedade no tratamento.

Potschka e Löscher (2001) demonstraram uma diminuição no efeito da fenitoína em ratos submetidos ao *kindling* elétrico, devido ao aumento da expressão da Pg-P na barreira hematoencefálica.

## 2.4 Fexofenadina

A fexofenadina (Figura 3) é um fármaco anti-histamínico, que age como antagonista dos receptores H1, ligando-se ao receptor e o inativando, diminuindo assim o número de receptores aos quais a histamina poderia se ligar. Sua molécula apresenta propriedades zwitteriônicas, apresentando as conformações R e S, com as duas formas ativas; por isso é comercializada na forma de racemato. Apresenta dois pKa's 4,25 e 9,53. É minimamente metabolizado pelo fígado, não sendo encontrado nenhum metabólito. Ainda, apresenta rápida absorção, atingindo  $C_{max}$  (Concentração Plasmática Máxima) entre 1 a 3 horas; se liga entre 60% - 70% às proteínas plasmáticas (MING; KNIGHT; THAKKER, 2011).

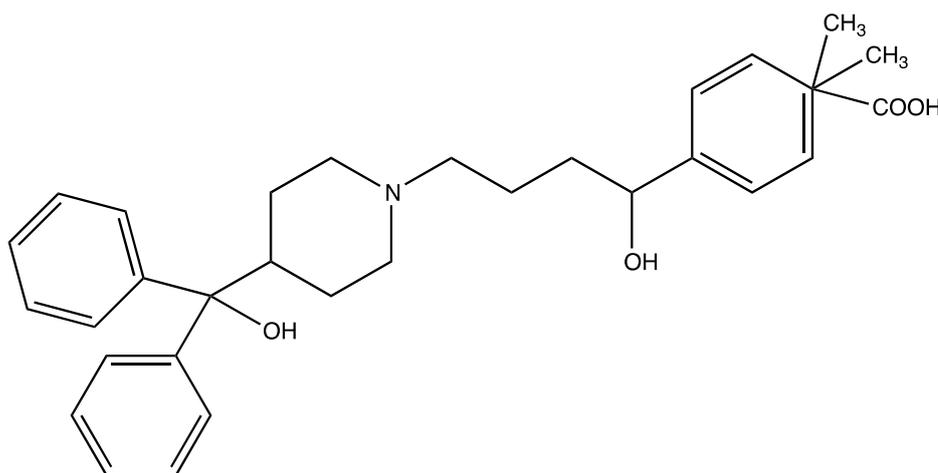


Figura 3- Estrutura molecular de fexofenadina.

Fonte: do autor

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

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

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

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

## 2.5 Metodologias de quantificação da fexofenadina em plasma

As principais metodologias para quantificação de fexofenadina são

realizadas em métodos com detecção por fluorescência no UV ou por espectrometria de massas. Nas técnicas com detecção por fluorescência em UV, utiliza-se a excitação da molécula em 220nm e a emissão em 280nm. No estudo de Phatak *et al.* (2008), o limite inferior de quantificação (LIQ) foi de 1ng/mL, sua faixa linear foi de 1 a 500ng/mL e apresentou precisão e exatidão, porém seu tempo de análise foi de 13 minutos, com fluxo de 1,0mL/min.

Nas metodologias por detecção por espectrometria de massas, Fu, Woolf, Matuszewski (2004) apresentaram a faixa linear entre 1 e 200ng/mL, com um tempo de análise de 4 minutos. Hofmann *et al.* (2002) apresentaram sua faixa linear entre 0,5 e 200ng/mL, com o tempo de análise de 10 minutos. Nirogi *et al.* (2006) apresentaram sua faixa linear entre 1 e 500ng/mL, em um tempo de análise de 2 minutos. Guo *et al.* (2009) apresentaram sua faixa linear entre 1 e 600ng/mL em um tempo de análise de 4 minutos. Teng *et al.* (2007) apresentaram sua faixa linear entre 1 e 1000ng/mL, em um tempo de análise de 3 minutos. Isleyen *et al.*(2007) apresentaram sua faixa linear entre 3 e 1500ng/mL, em um tempo de análise de 2 minutos. O íon precursor para todos os casos foi de m/z 502, e os íons produto foram de m/z 466 e 171.

### 3 JUSTIFICATIVA

A epilepsia é uma doença de alta prevalência e de difícil tratamento, em alguns casos podem ocorrer crises refratárias, que são casos em que o tratamento não é eficaz. Neste contexto, este estudo avaliou a expressão da Pg-P, que é um transportador presente em vários pontos do organismo, em especial na barreira hematoencefálica. Certas condições podem alterar sua expressão ou atividade, podendo modificar a farmacocinética de substâncias utilizadas no tratamento das crises epiléticas, já que são substratos destes transportadores. Apenas a avaliação da farmacocinética da fexofenadina realizada em animais controle e WAR não seria suficiente para afirmar que a alteração se correlaciona à expressão dos transportadores. Então foi realizada também a avaliação da expressão destes transportadores no cérebro, pois a Pg-P pode estar mais expressa neste local, e assim impedindo a chegada do fármaco ao SNC. Esta quantificação tecidual foi realizada por meio da técnica de imunohistoquímica. Com estes achados, temos a intenção de buscar a compreensão de variação interindividual tão grande na farmacoterapia da epilepsia, buscando terapias alternativas que possam melhorar o tratamento da epilepsia com eficácia e melhor controles das crises epiléticas.

## 4 OBJETIVOS

Abaixo seguem os objetivos deste trabalho.

### 4.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade e expressão da Pg-P em modelo experimental de epilepsia.

### 4.2 Objetivo específico

- Desenvolver e validar método analítico para quantificação de fexofenadina em plasma de rato por UPLC-MS/MS;
- Avaliar a farmacocinética da fexofenadina no grupo controle, nos WAR com ELT e nos WAR resistentes que não apresentaram crises;
- Comparar estatisticamente os dados farmacocinéticos obtidos entre os grupos;
- Realizar imunohistoquímica para Pg-P nos tecidos cerebrais dos grupos e comparar os dados obtidos.

## 5 METODOLOGIA

Abaixo seguem os matérias e métodos utilizados neste trabalho.

### 5.1 Modelo Experimental de epilepsia: *Wistar Audiogenic Rats* (WARs)

Para a indução do modelo experimental de epilepsia nos WARs, foram utilizados animais com 60-70 dias de idade. Os estímulos foram aplicados individualmente em caixas acústicas onde os animais foram expostos a um som de alta intensidade (120 dB) até o aparecimento de crises tônico-clônicas ou durante o tempo máximo de um minuto. Este protocolo que envolve estímulos sonoros repetidos é chamado *kindling* audiogênico ou abrasamento. O comportamento dos animais foi monitorado e anotado durante o estímulo e por um minuto após o fim do estímulo. Os animais foram estimulados duas vezes ao dia (8-9 h e 16-18 h) por 10 dias, totalizando 20 estímulos. O índice de gravidade das crises generalizadas (tipo tônico-clônicas) foi determinado com base no índice mesencefálico de Garcia-Cairasco *et al.* (1996) (Tabela 2) e a gravidade das crises límbicas foi determinada pelo índice de Racine (Tabela 3 - Racine, 1972).

Para incluir os animais no grupo de WARs com ELT foram considerados aqueles que apresentaram 3 ou mais crises límbicas durante o período de abrasamento. Para incluir os animais no grupo de WARs resistentes foram considerados aqueles que apresentaram 2 ou menos crises mesencefálicas.

Tabela 2- Índice de gravidade das crises generalizadas. A partir da observação desses comportamentos, por estímulo, é dado a cada animal o índice da gravidade da crise convulsiva que o animal apresenta.

<b>Índice mesencefálico (IM) de Garcia-Cairasco <i>et al.</i> (1996)</b>	
0	Sem crise
0,11	Uma corrida e giros
0,23	Giro, corrida, pulo e quedas atônicas
0,36	Duas corridas, giros e quedas atônicas
0,61	Comportamentos anteriores e convulsão tônica ( <i>opistotonus</i> )
0,85	Comportamentos anteriores e clonias parciais e generalizadas
0,90	Comportamentos anteriores e flexão ventral de cabeça
0,95	Comportamentos anteriores e hiperextensão das patas anteriores
1,0	Comportamentos anteriores e hiperextensão das patas posteriores

Tabela 3- Índice de gravidade das crises límbicas. A partir da observação desses comportamentos identifica-se ou não o aparecimento das crises límbicas. É dado a cada animal, por estímulo, o índice da gravidade das crises.

<b>Índice límbico (IL) de Racine (1972)</b>	
1.0	Automatismos faciais
2.0	Mioclonias de orelha, cabeça e tronco
3.0	Comportamentos anteriores e clonias das patas anteriores
4.0	Comportamentos anteriores e elevação
5.0	Comportamentos anteriores e queda

## 5.2 Protocolo experimental da análise farmacocinética

Os ratos machos foram divididos em três grupos, sendo 5 animais no grupo controle, 6 animais no grupo WARs resistentes (que foram submetidos ao *kindling* mas não apresentaram crises) e 4 animais no grupo WARs com ELT (submetidos ao *kindling* e que apresentaram crises). O grupo controle foi

formado por animais da raça Wistar, provenientes do biotério central da Universidade Federal de Alfenas. Os grupos de WARs foram formados por animais da cepa WAR (*Wistar Audiogenic Rat*), provenientes da USP/RP, cedidos pelo prof. Dr. Norberto Garcia-Cairasco. Os grupos foram alocados no laboratório de pesquisa animal da Faculdade de Nutrição, onde ficaram submetidos ao ciclo do claro e escuro de 12 horas e tiveram água e comida *ad libitum*.

Todos os animais foram pesados, e aqueles que estavam com peso entre 200 – 250g foram submetidos ao procedimento cirúrgico para a inserção de uma cânula, por onde foram realizadas as colheitas seriadas de sangue dos animais nos intervalos propostos após a administração da fexofenadina.

