



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG**  
**Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**  
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas/MG. CEP 37130-000 Telefax: (35) 3299-1067



**LELLIS HENRIQUE COSTA**

**INFLUÊNCIA DA EPILEPSIA NA FARMACOCINÉTICA DO ENALAPRIL E DA  
CARBAMAZEPINA EM RATOS.**

**ALFENAS - MG**  
**2016**

**LELLIS HENRIQUE COSTA**

**INFLUÊNCIA DA EPILEPSIA NA FARMACOCINÉTICA DO ENALAPRIL E DA  
CARBAMAZEPINA EM RATOS.**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas – Unifal-MG, como requisito para a obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dra. Vanessa Bergamin Boralli Marques.

Co-orientadora: Prof. Dra. Marília Gabriella Alves Goulart Pereira.

**ALFENAS - MG  
2016**

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

Costa, Lellis Henrique.  
Influência da epilepsia na farmacocinética do enalapril e da  
carbamazepina em ratos / Lellis Henrique Costa. -- 2016.  
76 f. : il.

Orientadora: Vanessa Bergamin Boralli Marques.  
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -  
Universidade Federal de Alfenas, 2016.  
Bibliografia.

1. Epilepsia. 2. Carbamazepina. 3. Enalapril. 4. Farmacocinética.  
I. Marques, Vanessa Bergamin Boralli. II. Título.

CDD 615.7

**LELLIS HENRIQUE COSTA**

**“Influência epilepsia na farmacocinética do enalapril e da carbamazepina em ratos”**

A Banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas.

Aprovado em: 31 / 08 / 2016

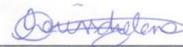
Profa. Dra. Vanessa Bergamin Boralli Marques  
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

Prof. Dr. Norberto Garcia Cairasco  
Instituição: USP/RP

Assinatura: 

Profa. Dra. Larissa Helena L. Torres Pacheco  
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

## AGRADECIMENTOS

A Deus, força inicial do universo, por me conceder sabedoria para tomar as decisões, fé para que eu jamais desistisse, amparo nos momentos difíceis e bom humor para que eu conseguisse caminhar cada dia com mais leveza.

À minha orientadora, Prof. Dra. Vanessa Bergamin Boralli Marques, por me receber como ‘filho’ sem nem mesmo me conhecer muito bem, por compartilhar o seu imenso conhecimento, pelos conselhos e conversas, pelo amparo em muitos momentos e pela disponibilidade em todos os momentos.

À minha co-orientadora, Prof. Dra. Marília Gabriella Alves Goulart Pereira, pela amizade em todos os momentos, pela confiança depositada em minha pessoa, por ter me adotado como filho, por ‘embarcar’ nas minhas ideias, pelo conhecimento compartilhado, por não me deixar desistir.

À minha mãe e às minhas irmãs, pelo amor incondicional, por entender minha ausência, por sonhar junto comigo, e por me ensinarem que o conhecimento é um bem precioso que nunca poderá ser tomado de mim.

À minha família, obrigado pelo carinho constante, pelas orações incessantes, pela paciência, por acreditarem em mim, por serem meus pontos de equilíbrio.

Ao João Pedro e à Maria Fernanda que sempre recarregaram minhas forças com seu carinho e sua ingenuidade.

A todos do LATF – Laboratório de Análise de Toxicantes e Fármacos, que tornaram a jornada mais leve, compartilhando risadas e conhecimento.

Aos meus alunos de iniciação científica/ TCC, os quais não citarei os nomes com receio de esquecer algum, porém saibam que todos foram fundamentais para que este trabalho fosse realizado.

Aos amigos e funcionários da Faculdade de Nutrição, pelo apoio e carinho.

Aos meus grandes amigos que conheci durante a minha vida, seja da fase do colégio, graduação, Projeto Rondon, Ciências sem fronteiras, pós-graduação, obrigado pelas vezes que compreenderam minha falta de tempo, meu mau humor, meu sono incontrolável; obrigado por viver este sonho comigo mesmo em seus piores momentos.

Ao Prof. Dr. Norberto Garcia-Cairasco, pela parceria, pela disponibilidade e pela colaboração neste trabalho.