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

O animal foi fixado em uma plataforma com seu abdômen para cima e braços abertos para facilitar a cirurgia, conforme a Figura 4A. Então foi feita uma pequena incisão na região da clavícula do rato, onde a veia jugular se encontrava pulsante logo abaixo do músculo do animal, conforme a Figura 4B. Em seguida, foi feita a perfuração da veia com auxílio de uma agulha, e esta saiu pelo músculo onde foi fixada a cânula, Figura 4C. Então se retirou a agulha da extremidade da cânula e com o auxílio de pinças movimentou-se a cânula para que ela ficasse no interior da veia e o sangue fluísse por ela. A cânula foi presa no músculo através de um ponto para que ela ficasse fixada e não saísse da luz da veia, Figura 4D. A outra extremidade da cânula foi passada, com a ajuda de um trocáter, pela pele do rato para que saísse no dorso do mesmo. Foram feitas suturas para fechar a incisão. Assim, a cânula ficou fixada na parte posterior, Figura 4E. Após posicionamento da cânula, era verificado o sucesso em obter sangue, se houvesse falha, ocorria o reposicionamento, Figura 4F. Após isso, o animal foi colocado em recuperação em caixas individuais. Então, após a administração do fármaco, foram feitas as coletas nos tempos estabelecidos através da punção pela cânula, Figura 4G.



Figura 4- Cirurgia de canulação. Em A preparo do animal; B incisão; C inserção da cânula no animal; D fixação da cânula; E passagem da cânula para o dorso do animal; F confirmação de que está na luz da veia; G colheita de sangue.

Fonte: Do autor.

A fexofenadina foi administrada via gavagem na dose de 10mg/kg. Foram coletados 500  $\mu$ L de sangue, em cada tempo de colheita, e este mesmo volume foi repostado com salina. Os tempos em que foram realizadas as colheitas foram: 0,25, 0,50, 1, 1,25, 2, 3, 4, 6, 8 e 12 horas após a administração de 10mg/kg de fexofenadina (dissolvida em água). O sangue coletado foi centrifugado, e o plasma foi separado e armazenado em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ , para posterior análise.

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UNIFAL/MG (CEUA-UNIFAL), pelo Protocolo nº 658/2015 (Anexo 1).

### 5.3 Padrões e reagentes

O padrão de fexofenadina (padrão USP, lote G0K308, Índia, val. 28/02/17) foi utilizado para preparo de solução estoque de 1mg/mL em acetonitrila (Merck). A partir desta solução-estoque foram feitas diluições sucessivas conforme a Figura 5. As diluições sempre foram feitas em acetonitrila. Por meio destas diluições foram preparados cada calibrador que fez parte da curva analítica.

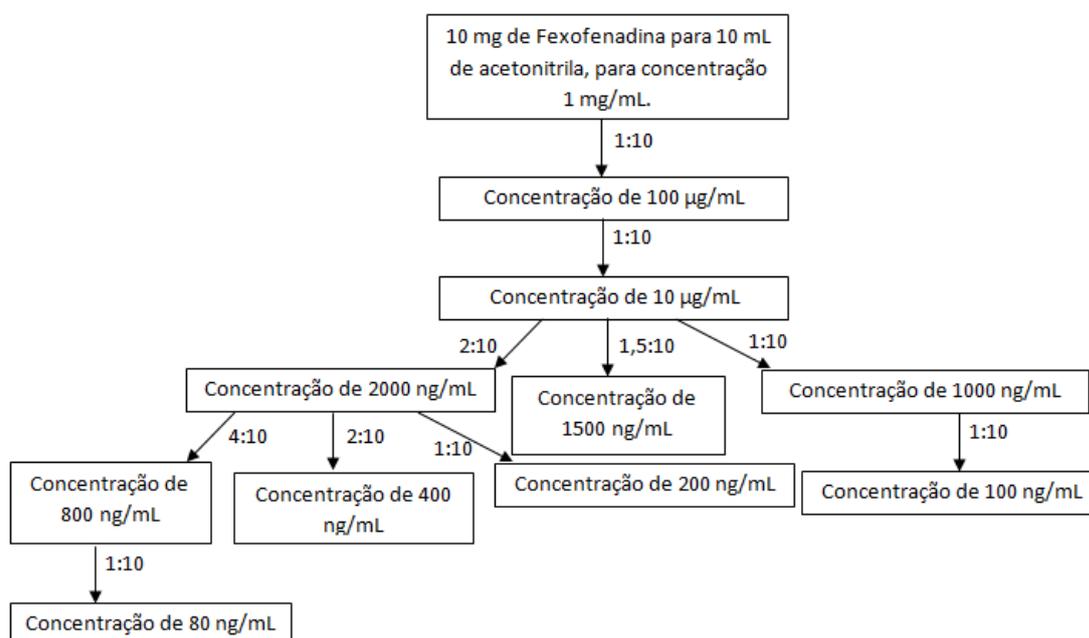


Figura 5- Diagrama das diluições dos padrões de fexofenadina, a partir de uma solução mãe de 1 mg/mL.

Fonte: Do autor.

Para solução padrão de losartana potássica (padrão interno - PI) foram pesados 10mg em balão volumétrico de 10mL, na sequência foram feitas diluições até chegar à concentração de 1µg/mL, e em cada análise foram adicionados 25µL.

#### 5.4 Metodologia de análise da fexofenadina por UPLC-MS/MS

O método de análise em plasma de rato foi desenvolvido baseado inicialmente no método de Teng *et al.* (2007), com alteração na faixa de concentração.

O preparo das amostras foi realizado através de *clean-up*. Em resumo, para os calibradores foram pipetados 25µL de padrão de fexofenadina da concentração adequada e 25µL de padrão interno, foram secados e retomados em 100µL de plasma branco (que representa a matriz de trabalho isenta do analito); para as amostras, a 100µL de amostra foram adicionados 1000µL acetoneitrila (Merck®), em *eppendorf*. Essa mistura foi agitada em vórtex (Thermolyne®, modelo Max Mix II) por 1 min e em seguida, centrifugada por 20 minutos a 22000G em microcentrífuga (marca Mini spin® modelo Mini spin plus - Eppendorf®). Então, 900µL do sobrenadante foram transferidos para um tubo de ensaio, onde foi secado em concentradora a vácuo (Labconco®, modelo Centrivap® concentrator), ressuspendido em 50µL de fase móvel, transferidos para *vials* contendo *inserts* e 25 µL foram injetados no equipamento. A curva analítica foi formada pelos pontos: 20, 25, 50, 100, 250 e 500ng de fexofenadina por mL de plasma. Os controles de qualidade foram preparados nas concentrações de 25ng/mL para o CQ baixo, 200ng/mL para o CQ médio e 375ng/mL para o CQ alto.

A fase móvel foi constituída por uma solução de acetoneitrila : metanol : acetato de amônio 10mM (45:45:10 v:v:v), bombeados em fluxo de 0,4mL/min, com volume de injeção de 25µL, com coluna de separação C18, Shimadzu, modelo Shim-pack ODS *Phenyl*®, de dimensões 3mm x 100mm x 2,2µm. As condições iniciais foram otimizadas pelo equipamento; a fonte de ionização

utilizada foi a ESI, os íons do padrão foram monitorados no modo positivo, nas respectivas transições m/z de 502 > 484, 466 e 171, sendo a transição 502 > 171 de maior intensidade, e os do padrão interno nas transições m/z de 423 > 207, 192 e 235, sendo a transição 423 > 207 de maior intensidade.

## 5.5 Validação

O método analítico foi validado conforme especificações da ANVISA na RDC nº 27 de maio de 2012 (BRASIL, 2012), nos seguintes parâmetros: precisão, exatidão, linearidade, efeito matriz, efeito residual e estabilidades, para confirmar sua adequação e confiabilidade para a análise proposta.

### 5.5.1 Efeito matriz

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

Para este teste foram analisadas, em triplicata, amostras de matrizes biológicas processadas e posteriormente adicionadas dos analitos e do PI em concentrações iguais aos controles de qualidade de baixa concentração (CQB) e controle de qualidade de alta concentração (CQA). O coeficiente de variação (CV) dos Fatores de matrizes normalizados (FMNs) relativos a todas as amostras deve ser inferior a 15% (BRASIL, 2012).

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

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

### 5.5.2 Linearidade

A linearidade permite avaliar se o sinal emitido pelo equipamento aumenta com o aumento da concentração do analito presente na amostra, em uma proporção linear. Para sua realização foram adicionados 25µL do padrão na concentração apropriada, e 25µL de PI em seis concentrações, sendo elas 20, 25, 50, 100, 250, 500ng de fexofenadina por mL de plasma. Os calibradores foram processados conforme o preparo de amostra descrito no item 4.3. e os resultados foram plotados em gráfico, e avaliou-se o  $R^2$ , que deve ser maior ou igual a 0,98 (BRASIL, 2012).

### 5.5.3 Precisão e exatidão

A precisão avalia o grau de repetibilidade do método entre os resultados obtidos para uma mesma concentração, ou seja, o quanto os resultados estão próximos entre si para a mesma concentração. É dividido em precisão intra-dia (um único dia) e precisão interdias (mínimo de 3 dias diferentes). Foram avaliados por meio do controle de qualidade de baixa concentração (CQB – 25ng/mL), controle de qualidade de média concentração (CQM – 200ng/mL) e controle de qualidade de alta concentração (CQA – 375ng/mL). A exatidão expressa a proximidade dos resultados obtidos ao valor nominal e foi realizado da mesma forma que a precisão.