Aos animais, que doaram suas vidas para que este projeto fosse possível, que Deus

abençoe essas criaturas.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

À Universidade Federal de Alfenas.

“Continue a nadar!”  
(Thomas Newman)

## RESUMO

A Epilepsia é um conjunto de condições neurológicas que tem como característica comum a ocorrência de crises epiléticas recorrentes. A Epilepsia do Lobo Temporal (ELT) é a causa mais comum de crises resistentes a fármacos. Alguns dos modelos animais utilizados na literatura para estudo da condição epilética são linhagens de animais geneticamente susceptíveis à epilepsia, como os ratos WAR (*Wistar Audiogenic Rats*). A carbamazepina é um dos fármacos antiepiléticos mais prescritos, também utilizada em transtornos psiquiátricos. Devido ao baixo índice terapêutico, este fármaco está propenso a interações farmacológicas significativas, sendo que, pequenas mudanças na concentração plasmática podem resultar em perda da eficácia ou sinais de intoxicação. Além disso, pode ser indutor de várias enzimas hepáticas. A angiotensina II, peptídeo formado a partir da clivagem de AngI pela enzima conversora de angiotensina, tem sido considerada como sendo o principal peptídeo ativo do sistema renina-angiotensina (RAS), podendo ser considerado como um neurotransmissor/neuromodulador através de sua ação sobre os receptores AT1 e AT2 presentes em várias regiões cerebrais. O enalapril é um inibidor da enzima conversora de angiotensina e é um dos fármacos mais utilizados para tratamento da hipertensão em pacientes com epilepsia. Este estudo teve como objetivo avaliar a influência de crises epiléticas induzidas em modelo experimental de epilepsia, na farmacocinética do enalapril e da carbamazepina, um conhecido anticonvulsivante, quando usados em monoterapia ou em associação. Para isto, desenvolveu-se metodologia capaz de quantificar o enalapril e a carbamazepina simultaneamente em plasma de rato e realizar avaliação da disposição cinética destes fármacos em ratos Wistar e WAR (não submetidos ao kindling). O enalapril e a carbamazepina foram analisados em plasma por cromatografia líquida de ultraperformance acoplada a espectrômetro de massas. O preparo das amostras foi feito por extração líquido-líquido. O método foi desenvolvido e validado segundo a legislação vigente (ANVISA, RDC 27/2012), sendo adequado para a aplicação em estudos farmacocinéticos. Verificou-se que, nos estudos farmacocinéticos a carbamazepina somente teve seus parâmetros modificados quando administrada a ratos WAR em associação com o enalapril, apresentando diminuição da biodisponibilidade do medicamento ( $AUC^{0-\infty}$ : 9395 vs 35796 ng.h/mL, CWA e CCA, respectivamente). Com relação ao enalapril, o background genético para a epilepsia aumentou a biodisponibilidade do fármaco quando comparado ao seu controle ( $AUC^{0-\infty}$ : 105,25 vs 273,05ng.h/mL, ECA e EWA, respectivamente), além disso, a associação com a carbamazepina fez com que houvesse a diminuição das concentrações plasmáticas de enalapril tanto nos grupos controle, quanto nos grupos WAR.

Palavras-chave: Epilepsia. Carbamazepina. Enalapril. Farmacocinética.