A precisão é expressa pelo coeficiente de variação (CV) ou desvio padrão relativo (DPR), e seu valor não deve ser superior a 15% entre as replicatas, exceto para o LIQ que é até 20%. Para a exatidão foi avaliada através de cálculo do erro padrão relativo (EPR), os valores para cada concentração não podiam ser superiores a 15%, exceto para o LIQ que poderia ser 20% (BRASIL, 2012). A precisão e exatidão intra-dia foram realizadas em um mesmo dia, enquanto a interdias foi realizada em 3 dias. As amostras foram

fortificadas com padrão em cada uma das concentrações (CQB, CQM, CQA) e passaram pelo procedimento de preparo de amostra, conforme descrito no item 4.3.

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

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

#### 5.5.4 Estabilidade

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

##### 5.5.4.1 Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento

As amostras podem ser congeladas e descongeladas por diversos motivos, por exemplo, para casos de reanálises. Por esse motivo deve-se garantir a estabilidade do analito na matriz biológica para no mínimo 3 ciclos de congelamento e descongelamento. Amostras de plasma foram fortificadas nas concentrações de 25 e 375ng/mL (CQB e CQA, respectivamente) em quadruplicata e foram congeladas por 12 horas. Após esse período, foram descongeladas em temperatura ambiente e novamente congeladas por 12 horas. O processo foi repetido mais uma vez, e em seguida procedeu-se o preparo de amostra conforme item 4.3. e análise. Os resultados obtidos foram

comparados com amostras recém-preparadas e a variação deve ser menor que 15%.

#### 5.5.4.2 Estabilidade de curta duração

Amostras fortificadas com padrões nas concentrações de 25 e 375ng/mL (CQB e CQA, respectivamente), em quadruplicata, foram deixadas em repouso em condições normais do laboratório (temperatura, umidade e luminosidade) durante o tempo necessário para preparo das amostras. Em seguida foram submetidas ao preparo de amostra conforme item 4.3. e analisadas. Os resultados obtidos foram comparados a amostras recém-preparadas e a variação deve ser menor que 15%.

#### 5.5.4.3 Estabilidade pós-processamento

Amostras de plasma foram fortificadas com padrões nas concentrações de 25 e 375ng/mL (CQB e CQA, respectivamente), em quadruplicata, foram submetidas ao preparo de amostra conforme descrito no item 4.3., porém foram analisadas pelo equipamento somente após o término de todas as outras amostras. Os resultados obtidos foram comparados com amostras recém-preparadas e a variação deve ser menor que 15%.

#### 5.5.5 Efeito residual

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

branco.

### 5.5.6 Limite de detecção

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

Este parâmetro é calculado conforme a fórmula:

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

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

### 5.5.7 Limite Inferior de Quantificação (LIQ)

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

## 5.6 Análise farmacocinética

Após determinação da concentração da fexofenadina presente no plasma, foi realizada a modelagem farmacocinética. Para isso utilizou-se o software WinNonlin® versão 4.0 (PharsightCorp, Mountain View, Califórnia, EUA). Os dados de concentração plasmática versus tempo após a administração oral da fexofenadina foram analisados empregando-se o modelo bicompartimental, que foi o que melhor se adequou aos dados obtidos. Por

meio do software foram obtidos a área sob a curva (AUC), *clearance*, meia vida ( $t_{1/2}$ ),  $C_{máx}$  e  $t_{máx}$ .

## 5.7 Análise estatística

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

O teste de Mann-Whitney bicaudado para dados não pareados e não paramétricos foi utilizado para comparar os parâmetros farmacocinéticos entre os grupos controle e os grupos WARs; no teste estatístico o nível de confiança foi fixado  $p \leq 0,05$ .

## 5.8 Imunohistoquímica

Após a última colheita do sangue, os animais foram submetidos ao procedimento de perfusão para realizar a colheita do cérebro. O animal foi sedado com tiopental (Pentovet®) e em seguida perfundido com 300mL tampão fosfato de sódio (PBS) 0,1M (pH 7,4) e 400mL paraformaldeído (PFA) 4% (Synth®). Após o término da perfusão o cérebro foi retirado e armazenado em solução de PFA 4% por 24 horas e depois em solução de sacarose 20% (Synth®) até o momento dos cortes. Os cortes foram realizados em micrótomo, com espessura de 50  $\mu\text{m}$ , sendo que a região de interesse foi o hipocampo, sendo este subdividido em seis sub-regiões. Para cada cérebro foram realizados seis cortes coronais de cada amostra (2,12; 2,81; 3,50; 4,19; 4,88; 5,57mm do Bregma), este procedimento foi realizado em sextuplicata. Após os cortes, estes foram armazenados em solução anti-congelante (tampão fosfato pH 7,4; sacarose; propilenoglicol; água) até o momento da imunohistoquímica.

A metodologia da imunohistoquímica foi adaptada de Lazarowski *et al.* (2004). Primeiramente os cortes foram lavados 3 vezes com solução de PBS

0,01M, por 5 minutos cada, sob agitação. Depois foi realizada a inibição da peroxidase endógena com solução 0,5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em metanol (v/v) durante 30 minutos em temperatura ambiente, com agitação. Novamente se repetiu o procedimento de lavagem (solução de PBS 0,01M, 3 vezes por 5 minutos cada em agitação). O bloqueio das ligações inespecíficas foi realizado com solução 5% de albumina bovina em PBS 0,1M (v/v) e 300µL de Triton X, durante 4 horas sob agitação leve. Logo em seguida, submeteu-se à incubação com o anticorpo primário anti-Pg-P (Sigma®), diluído 1:500, por 48 horas sob agitação à temperatura de 4°C.

Após esta etapa, as amostras foram novamente lavadas (3 vezes, por 5 minutos cada lavagem, com solução de PBS 0,01M e sob agitação). Depois da lavagem foi feita a segunda incubação com o anticorpo secundário *anti-mouse* (Vector®), diluído 1:200, por 1 hora em temperatura ambiente. Em seguida, foram novamente lavadas, (3 lavagens com solução de PBS 0,01M por 5 minutos cada). Depois foi feita a incubação com a solução Avidina-Biotina-Peroxidase (Vectorstain®) por 1 hora com agitação leve. Lavou-se 3 vezes com PBS 0,01M, durante 5 minutos cada. A revelação foi feita com a solução de DAB 0,035% (p/v) (Biogen®), solução a 2,5% de sulfato de amônio níquelado (p/v) e solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em PBS 0,1M, por 10 minutos. Cada amostra revelada, contendo seis cortes cada, foi colocada em lâminas gelatinizadas, as lâminas foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol e xilol e montadas com *entelan* para posterior análise dos complexos formados.

Para análise de quantificação da Pg-P, foi realizada a captura em microscópio Olympus BX61VS ScanScope através do programa VS – ASWFL. Após a digitalização da imagem de cada lâmina, 3 cortes foram selecionados para captura na objetiva com aumento de 20 vezes. A seleção dos cortes foi baseada na integridade do tecido. Após a digitalização dos cortes, as imagens foram convertidas em escalas de cinza no programa ICY Bioimageanalysis (Instituto Pasteur®). Para quantificação da marcação foi realizada a densitometria da área total do corte pelo programa ImageJ, o valor da densitometria da área é dado em *IntDen* (do inglês, *IntegratedDensity*). O valor final é calculado pela fórmula [*IntDen* – (área total selecionada x *background*)]. A análise estatística foi realizada no programa GraphPadPrism®.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Abaixo seguem os resultados obtidos no trabalho.

### 6.1 Canulação

Para realização do procedimento de canulação, duas técnicas foram utilizadas: canulação da artéria femoral e da veia jugular, como descritas por CARBAJAL, *et al.*, 1989. Uma vez que canulação da artéria femoral mostrou-se um procedimento menos eficaz por diversos motivos, optou-se preferencialmente pela canulação da veia jugular.

Por meio desta técnica para a colheita de sangue dos ratos foi possível reduzir o número de animais necessários para a realização da farmacocinética, uma vez que foram possíveis realizar até 10 colheitas em um mesmo animal, e ainda assim sem causar estresse ao animal, devido a facilidade para a colheita, enquanto que outras metodologias além de causar maior estresse seriam necessários mais animais. Este procedimento reduziu a variabilidade do estudo (BARDELMEIJER, 2003).

### 6.2 Desenvolvimento e validação do método de análise de fexofenadina em plasma de ratos

O método analítico desenvolvido no UPLC MS/MS para a detecção de fexofenadina foi validado conforme as especificações da RDC 27/2012 da ANVISA (BRASIL, 2012). O método de preparo de amostra foi a precipitação de proteínas com a acetonitrila, para limpeza da matriz biológica (plasma). A proporção de escolha foi de 100µL de plasma para 1000µL de acetonitrila. Após a agitação e centrifugação, o sobrenadante foi retirado e levado à secura, e logo após ressuspendido em 50µL e injetou-se 25µL no equipamento. A

separação dos analitos foi realizada utilizando-se coluna C18 (Shim-pack ODSPhenyl® 3 mm X 100 mm X 2.2 µm, Shimadzu®), protegida por pré-coluna C18 (Superguard™ LC-18, Supelco®), com fase móvel constituída por acetonitrila:metanol:acetato de amônio 10mM (45:45:10, v:v:v). O cromatograma obtido está mostrado na Figura 6. O tempo de eluição da fexofenadina foi aproximadamente 2 minutos e do padrão interno em torno de 1,5 minutos.

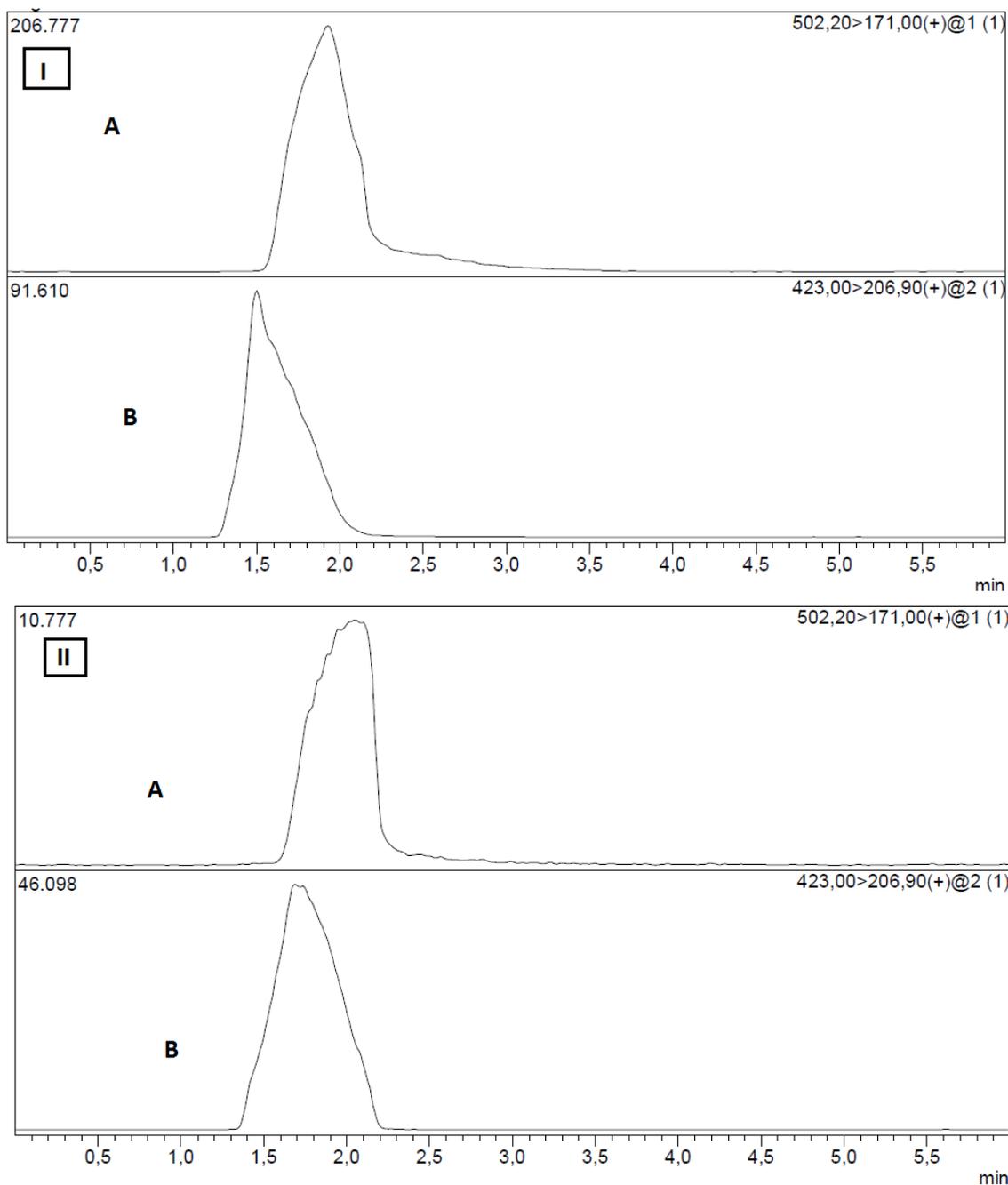


Figura 6- Cromatogramas. Em I: cromatograma referente a calibrador na concentração de 500ng/mL de fexofenadina em plasma de rato. O pico A refere-se a fexofenadina e o pico B ao PI. Em II:

cromatograma referente a amostra do animal, no tempo 8h. O pico A refere-se a fexofenadina e o pico B ao PI.

Fonte: Do autor.

### 6.2.1 Efeito matriz

A avaliação deste efeito para os controles de qualidade baixo (CQB) e alto (CQA), mostrou que a fexofenadina não sofre efeito matriz. Os coeficientes de variação (CV) obtidos para o CQB foi de 6,72% e para CQA foi de 4,05%, e, portanto estão dentro dos limites aceitáveis pela RDC 27/2012, que são até 15% (BRASIL, 2012).

### 6.2.2 Linearidade

De acordo com a RDC 27/2012, para a aceitação da linearidade é necessário que a menor concentração nominal tenha desvio menor ou igual a 20%, as demais concentrações não tenham desvio superior a 15% em relação ao valor nominal. Além disso, é necessário que no mínimo 75% dos padrões de calibração estejam adequados ao acima disposto, e, que no mínimo seis padrões de concentrações distintas sejam utilizados. O limite inferior de detecção (LIQ) e o limite superior de quantificação (LSQ) também devem atender às exigências anteriores (BRASIL, 2012). A relação entre concentração e resposta foi definida por meio de uma curva analítica, representada por uma equação de primeiro grau, no intervalo de 20 a 500ng/mL de fexofenadina em plasma.

Os dados da curva analítica estão demonstrados na Tabela 4. A Figura 7 representa a curva analítica, na qual foram feitas seis réplicas para cada ponto. O valor do coeficiente de correlação linear foi superior a 0,99, sendo que o critério de aceitação para o coeficiente é de que ele seja maior ou igual a 0,98; indicando adequada linearidade na faixa de trabalho.

Tabela 4- Dados obtidos da equação linear da fexofenadina

Parâmetro	Valor
Coeficiente angular (a)	0,003
Coeficiente linear (b)	-0,059
Coeficiente de correlação linear (r)	0,993

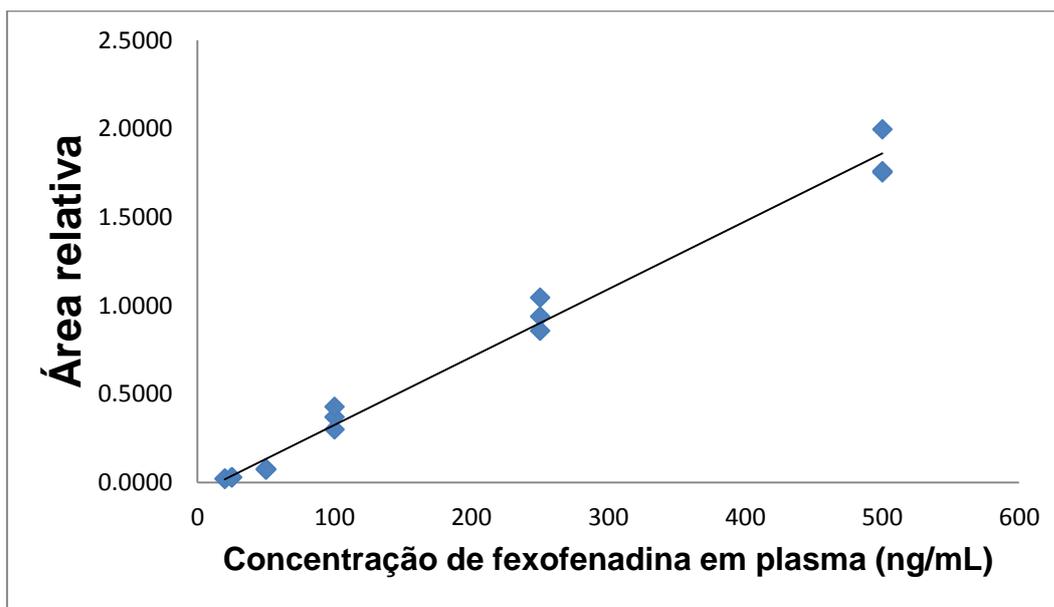


Figura 7- Curva analítica da fexofenadina em plasma de rato

### 6.2.3 Precisão e exatidão

Foi determinada a precisão e exatidão intra e intercorridas (Tabela 5) para os controles [baixo (CQB), médio (CQM) e alto (CQA)] e para o LIQ. Os resultados de precisão e exatidão estão de acordo com os valores aceitos pela RDC 27/2012, (até 15% de variação) mostrando que o método é preciso e exato (BRASIL, 2012).

Tabela 5- Valores de DPR (CV) (%) e EPR (inexatidão) (%) intra-dia e interdias para precisão e exatidão para fexofenadina em plasma de ratos.

		CQB (25ng/mL)	CQM (200ng/mL)	CQA (375ng/mL)
Intra-dias n=6	Precisão (DPR%)	4,04	6,09	11,35
	Exatidão (EPR%)	9,19	14,03	0,30
Interdias n= 3	Precisão (DPR%)	9,85	12,39	13,19
	Exatidão (EPR%)	6,24	1,23	5,36

$$DPR = [(SD/média) \times 100]$$

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

#### 6.2.4 Estabilidade

Abaixo seguem os resultados obtidos para a estabilidade.

##### 6.2.4.1 Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento

Os dados obtidos na análise estão demonstrados na Tabela 6, e estão dentro do valor recomendado (CV até 15%).

Tabela 6- Dados referentes ao teste de estabilidade de ciclos de congelamento e descongelamento.

Amostra	CQB	CQB CC	CQA	CQA CC
Média (ng/mL)	23	21	395	277
CV (%)	9,8	7,1	13,2	11,7

Legenda: CQB: controle de qualidade baixo;

CQB CC: controle de qualidade baixo ciclo de congelamento;

CQA: controle de qualidade alto;  
 CQA CC: controle de qualidade alto ciclo de congelamento;  
 $CV = [(SD/média) \times 100]$

#### 6.2.4.2 Estabilidade de curta duração

Os dados obtidos na análise estão demonstrados na Tabela 7, e estão dentro do valor recomendado (CV até 15%).

Tabela 7- Dados referentes ao teste de estabilidade de curta duração.

Amostra	CQB	CQB CD	CQA	CQA CD
Média (ng/mL)	23	25	395	408
CV (%)	9,8	10,0	13,2	10,35

Legenda: CQB: controle de qualidade baixo;  
 CQB CD: controle de qualidade baixo, curta duração;  
 CQA: controle de qualidade alto;  
 CQA CD: controle de qualidade alto, curta duração;  
 $DPR = [(SD/média) \times 100]$

#### 6.2.4.3 Estabilidade pós-processamento

Os dados obtidos na análise estão demonstrados na Tabela 8, e estão dentro do valor recomendado (CV até 15%).