## ABSTRACT

Epilepsy is a set of neurological conditions that have in common that the occurrence of recurrent seizures. The Temporal Lobe Epilepsy (TLE) is the most common cause of seizures resistant to drugs. Some of the animal models used in the literature to study the epileptic condition are genetically susceptible strains of animals with epilepsy, such as WAR rats (Wistar audiogenic Rats). Carbamazepine is one of the most commonly prescribed antiepileptic drugs also used in psychiatric disorders. Due to the low therapeutic index, this drug is prone to significant drug interactions, and small changes in plasma concentrations may result in loss of efficacy or signs of intoxication. Furthermore, it may be an inducer of various liver enzymes. Angiotensin II peptide formed from AngI cleavage by angiotensin converting enzyme, has been considered as the main active peptide of the renin-angiotensin system (RAS) may be considered as a neurotransmitter/neuromodulator through its action on AT1 and AT2 receptors present in various brain regions. Enalapril is an angiotensin converting enzyme inhibitor, and is one of the most used drugs for treating hypertension in patients with epilepsy. This study aimed to evaluate the influence of epileptic seizures induced in experimental epilepsy, on the pharmacokinetics of enalapril and carbamazepine, a known anticonvulsant, when used alone or in combination. For this, we developed methodology to quantify the enalapril and carbamazepine simultaneously in rat plasma and perform evaluation of kinetic disposition of these drugs in rats Wistar and WAR (not subject to the kindling). Enalapril and carbamazepine were analyzed in the plasma by liquid chromatography Ultra-Performance coupled to a mass spectrometer. The sample preparation was done by liquid-liquid extraction. The method was developed and validated according to current legislation (ANVISA RDC 27/2012) and is suitable for use in pharmacokinetic studies. It was found that the pharmacokinetic studies carbamazepine only had their parameters modified WAR when administered to rats in combination with enalapril, with decreased bioavailability of the drug ( $AUC^{0-\infty}$ : 9395 vs. 35796 ng · hr / mL, CWA and CCA respectively). With respect to enalapril, the genetic background for epilepsy increased bioavailability the drug compared to its control ( $AUC^{0-\infty}$ : 105.25 vs. 273,05ng.h / ml, ECA and EWA, respectively), moreover, the association with carbamazepine reduced the plasma concentrations of enalapril in both control groups, as in WAR groups.

Keywords: Epilepsy. Carbamazepine. Enalapril. Pharmacokinetic.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	-Estrutura química da molécula de carbamazepina e seus metabólitos.....	27
FIGURA 2	-Estruturas químicas do maleato de enalapril e seu metabólito, enalaprilato....	28
FIGURA 3	-Desenho esquemático da cirurgia de canulação da veia jugular.....	41
FIGURA 4	-Análise cromatográfica da carbamazepina, do diazepam e do enalapril.....	44
FIGURA 5	-Curva analítica da carbamazepina em plasma de rato.....	45
FIGURA 6	-Curva analítica do enalapril em plasma de rato.....	46
FIGURA 7	-Análise cromatográfica do LIQ do enalapril e da carbamazepina.....	47
FIGURA 8	-Cromatograma do ensaio de efeito residual da carbamazepina, do diazepam e do enalapril.....	48
FIGURA 9	-Curvas de concentração plasmática da carbamazepina em função do tempo..	53
FIGURA 10	-Curvas de concentração plasmática de enalapril em função do tempo.....	54

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	-Equipamentos e materiais utilizados para a validação.....	33
TABELA 2	-Condições cromatográficas do método bioanalítico desenvolvido para quantificação de enalapril e carbamazepina em plasma por UPLC-MS/MS....	35
TABELA 3	-Parâmetros relativos à curva analítica do método analítico para a quantificação de carbamazepina em plasma de rato por UPLC-MS/MS na faixa de concentração de 1 a 1000 ng/mL.....	45
TABELA 4	-Parâmetros relativos à curva analítica do método analítico para a quantificação de enalapril em plasma de rato por UPLC-MS/MS na faixa de concentração de 1 a 300 ng/mL.....	46
TABELA 5	-Limite de quantificação para carbamazepina e enalapril em plasma de ratos.....	47
TABELA 6	-Efeito matriz referente ao método analítico para quantificação de carbamazepina em plasma de ratos.....	49
TABELA 7	-Efeito matriz referente ao método analítico para quantificação de enalapril em plasma de ratos.....	49
TABELA 8	-Precisão e exatidão intracorridas e intercorridas referente ao método analítico para a determinação de carbamazepina em plasma de ratos.....	49
TABELA 9	-Resultados referentes às amostras do teste de estabilidade da carbamazepina em plasma de rato submetidas a sucessivos ciclos de congelamento e descongelamento.....	50
TABELA 10	-Resultados referentes às amostras do teste de estabilidade de enalapril em plasma de rato submetidas a sucessivos ciclos de congelamento e descongelamento.....	50
TABELA 11	-Resultados referentes às amostras do teste de estabilidade de carbamazepina em plasma de rato mantidas a temperatura ambiente por 6 horas e depois processadas e analisadas.....	51
TABELA 12	-Resultados referentes às amostras do teste de estabilidade de enalapril em plasma de rato mantidas a temperatura ambiente por 6 horas e depois processadas e analisadas.....	51