Tabela 8- Dados referentes ao teste de estabilidade pós-processamento.

Amostra	CQB	CQB PP	CQA	CQA PP
Média (ng/mL)	23	26	395	387
CV (%)	9,8	9,0	13,2	4,0

Legenda: CQB: controle de qualidade baixo;  
 CQB PP: controle de qualidade baixo pós-processamento;  
 CQA: controle de qualidade alto;  
 CQA PP: controle de qualidade alto pós-processamento;  
 $DPR = [(SD/média) \times 100]$

### 6.2.5 Efeito residual

Para a análise foram analisados 3 injeções de amostra branco, sendo uma antes e duas após a injeção do limite superior de quantificação (LSQ). Por meio deste teste, foi possível observar que a fexofenadina não apresentou efeito residual significativo na análise (Figura 8).

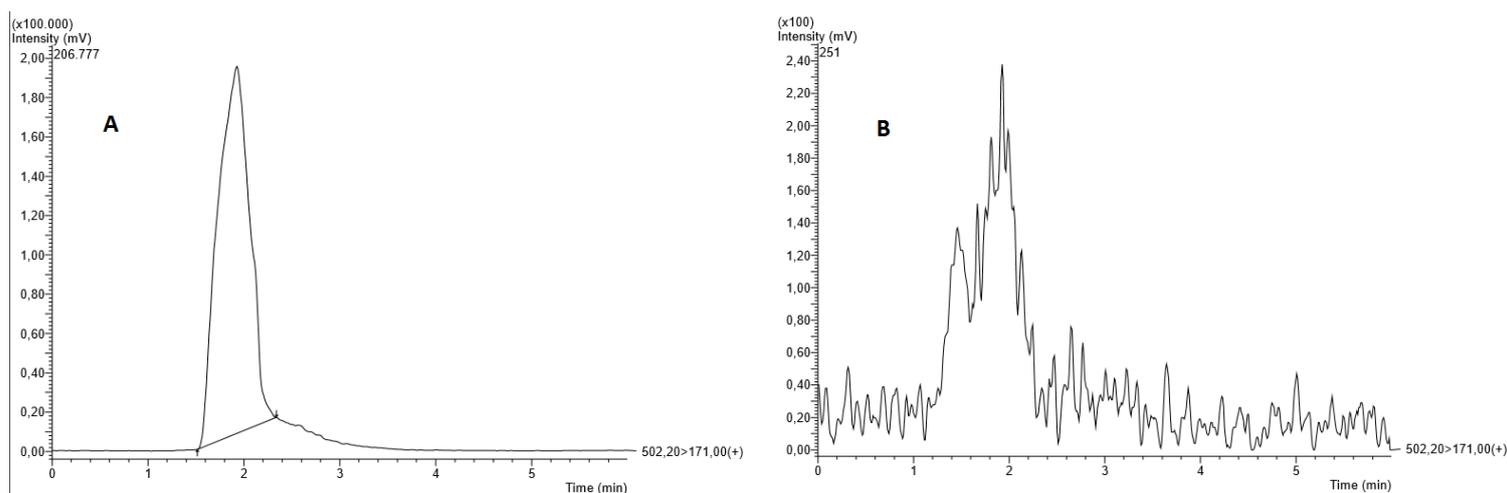


Figura 8- Cromatograma do efeito residual. Em A injetou-se o limite superior de quantificação (500ng/mL). Em B o branco.

Fonte: Do autor.

### 6.2.6 Limite de detecção

O limite de detecção calculado de acordo com o item 4.4.6 foi de 15,4ng/mL, estando adequado aos valores obtidos com as amostras reais no estudo.

### 6.2.7 Limite inferior de quantificação (LIQ)

O LIQ do método desenvolvido foi de 20 ng/mL. O coeficiente de variação foi menor que 20 %, o que é exigido pela RDC 27/2012 (BRASIL,

2012). Os dados obtidos estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9- Valores de DPR (CV) (%) e EPR (inexatidão) (%) intra-dia e inter-dias para o LIQ.

		LIQ
Intra-dias	Precisão(DPR%)	6,55
n=6	Exatidão(EPR%)	5,02
Interdias	Precisão(DPR%)	8,60
n= 3	Exatidão(EPR%)	13,65

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

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

### 6.3 Considerações sobre método analítico desenvolvido para análise de fexofenadina em plasma de ratos

O método desenvolvido e validado apresentou-se linear no intervalo de 20-500ng/mL, atendendo às necessidades do estudo farmacocinético da fexofenadina após administração de única dose, por via oral de 10mg/kg, em animais canulados para múltiplas colheitas. Outros métodos já foram publicados na literatura, com faixas de trabalho que englobam de 1-1000ng/mL, para quantificação realizada em até 72 horas após a administração (Teng *et al.* 2007).

O desenvolvimento do método teve como base os estudos de Teng *et al.* (2007). A partir da metodologia citada, foi desenvolvido um novo, adaptado as condições do Laboratório de Análise de Toxicantes e Fármacos da Universidade Federal de Alfenas.

O tempo de análise cromatográfica de 6 minutos foi adequado, sendo menor que outros métodos como Hofmann *et al.* (2002) com tempo de análise de 10 minutos. Os picos do padrão interno e fexofenadina apresentaram resolução adequada e eluíram nos tempos de 1,5 e 2 minutos, respectivamente. O preparo de amostra se mostrou simples e eficaz, sendo apenas precipitação de proteínas, contribuindo assim para a química verde.

Esta é uma vantagem uma vez que Isleyen *et al.* (2007) empregaram solução de ácido fórmico e posteriormente para uma extração líquido-líquido utilizaram 5mL da mistura de cloreto de metil:acetato de etila:éter dietílico (30:40:30, v:v:v), sendo um volume elevado, com proporcional geração de resíduos.

Ressalta-se que este atendeu os parâmetros de aceitação da ANVISA, (RDC 27/2012), apresentando-se linear, preciso e exato, sendo adequado para a quantificação da fexofenadina em plasma de ratos.

#### 6.4 Estudo dos perfis farmacocinéticos nos diferentes grupos experimentais e expressão da Pg-P

As amostras obtidas após a colheita do sangue foram armazenadas e depois quantificadas por UPLC-MS/MS pelo método desenvolvido em 5.3. Na Tabela 10 estão expressos os parâmetros farmacocinéticos obtidos para a fexofenadina nos grupos controle, WARs com ELT e WARs resistentes, expressando a mediana e intervalo com 95% de confiança.

Tabela 10- Parâmetros farmacocinéticos dos grupos controle, WARs com ELT e WARs resistentes para a fexofenadina administrada por via oral em ratos (dose: 10mg/kg). Mediana; intervalo de confiança (IC).

Parâmetro	Controle	WARs com ELT	WARs Resistentes
AUC (h.ng/mL)	577,9 (459,3 – 774,7)	779,5 (244,4 – 1314,6)	1200,8 (1031,1 – 1352)*
t <sub>1/2</sub> (h)	4,2 (2,7 – 5,5)	6,4 (4,2 – 8,5)	11 (8,5 – 11,8)*
t <sub>máx</sub> (h)	0,7 (0,4 – 0,8)	0,25 (0,25 – 0,25)	0,25 (0 – 1,9)
C <sub>máx</sub> (ng/mL)	151,6 (111,9 – 203,3)	298,5 (155,2 – 441,8)	296,5 (108,6 – 476,1)
Cl <sub>T/f</sub> (L/h/Kg)	17396 (12931 – 21024)	17985 (4856,5 – 31113)	8330 (7288,9 – 9765,4)*

Legenda: AUC: área sobre a curva;

t<sub>1/2</sub>: meia-vida;

t<sub>máx</sub>: tempo de concentração máxima;

C<sub>máx</sub>: concentração máxima;

Cl<sub>T/f</sub>: clearance total aparente.

\* Teste de Mann-Whitney p<0,05 (controle vs WAR resistentes)

Os parâmetros farmacocinéticos obtidos para o grupo controle estão condizentes aos comparados na literatura, como de Phatak *et al.* (2008), com dose de 10mg/kg em que a  $t_{1/2}$  foi de 3,12h e  $t_{m\acute{a}x}$  de 0,75h. Peng *et al.*, (2006) obtiveram, em estudo com administração intravenosa, com dose de 2,0mg/kg valores próximos para a meia-vida de eliminação ( $t_{1/2}$  de 5,23h). No mesmo estudo também se avaliou quando administrado também por via oral uma dose maior (20mg/kg), a meia-vida (4,96h) e  $t_{m\acute{a}x}$  (1,33h) foram próximos aos valores obtidos em nosso estudo (Tabela 10).

Comparando-se estatisticamente os grupos pôde-se notar uma diferença estatística existente entre o grupo controle e o grupo WARs resistentes para os parâmetros de AUC, meia-vida e *clearance*. Isto significa que há uma menor eliminação do fármaco, com conseqüente aumento de biodisponibilidade (AUC) e da meia-vida plasmática ( $t_{1/2}$ ). Os perfis estão ilustrados na Figura 9, onde pode ser visualizada a diferença.