TABELA 13	-Resultados referentes às amostras do teste de estabilidade de carbamazepina em plasma de rato depois de processadas e mantidas a temperatura ambiente por 5 horas.....	51
TABELA 14	-Resultados referentes às amostras do teste de estabilidade de enalapril em plasma de rato depois de processadas e mantidas a temperatura ambiente por 5 horas.....	52
TABELA 15	-Parâmetros farmacocinéticos ( $AUC^{0-\infty}$ e $Cl_T/f$ ) para a carbamazepina administrada por via oral em ratos.....	52
TABELA 16	-Parâmetros farmacocinéticos ( $AUC^{0-\infty}$ e $Cl_T/f$ ) para o enalapril administrado por via oral em ratos.....	54

## LISTA DE ABREVIACOES

$\mu\text{L}$	-Microlitros
$\mu\text{m}$	-Micrmetros
a.C.	-Antes de Cristo
ACh	-Acetilcolina
AMPc	-Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
AngI	-Angiotensina I
AngII	-Angiotensina II
ANVISA	-Agência nacional de Vigilncia Sanitria
$\text{AUC}^{0-\infty}$	-Area under the curve (rea sob a curva do tempo zero extrapolada até o infinito)
CA	-Corno de Ammon
CBZ-E	-Carbamazepina-10,11-epóxido
$\text{Cl}_{\text{T/f}}$	- <i>Clearance</i> total aparente
CCA	-Ratos controle tratados com associao de carbamazepina e enalapril
CCM	-Ratos controle tratados com carbamazepina em monoterapia
CQ	-Controle de qualidade
CQA	-Controle de qualidade alto
CQB	-Controle de qualidade baixo
CQM	-Controle de qualidade médio
CV	-Coeficiente de variao
CWA	-Ratos WAR tratados com associao de carbamazepina e enalapril
CWM	-Ratos WAR tratados com carbamazepina em monoterapia
CYP	-Citocromo P450
DAE	-Drogas antiepiléticas
Dpa	-Desvio padrão do intercepto com o eixo do Y da curva analítica
DPR	-Desvio padrão relativo
ECA	-Ratos controle tratados com associao de carbamazepina e enalapril
ECM	-Ratos controle tratados com enalapril em monoterapia
EH	-Esclerose hipocampal
ELT	-Epilepsia do lobo temporal
ELTM	-Epilepsia do lobo temporal mesial
EUA	-Estados Unidos da América

EWA	-Ratos WAR tratados com associação de carbamazepina e enalapril
EWM	-Ratos WAR tratados com enalapril em monoterapia
FDA	-Food and Drug Administration
FMN	-Fatores de matrizes normalizados
GABA	-Ácido gama-aminobutírico
GEPRs	-Genetic Epilepsy Prone Rats
h	-Hora
HPLC	-High performance liquid chromatography
IC	-Inclinação da curva analítica
IC95%	-Intervalo de confiança 95%
iECA	-Inibidor da Enzima conversora da Angiotensina
kg	-Quilogramas
LD	-Limite de detecção
LIQ	-Limite inferior de quantificação
LSQ	-Limite superior de quantificação
M	-Molar
mg	-Miligramas
min	-Minuto
mL	-Mililitros
NaCl	-Cloreto de sódio
NADPH	-Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida
NF- $\kappa\beta$	-Fator nuclear kappa beta
ng	-Nanogramas
PI	-Padrão interno
SRA	-Sistema renina-angiotensina
SRAA	-Sistema renina-angiotensina-aldosterona
RDC	-Resolução da diretoria colegiada
RP	-Recém-preparada
rpm	-Rotações por minuto
SD	-Desvio padrão
SE	- <i>Status epilepticus</i>
SNC	-Sistema nervoso central
SUDEP	-Sudden Unexpected Death in Epilepsy
UGT	-Uridina 5'-difosfo-glucuronosiltransferase

UNIFAL-MG -Universidade Federal de Alfenas – Minas Gerais

UPLC-MS/MS-Cromatografia líquida de ultra performance acoplada à espectrometria de  
massas

v/v -Volume/volume

WAR -Wistar Audiogenic Rats

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	
2.1. Epilepsia.....	18
2.1.1. Epilepsia do lobo temporal (ELT).....	19
2.1.2. Comorbidades associadas à epilepsia.....	20
2.1.2.1. Morte súbita em epilepsia ( <i>Sudden unexpected death in epilepsy</i> – SUDEP).....	21
2.1.3. Modelos experimentais.....	22
2.1.4. Anticonvulsivantes.....	25
2.1.4.1. Carbamazepina.....	25
2.2. Inibidores da Enzima Conversora da Angiotensina (iECA).....	27
2.2.1. Maleato de enalapril.....	28
<b>3. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>30</b>
<b>4. OBJETIVOS</b>	
4.1. Objetivo geral.....	31
4.2. Objetivos específicos.....	31
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS</b>	
5.1. Fármacos .....	32
5.2. Substâncias químicas de referência.....	32
5.3. Solventes e reagentes.....	32
5.4. Equipamentos e materiais.....	33
5.5. Análise da carbamazepina e do enalapril em plasma.....	33
5.5.1. Soluções padrão e reagentes.....	34
5.5.2. Preparo de amostras e análise cromatográfica.....	34
5.6. Validação do método bioanalítico.....	35
5.6.1. Linearidade.....	36
5.6.2. Limite inferior de quantificação.....	36
5.6.3. Limite de detecção.....	36
5.6.4. Efeito residual.....	37
5.6.5. Efeito matriz.....	37
5.6.6. Precisão e exatidão.....	37
5.6.7. Estabilidade.....	38

5.6.7.1. Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento.....	39
5.6.7.2. Estabilidade de curta duração.....	39
5.6.7.3. Estabilidade das amostras processadas.....	40
5.7. Estudos experimentais.....	40
5.7.1. Canulação da veia jugular.....	40
5.7.1.1. Grupos de animais controle (Ratos Wistar) e Grupos de animais epiléticos (Ratos WAR).....	41
5.8. Análise farmacocinética.....	42
5.9. Análise estatística.....	42
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>43</b>
6.1. Desenvolvimento e validação do método bioanalítico para quantificação de carbamazepina e enalapril em plasma de rato.....	43
6.1.1. Linearidade.....	44
6.1.2. Limite inferior de quantificação.....	46
6.1.3. Efeito residual.....	47
6.1.4. Efeito matriz.....	48
6.1.5. Precisão e exatidão.....	49
6.1.6. Estabilidade.....	50
6.1.6.1. Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento.....	50
6.1.6.2. Estabilidade de curta duração.....	50
6.1.6.3. Estabilidade das amostras pós-processamento.....	51
6.2. Estudos experimentais.....	52
6.2.1. Farmacocinética da carbamazepina em ratos.....	52
6.2.2. Farmacocinética do enalapril em ratos.....	53
<b>7. DISCUSSÃO.....</b>	<b>55</b>
<b>8. CONCLUSÃO.....</b>	<b>62</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>63</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>76</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A Epilepsia é um distúrbio cerebral crônico, que pode afetar não só a vida do paciente, bem como a vida de todos que o cercam. Não é definida propriamente como doença ou síndrome específica, mas um conjunto de condições neurológicas que tem como característica episódios de crises epiléticas recorrentes. As determinações para a classificação de tais condições são dadas pela Liga Internacional Contra a Epilepsia e da Comissão de Classificação e Terminologia (BERG et al., 2010; FISCHER et al., 2014).

Devido a fatores como alta prevalência (1 - 3 % da população mundial), gravidade, morbidade e impacto socioeconômico, as pesquisas científicas no campo da epileptologia têm adquirido caráter prioritário nas políticas de saúde pública (LI et al., 2003; SUNDQVIST, 2002).