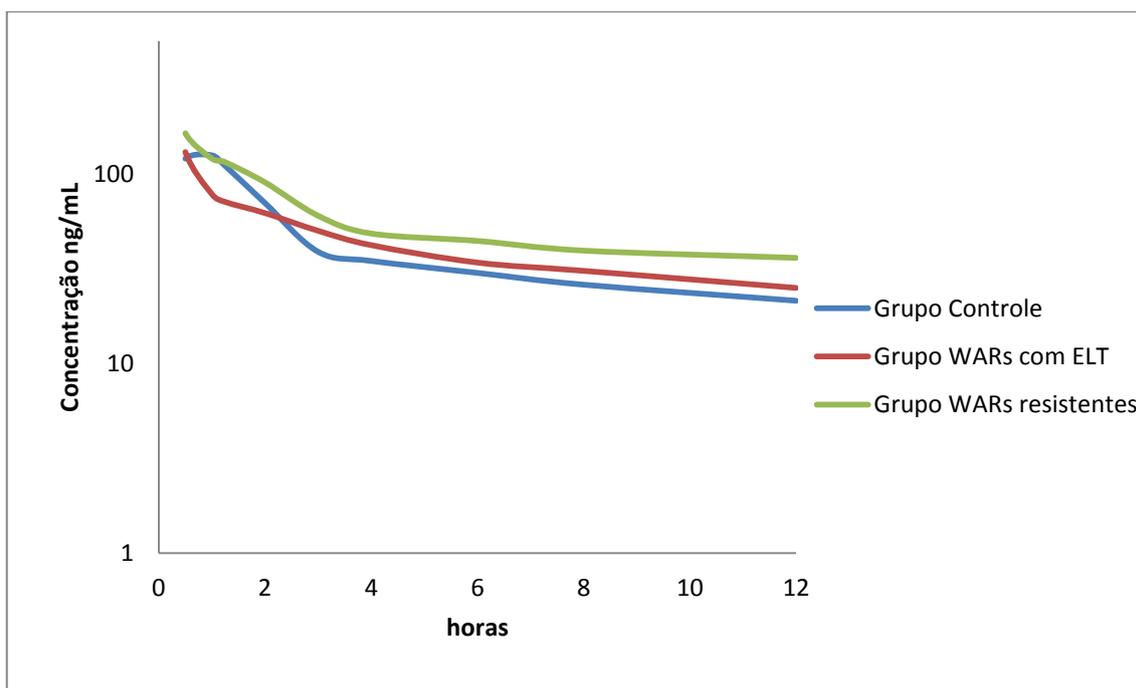


Figura 9- Farmacocinética dos grupos controle, WARs com ELT e WARs resistentes.

Fonte: Do autor.

O diagnóstico para epilepsia é um dos fatores complicadores para o tratamento dessa patologia, uma vez que estão relacionadas ao histórico do paciente, frequência, gravidade e tipo das crises (JAN; GIRVIN, 2008). Mais de 30% dos pacientes com epilepsia não conseguem controlar as crises com o tratamento medicamentoso existente hoje no mercado (WHO, 2016).

A complexidade das crises, assim como a resistência ao tratamento pode ter várias explicações: a constituição genética do paciente; os fatores ambientais e mais recentemente, as novas descobertas com a epigenética. A epigenética é um termo utilizado para modificações que ocorrem no material genético e permanecem estáveis e hereditárias ao longo das divisões celulares, mas não envolvem mudanças na sequência do DNA (KOBOW; BLUMCKE, 2017).

A cepa WAR, que já está na 60<sup>o</sup> geração, de forma geral, possui grande homogeneidade para latência e gravidade das crises, mas ainda existem fatores (ambientais e/ou epigenéticos) que modulam a gravidade e frequência das crises mesencefálicas e límbicas (DORETTO *et al.* 2003). Esse perfil de crises diferenciado entre os animais da cepa, mimetiza de alguma forma a complexidade dos pacientes, que também apresentam esses perfis de crises diferenciados. Como pode ser observado na Figura 10, cada um dos animais apresentou uma sequência/gravidade de crises do tipo mesencefálica e límbica. Esse perfil heterogêneo pode estar relacionado à biodisponibilidade da fexofenadina, marcador de atividade da Pg-P.

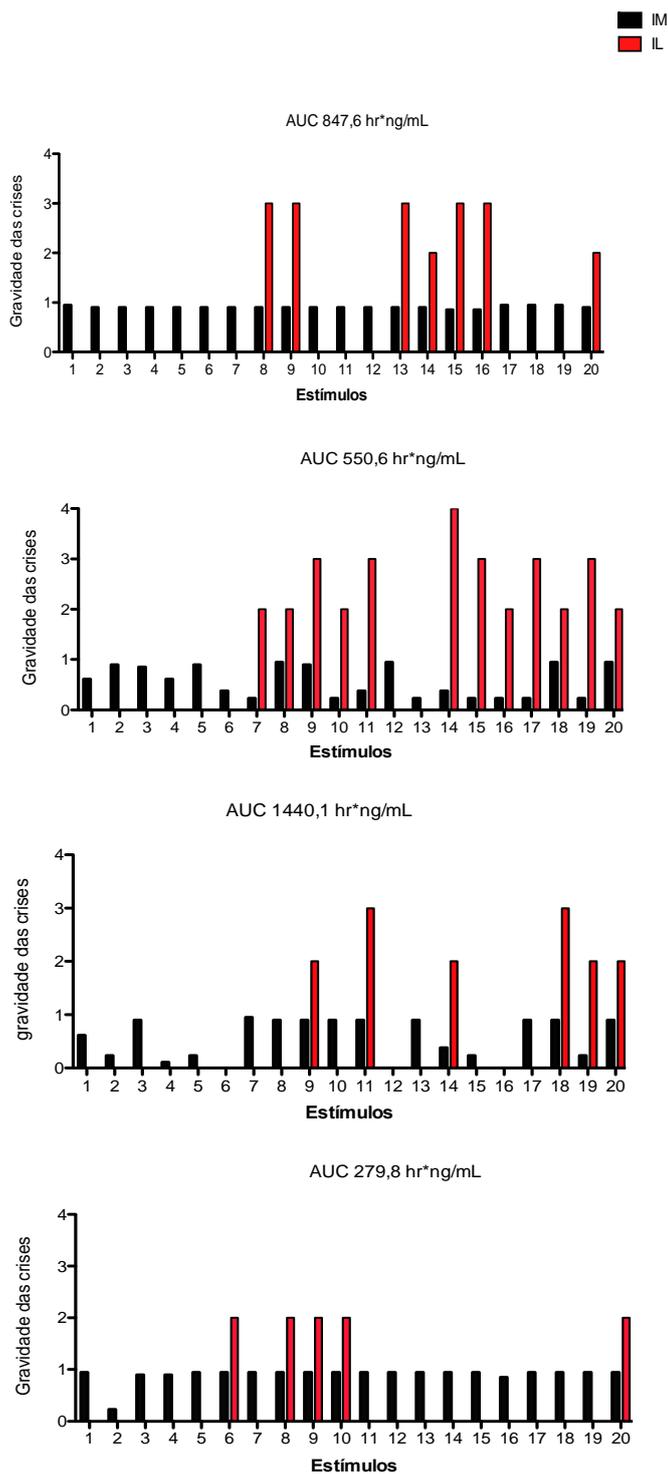


Figura 10- Perfil da frequência e gravidade das crises mesencefálicas (IM) e crises límbicas (IL) nos WARs com ELT. A gravidade das crises foi registrada de acordo com a Tabela 2 (IM) e Tabela 3 (IL).

Guo e Jiang (2010) notaram aumento da expressão da Pg-P cerebral, e diminuição da OATP2 cerebral em ratos induzidos com pilorcapina, o que

ocasiona um menor transporte dos fármacos para o SNC. Porém no rim e intestino não foram encontradas diferenças, demonstrando que a modulação dos transportadores pode ocorrer de diferentes formas em diferentes órgãos. Lazarowski *et al.* (2004) notou aumento da expressão de Pg-P na barreira hematoencefálica de ratos induzidos por ácido mercaptopurinico. Zhang *et al.* (2012) notou aumento da expressão da Pg-P em pacientes refratários submetidos a cirurgia.

Estatisticamente não há diferença entre a biodisponibilidade da fexofenadina entre o grupo de WARs com ELT e o grupo controle, mas isso se deve a grande diferença entre os perfis farmacocinéticos dos diferentes animais com a ELT, o que não acontece para os animais controle (Tabelas 11 e 12).

Tabela 11- Dados farmacocinéticos do grupo controle para a fexofenadina administrada por via oral em ratos (dose: 10mg/kg) (n=5)

Parâmetro	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5
AUC (h.ng/mL)	855	513,5	535,9	725,6	452,1
$t_{1/2}$ (h)	4,2	4,6	6,2	2,3	3,0
$t_{máx}$ (h)	0,69	0,68	0,74	0,66	0,34
$C_{máx}$ (ng/mL)	182,1	109,6	121,5	229,2	145,5
$Cl_{T/f}$ (L/h/Kg)	11696	19474	18660	13782	22119

Legenda: AUC: área sobre a curva;

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

$t_{máx}$ : tempo de concentração máxima;

$C_{máx}$ : concentração máxima;

$Cl_{T/f}$ : clearance total aparente.

Tabela 12- Dados farmacocinéticos do grupo WAR com ELT para a fexofenadina administrada por via oral em ratos (dose: 10mg/kg) (n=4)

Parâmetro	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4
AUC (h.ng/mL)	847,6	279,8	550,6	1440,1
$t_{1/2}$ (h)	8,8	4	5,9	6,8
$t_{máx}$ (h)	0,25	0,25	0,25	0,25
$C_{máx}$ (ng/mL)	400	128	257	409
$Cl_{T/f}$ (L/h/Kg)	12000	35000	18000	6940

Legenda: AUC: área sobre a curva;

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

$t_{máx}$ : tempo de concentração máxima;

$C_{máx}$ : concentração máxima;

$Cl_{T/f}$ : clearance total aparente.

Durante o kindling dos WARs observamos que alguns animais eram resistentes às crises. Esse grupo foi utilizado no trabalho para análise dos perfis farmacocinéticos. Interessantemente, os animais apresentaram um perfil farmacocinético diferente dos animais controle e dos WARs com ELT. Como pode ser observado na Tabela 13, a fexofenadina apresentou uma biodisponibilidade (AUC) maior nos animais resistentes às crises em comparação aos demais grupos. Isso significa que a quantidade do fármaco disponível no organismo (AUC) foi aumentada em virtude de uma diminuição na eliminação (Cl).