Tal condição neurológica é caracterizada clinicamente por alterações comportamentais súbitas (“crises epiléticas”) que podem se repetir ao longo da vida do paciente. A etiologia das desordens epiléticas é extensa e pode ser considerada desde uma condição transmitida geneticamente até um trauma recente (ENGEL, 1995).

Proporcional à complexidade desta condição, o tratamento é de difícil manejo e os anticonvulsivantes tradicionais (fenitoína, carbamazepina, ácido valpróico e barbitúricos) são usados clinicamente desde antes de ensaios clínicos serem exigidos para a aprovação de medicamentos. Não há justificativa ética para a realização de ensaios clínicos controlados por placebo, especialmente face às possíveis consequências das crises e ao controle de aproximadamente 85% dos pacientes com epilepsia com os medicamentos existentes (MATTSON, 1998).

Devido à complexidade deste distúrbio, o tratamento se torna complexo, sendo ideal o tratamento individualizado, com uma medicação específica para cada paciente. Porém, ainda é uma prática distante da realidade clínica. Em face de uma variedade de medicações disponíveis associadas com inúmeras apresentações, dosagens e possibilidades de combinações entre as drogas antiepiléticas (DAEs), e naturalmente de seus efeitos colaterais e eventuais interações medicamentosas, o tratamento acaba adquirindo uma característica bastante particular para cada paciente. Deste modo, para a realização do tratamento das epilepsias uma série de situações pode influenciar a escolha das DAEs (BETTING & GUERREIRO, 2008).

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Epilepsia

A epilepsia tem seus primeiros relatos datados por volta de 1000 a.C., quando as crises eram atribuídas a entidades demoníacas, influência mágica ou astrológica sobre os indivíduos. Tal ideia influencia até hoje na concepção dos leigos e mesmo profissionais sobre este transtorno. Hipócrates (400 a.C.), acreditava que a epilepsia era advinda de causas naturais, porém desconhecia essas causas. A origem da palavra ‘epilepsia’ deriva do grego “*epilambanein*”, com o significado de ‘apoderar-se de’ ou ‘descontrolar-se’; sendo denominada em tempos passados de “doença das quedas” ou o “mal das quedas” e conhecida como doença sagrada. Clinicamente, a epilepsia se apresenta como um conjunto de manifestações cerebrais crônicas, caracterizada por crises epilépticas recorrentes e involuntárias, podendo ocorrer ou não a perda de consciência. O neurologista inglês John Hughlings Jackson mudou a maneira com se enxergava a epilepsia ao afirmar que a mesma se dava como o resultado de descargas cerebrais anormais. Tal mudança veio junto com vários avanços no campo da neurologia no século XIX. Tais eventos do século XIX culminaram com a descoberta do primeiro tratamento parcialmente eficaz para epilepsia, o brometo de potássio, que foi inicialmente usado em 1857 pelo médico Sir Charles Locock para o tratamento de mulheres que apresentavam crises que ocorriam na época da menstruação (ENGEL, 1995; JACKSON, 1958; SCOTT, 1993).

Existe a estimativa de que 2,4 milhões de pessoas são diagnosticadas com epilepsia cada ano em todo o mundo, sendo considerado um dos transtornos mais comuns na clínica neurológica. Nos países desenvolvidos, novos casos anuais são entre 30 e 50 a cada 100 000 pessoas na população em geral. Em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, esse número pode chegar ao dobro. Isto, provavelmente, ocorre devido ao aumento do risco de condições endêmicas tais como a malária ou a neurocisticercose; a maior incidência de acidentes de trânsito; lesões relacionadas com o parto; e variações na infraestrutura médica, a disponibilidade de programas de saúde preventivos e cuidados acessíveis. Perto de 80% das pessoas com epilepsia vivem em países de baixa e média renda. Em países desenvolvidos, a incidência da epilepsia aumenta de acordo com o aumento da idade, já em países

subdesenvolvidos, a incidência é maior em adolescentes ou jovens adultos. (BANERJEE et al., 2009; WHO, 2016).

Noronha et al. (2007) afirmam que no Brasil cerca de um milhão de pessoas sejam afetadas pela epilepsia, sendo que dessas mais de 380 mil não fazem o tratamento adequado. Além disso, não se observa nenhuma tendência a respeito da incidência nas diferentes classes sociais.

As crises epilépticas são o resultado de uma descarga excessiva e hipersincronizada em uma população de neurônios hiperexcitáveis; clinicamente é caracterizada por alterações comportamentais súbitas (“crises epilépticas”) que podem se repetir ao longo da vida do paciente. Essa condição reflete uma atividade elétrica anormal e paroxística, acometendo uma ou várias áreas cerebrais e podem ser causadas por inúmeras patologias estruturais ou neuroquímicas. A maioria das crises se originam em regiões neocorticais e hipocampais, apesar de algumas estruturas sub-corticais, como o tálamo, estarem envolvidas em alguns tipos de crises (ENGEL, 1995; VENAGAS et. al., 2004).

A observação em modelos experimentais demonstra que os neurônios da região onde se inicia a crise, apresentam atividade elétrica caracterizada por descargas de início repentino e de forma aguda, as quais foram chamadas de “mudanças de despolarização abrupta”. As causas das crises epilépticas podem ser variadas, mas mutações em genes codificantes de proteínas dos receptores de membrana e lesões traumáticas são as causas mais comuns. Vários receptores foram associados ao aparecimento da epilepsia, dentre eles, a mutação do gene codificador do canal para sódio, o que faz com que este canal fique aberto por muito tempo. Com isso, há uma liberação excessiva de glutamato, neurotransmissor excitatório, que leva a uma liberação anormal de cálcio no neurônio pós-sináptico, levando a um processo chamado de ‘suicídio celular’. Mutações que levam a baixa produção ou a ineficiência do GABA (ácido gama-aminobutírico), neurotransmissor inibitório, auxiliam também na maior excitabilidade das células neuronais. Com isso há descargas excessivas, súbitas e recorrentes no cérebro (AVANZINI et al., 2003).

### 2.1.1. Epilepsia do lobo temporal (ELT)

A epilepsia do lobo temporal (ELT) é uma alteração neurológica, com ativação do lobo temporal, com repercussões de ordem neuropsicológica importantes a serem consideradas na prática clínica, especialmente quando ocorre na infância, repercutindo,

principalmente em alterações de linguagem e memória. A epilepsia de lobo temporal mesial (ELMT) apresenta como causa patológica mais comum a esclerose hipocampal (EH), a qual é constituída por perda neuronal de células piramidais do corno de Ammon (CA) e da camada granular do giro denteado associada à gliose (BERKOVIC, et al. 1991; SCHLINDWEIN-ZANINI et al., 2008).

Por apresentar uma grande refratariedade ao tratamento, alta incidência e gravidade, a ELT possui grande importância clínica. Pacientes com ELT geralmente apresentam crises parciais e focais simples ou complexas, que se originam em estruturas mesiais do lobo temporal, sendo as manifestações clínicas mais comuns: aura, parada comportamental, fixação do olhar, perda de contato com o meio, automatismos oroalimentares, automatismos manuais ipsilaterais e distonia ou paresia contra-lateral à zona de início ictal (KOTAGAL, 1991; WIESER, 2004), podendo também apresentar generalização secundária.

### 2.1.2. Comorbidades associadas à epilepsia

A epilepsia é uma condição complexa, que é agravada pelas diversas comorbidades associadas. Algumas alterações neurológicas e psiquiátricas, como enxaqueca e depressão (TELLEZ-ZENTENO et al., 2005), mas também condições crônicas como hipertensão, doenças cardíacas e diabetes (TRINKA, 2003).

O desenvolvimento das comorbidades diminui a qualidade de vida ou até mesmo aumenta o risco de mortalidade dos pacientes. Já é bem descrito na literatura que pacientes com epilepsia apresentam alterações autonômicas e cardíacas, assim como a maior probabilidade de morte súbita (*Sudden Unexpected Death in Epilepsy* – SUDEP) sem causa patológica ou estrutural clara (ASADI-POOYA & SPERLING, 2009; SEVCENCU & STRUIJK, 2010).