Tabela 13- Dados farmacocinéticos do grupo WAR resistentes para a fexofenadina administrada por via oral em ratos (dose: 10mg/kg) (n=6)

<b>Parâmetro</b>	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5	Animal 6
AUC (h.ng/mL)	1225,6	1365,6	1176	1089,3	956,4	1333,4
$t_{1/2}$ (h)	10	11	11	11	11	7
$t_{m\acute{a}x}$ (h)	0,25	0,25	0,25	3	0,25	0,5
$C_{m\acute{a}x}$ (ng/mL)	136	567	378	80	275	318
$Cl_{T\acute{r}}$ (L/h/Kg)	8160	7323	8500	9180	10500	7500

Legenda: AUC: área sobre a curva;  
 $t_{1/2}$ : meia-vida;  
 $t_{m\acute{a}x}$ : tempo de concentração máxima;  
 $C_{m\acute{a}x}$ : concentração máxima;  
 $Cl_{T\acute{r}}$ : clearance total aparente.

Por meio da análise imunohistoquímica foi possível notar que houve aumento da expressão de Pg-P nos grupos WAR com ELT e WAR resistente, em comparação com o grupo controle. Esse aumento pode ser notado em torno de vasos sanguíneos de pequeno e médio porte, onde a barreira hematoencefálica desempenha seu efeito. (Figura 11).

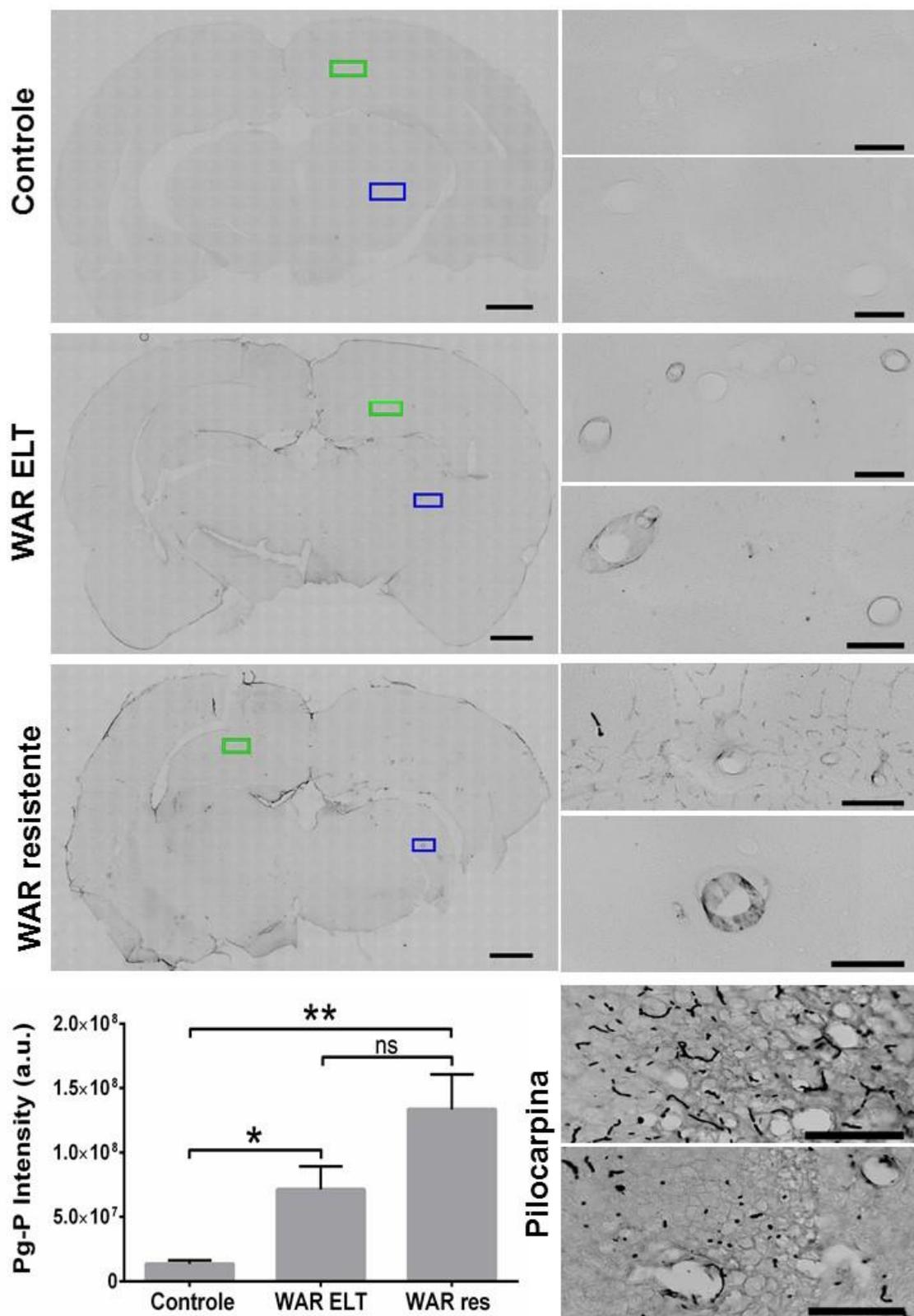


Figura 11- Análise da expressão de Pg-P em cérebro (hipocampo). Microscopia e quantificação da marcação dos grupos: controle, WAR com ELT, WAR resistente. Para controle positivo da marcação foi utilizado um grupo de *Wistar* submetidos ao modelo de indução da epilepsia por pilocarpina, para verificar a eficiência do procedimento de

imunohistoquímica. Diferença estatística encontrada nos grupos WAR com ELT e WAR resistentes em relação ao grupo controle. \*  $<p,0,05$ , \*\* $<0,01$ , ns = não significativo, Teste One Way ANOVA, pós-teste Newman-Keuls.

Fonte: Do autor.

Este aumento na expressão da Pg-P comprova que o acesso de substratos deste transportador ao SNC fica diminuído, como por exemplo, a fexofenadina. Isso ocasiona o aumento da disponibilidade plasmática, evidenciado pelo parâmetro AUC.

Por não atingir seu sítio ativo, os medicamentos antiepiléticos não conseguem desempenhar seu efeito farmacológico, mesmo com o aumento da biodisponibilidade sanguínea. Como a maior parte dos medicamentos utilizados no tratamento da epilepsia são substratos da Pg-P (como por exemplo, carbamazepina, fenitoína, lamotrigina e fenobarbital) (LUNA-TORTÓS; FEDROWITZ; LÖSHER, 2008), estes podem estar sofrendo efeito deste aumento de expressão do transportador de efluxo e por isso não conseguem desempenhar a ação farmacológica, gerando os casos de pacientes refratários à terapia medicamentosa.

A avaliação da expressão de Pg-P no intestino e rim deve ser realizada para confirmar se a expressão de Pg-P é seletiva, como observado por Guo e Jiang (2010), em modelo de indução de epilepsia por pilorcapina. O conjunto destes dados poderá permitir a melhoria da terapia medicamentosa em humanos, pelo entendimento dos mecanismos moleculares. Em relação aos WARs resistentes, o aumento da Pg-P pode representar um mecanismo de detoxificação para eliminação de neurotransmissores cerebrais, pois as crises convulsivas são fenômenos definidos bioquimicamente pelo desbalanço entre os neurotransmissores inibitórios e excitatórios, dentre eles, os principais são GABA e glutamato, respectivamente. Hosoya *et al.* (1999) demonstraram que o glutamato sofre efluxo pela barreira hematoencefálica, para reduzir suas concentrações no cérebro. Kakee *et al.* (2001) demonstraram que o GABA também sofre efluxo pela barreira hematoencefálica, como um mecanismo de detoxificação cerebral. A expressão da Pg-P na barreira hematoencefálica pode ser alterada por diversos motivos, como por medicamentos ou patologias, e

estas alterações implicam em alterações no transporte de substâncias na barreira hematoencefálica (MILLER, BAUER, HARTZ, 2008). Esta alteração na expressão da Pg-P contribuiu para as diferenças encontradas na biodisponibilidade (AUC) para o grupo WAR resistentes, já que a passagem da fexofenadina para o SNC foi reduzida.

## 7 CONCLUSÕES

- O método analítico desenvolvido e validado possui limites de confiança adequados à aplicação em estudo farmacocinético de fexofenadina em ratos, em regime de dose única;
- Por meio da análise farmacocinética notou-se um aumento da biodisponibilidade (AUC), com diminuição da meia-vida e *clearance* da fexofenadina no grupo WAR resistente em relação ao grupo controle;
- A expressão da Pg-P na barreira hematoencefálica estava aumentada nos grupos WAR com ELT e WAR resistente em comparação ao grupo controle;
- O desbalanço na expressão de Pg-P na barreira hematoencefálica pode ter causado aumento da biodisponibilidade da fexofenadina e pode ser uma possível causa dos casos de refratariedade.

## REFERÊNCIAS

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

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

BARDELMEIJER, H. A. *et al.* Cannulation of the jugular vein in mice: a method for serial withdrawal of blood samples. **Laboratory Animals** v. 37, 181-187, 2003.

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

BRASIL. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução RDC N.º 27, DE 17 DE MAIO DE 2012. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0027\\_17\\_05\\_2012.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0027_17_05_2012.html)> Acesso em: 23 mai. 2016.

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

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

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

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

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

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

CVETKOVIC, M.; LEAKE, B.; FROMM, M. F.; WILKINSON, G. R.; KIM, R. B. OATP and P-glycoprotein transporters mediate the cellular uptake and excretion of fexofenadine **Drug Metabolism and Disposition** v. 27, n. 8, p. 866-871, 1999.

DE MORAES, N. V. ; LAURETTI, G.R. ; LANCHOTE, V.L. . Effects of type 1 and type 2 diabetes on the pharmacokinetics of tramadol enantiomers in patients with neuropathic pain phenotyped as cytochrome P450 2D6 extensive metabolizers. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Brasil, 2014.

DEVINSKY, O.; SCHEIN, A.; NAJJAR, S. Epilepsy associated with systemic autoimmune disorders **Epilepsy Currents** v. 13, n. 2, p. 62-68, 2013.

DORETTO M.C.; FONSECA C.G.; LOBO R.B.; TERRA V.C.; OLIVEIRA J.A.; GARCIA-CAIRASCO N. Quantitative study of the response to genetic selection of the *Wistar audiogenic rat* strain (WAR). **Behav Genet** Brasil, v. 33, n. 1, p. 33-42, 2003.

DRESSER G. K. *et al.* Fruit juices inhibit organic anion transporting polypeptide-mediated drug uptake to decrease the oral bioavailability of fexofenadine. **Clin. Pharmacol. Ther.** v. 71, n. 1, p. 11-20, 2002.

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

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

FRENCH, J. A. *et al.* Adjunctive perampanel for refractory partial-onset seizures **Neurology** v. 79, p. 589-596, 2012.

FU, I.; WOOLF, E. J.; MATUSZEWSKI, B. K. Determination of fexofenadine in human plasma using 96-wellsolid phase extraction and HPLC with tandem mass spectrometric detection **J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis** v. 35, p. 837-846, 2004.

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

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

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

GIACOMINI, K. M.; SUGIYAMA, Y. Membrane transporters and drug response. In: BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. (eds). **Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis Of Therapeutics**, New York, p. 41–70, 2010.  
GOTTESMAN, M. M.; FOJO, T.; BATES, S. E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters **Nature Reviews** v. 2, p. 49-58, 2002.

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

GUO, D. *et al.* Measurement of fexofenadine concentration in micro-sample human plasma by a rapid and sensitive LC-MS/MS employing protein precipitation: application to a clinical pharmacokinetic study **Biomed. Chromatogr.** China, v. 24, p. 335-341, 2009.

GUO, Y.; JIANG, L. Drug transporters are altered in brain, liver and kidney of rats with chronic epilepsy induced by lithium–pilocarpine. **Neurological Research**, China, v. 32, n. 1, p. 106-112, 2010.

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

HOFMANN, U.; SEILER, M.; DRESCHER, S.; FROMM, M. F. Determination of fexofenadine in human plasma and urine by liquid chromatography-mass spectrometry **Journal of Chromatography B** v. 766, p. 227-233, 2002.

HOSOYA, K.; SUGAWARA, M.; ASABA, H.; TERASAKI, T. Blood–Brain Barrier Produces Significant Efflux of L-Aspartic Acid but Not D-Aspartic Acid: In Vivo Evidence Using the Brain Efflux Index Method **J. Neurochem.** Japão, v. 73, p. 1206–1211, 1999.

ISLEYEN, E. A. Ö.; ÖZDEN, T.; ÖZILHAN, S.; TOPTAN, S. Quantitative determination of fexofenadine in human plasma by HPLC-MS **Chromatographia Supplement** Turquia, v. 66, 2007.

JAN, M. M.; GIRVIN, J. P. Seizure semiology: value in identifying seizure origin. **Can J Neurol Sci.** v. 35, n. 1, p. 22-30, 2008.

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

KAKEE, A; TAKANAGA, H.; TERASAKI, T.; NAITO, M.; TSURUO, T.; SUGIYAMA, Y. Efflux of a suppressive neurotransmitter, GABA, across the blood-brain barrier **Journal of Neurochemistry**, Japão, v. 79, p. 110-118, 2001.

KALLIOKOSKI, A.; NIEMI, M. Impact of OATP transporters on pharmacokinetics. **British Journal of Pharmacology.** v. 158, n. 3, p. 693-705, 2009.

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

KOBOW, K; BLUMCKE, I. Epigenetics in epilepsy. **Neuroscience letters**, Alemanha, 2017.

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

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

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

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

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

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

LÖSCHER, W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs **Seizure**, Alemanha, v. 20, p. 359-368, 2011.

LUNA-TORTÓS, C.; FEDROWITZ, M.; LÖSCHER, W. Several major antiepileptic drugs are substrates for human P-glycoprotein. **Neuropharmacology**, Hanover, Alemanha, v. 55, p. 1364–1375, 2008.

MILLER, D. S.; BAUER, B.; HARTZ, A. M. S. Modulation of P-Glycoprotein at the Blood-Brain Barrier: Opportunities to Improve Central Nervous System Pharmacotherapy **Pharmacol Rev** Alemanha, v. 60, p. 196–209, 2008.

MING, X.; KNIGHT, B. M.; THAKKER, D. R. Vectorial Transport of Fexofenadine across Caco-2 Cells: Involvement of Apical Uptake and Basolateral Efflux Transporters. **Mol. Pharmaceutics**.v. 8, p. 1677–1686, 2011.

MORAES, M. F. D.; GALVIS-ALONSO, O. Y.; GARCIA-CAIRASCO, N. Audiogenic kindling in the Wistar rat: a potential model for recruitment of limbic structures **Epilepsy Res.** Brasil, v. 39, n. 3, p. 251-259, 2000.

MÜLLER, F.; FROMM, M. F. Transporter mediated drug-drug interaction **Pharmacogenomics**. Alemanha, v. 12, n. 7, p. 1017-1037, 2011.

NIROGI, R. V.; KANDIKERE, V. N.; SHUKLA, M.; MUDIGONDA, K.; MAURYA, S.; BOOSI, R.; ANJANEYULU, Y. Simultaneous quantification of atorvastatin and active metabolites in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using rosuvastatin as internal standard. **Biomed Chromatogr.** v. 20, n. 9, p. 924-936, 2006.

O'BRIEN, F. E.; DINAN, T. G.; GRIFFIN, B. T.; CRYAN, J. F. Interactions between antidepressants and P-glycoprotein at the blood-brain barrier: clinical significance of *in vitro* and *in vivo* findings **British Journal of Pharmacology** v. 165, p. 289-312, 2012.

PATHAK, S. M.; KUMAR, A. R.; MUSMADE, P.; UDUPA, N. A simple and rapid high performance liquid chromatographic method with fluorescence detection for the estimation of fexofenadine in rat plasma—Application to preclinical pharmacokinetics. **Talanta** v.76, p. 338-346, 2008.

PENG, S. X. *et al.* Altered oral bioavailability and pharmacokinetics of P-glycoprotein substrates by co administration of biochanin A. **J. pharmaceutical sciences** v. 95, n. 9, 1984-1993, 2006.

PERUCCA, E.; TOMSON, T. The pharmacological treatment of epilepsy in adults **Lancet Neurol** Itália, v. 10, p. 446-456, 2011.

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

RACINE, R. J. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. **Electroencephalogr Clin Neurophysiol.** v. 32, n. 3, p. 281-294, 1972.

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

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

ROSSETTI F.; RODRIGUES M.C.; DE OLIVEIRA J.A.; GARCIA-CAIRASCO N. EEG wavelet analyses of the striatum–substantia nigra pars reticulata–superior colliculus circuitry: audiogenic seizures and anticonvulsant drug administration in Wistar audiogenic rats (WAR strain). **Epilepsy Res** .v 72, p. 192-208, 2006.

SHARMA, A. K. *et al.* Mesial Temporal Lobe Epilepsy: Pathogenesis, Induced Rodent Models and Lesions. **Toxicologic Phatology** v. 35, p. 984-999, 2007.

SISODIYA, S. M.; LIN, W. R.; HARDING, B. N.; SQUIER, M. V.; THOM, M. Drug resistance in epilepsy: expression of drug resistance proteins in causes of refractory epilepsy. **Brain: a Journal of Neurology**. v. 125, p. 22-31, 2002.

SLOVITER, R. S.; ZAPONE, C. A.; BUMANGLAG, A. V.; NORWOOD, B. A.; KUDRIMOTI, H. On the relevance of prolonged convulsive status epilepticus in animals to the etiology and neurobiology of human temporal lobe epilepsy. **Epilepsia** v. 48, p. 6-10, 2007.

SMITH, S. M.; GUMS, J. G. Fexofenadine biochemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties and its unique role in allergic disorders. **Expert Opin Drug MetabToxicol**. n. 7, p. 813-822, 2009.

STEPIEN, K. M.; TOMASZEWSKI, M.; TOMASZEWSKA, J.; CZUCZWAR, S. J. The multidrug transporter P-glycoprotein in pharmacoresistance to antiepileptic drugs. **Pharmacol Reports** v. 64, p. 1011-1019, 2012.

TAUCK, D. L.; NADLER, V. Evidence of functional mossy fiber sprouting in hippocampal formation of kainic acid-treated rats **The Journal of Neuroscience** v. 5, n. 4, p. 1016-1022, 1985.

TENG, G. S. *et al.* Rapid and sensitive LC-MS/MS method for quantification of fexofenadine in human plasma – application to a bioequivalence study in Chinese volunteers **Chem. Res. Chinese U.**, China, v. 23, n. 5, p. 514-517, 2007.

TURSKI, W. A. *et al.* Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. **Behavioural Brain Research**, v.9, n.3, p.315-335, 1984.

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

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

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

World Human Organization WHO. Epilepsy. Disponível em:  
<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/en/>> Acesso em: 13 jun. 2016.

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

**Anexo 1**

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

**Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº 658/2015, sob responsabilidade de Vanessa Bergamin Boralli Marques, referente ao projeto “Influência da epilepsia na expressão de transportadores”, está em conformidade com o disposto na Lei nº 11.794/08 e nas resoluções do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido apreciado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA- UNIFAL) em 02 de julho de 2015.

Alfenas, 06 de julho de 2015.

*Estela Regina de Oliveira*  
Prof.ª Dr.ª Estela Regina de Oliveira  
Presidente CEUA/UNIFAL