Os problemas psiquiátricos são os mais comuns, entre eles os transtornos de humor, depressão, ansiedade e até mesmo psicose, que pioram a qualidade de vida do paciente. A relação entre epilepsia e essas doenças não é bem explicada na literatura, porém, pode estar intimamente ligada ao aumento da excitabilidade e a resposta inibitória anormal a estes estímulos, compartilhando os mesmos substratos moleculares (STEVENS, 1975; HERMANN et al., 2000).

Desde muito tempo, as crises epiléticas estão correlacionadas à sexualidade. Essa corrente ganhou força na segunda metade do século XIX, quando se acreditava que a epilepsia era fruto do excesso do desejo sexual, o que levou ao uso de brometos no tratamento, uma vez que esses fármacos causavam impotência sexual. A partir de 1950, as ideias difundidas no século anterior, foram sendo abandonadas e o paciente com epilepsia foi definido como hipossexualizado, ou seja, com escassez do desejo sexual (DUNCAN, 2002).

Tem-se estudado que a disfunção sexual dos indivíduos com epilepsia está correlacionada a problemas fisiológicos e psicológicos. Morrell et al. (2001) verificaram que há pouco deslocamento do aporte sanguíneo para as regiões genitais de pacientes com ELT, homens e mulheres, quando estimulados. Além disso, é relatado que mais da metade desses pacientes possuem dificuldades de ereção, baixa lubrificação vaginal e vaginismo. Em termos psicológicos, a hipossexualidade pode ser associada à baixa autoestima, como consequência das crises. Além disso, descargas epiléticas no sistema límbico podem afetar direta ou indiretamente a excitação, bem como o uso de drogas antiepiléticas (MORRELL et al., 1996).

Os pacientes com epilepsia também não estão livres de doenças crônicas durante a vida. Essas comorbidades podem ter um grande impacto na questão farmacológica, uma vez que os medicamentos antiepiléticos podem interferir no metabolismo de outros. Pacientes hipertensos podem acabar desenvolvendo crises epiléticas, pois alterações na permeabilidade e integridade vascular, resultantes da encefalopatia hipertensiva, podem levar a pequenas áreas de edema e hemorragia, sendo capazes de gerar crises. Em casos de *Status Epilepticus* (SE), os pacientes apresentam, nos primeiros momentos, crises de hipertensão aguda e logo tem uma queda brusca de pressão arterial (BORO & HAUT, 2003; DELANTY et al., 1998).

#### 2.1.2.1. Morte súbita em epilepsia (*Sudden unexpected death in epilepsy* – SUDEP)

Embora ignorado e eventualmente negligenciado durante décadas, um dos problemas associados às síndromes epiléticas, são os altos índices de morte súbita dos pacientes, com taxas de 0.35–9.3/1000 pacientes por ano, dependendo da gravidade da epilepsia (SHORVON & TOMSON, 2011).

SUDEP é uma condição comum de morte em casos de epilepsia crônica e é definida como morte súbita, inesperada, testemunhada ou não, não traumática em pacientes com

epilepsia, com ou sem evidências de crise e excluindo histórico de SE. Além disso, no exame *post-mortem* não é encontrada qualquer evidência toxicológica ou estrutural como causa da morte (NASHEF, 1997; SURGES et al., 2009; TOMSON et al., 2008).

A morte súbita é 20 vezes mais comum em pessoas com epilepsia quando comparadas à população em geral. O risco de SUDEP pode variar dentro da população epiléptica, podendo haver pessoas mais propensas que outras (FICKER et al., 1998; TOMSON et al., 2008).

Dentre os mecanismos envolvidos nestes altos índices, a hipertensão e problemas cardiovasculares em geral, podem ser a explicação (ANNEGERS e COAN, 1999; STÖLLBERGER E FINSTERER, 2004). Baptista et al. (1998) mostraram que a elevação da pressão arterial é frequentemente observada em pacientes que apresentam epilepsia e sugerem que, a falência cardiovascular decorrente da hipertensão, poderia estar relacionada à morte súbita nestes pacientes; porém a relação causa e efeito entre problemas cardiovasculares e crises epilépticas ainda não é clara.

Uma possível associação entre Esclerose Hipocampal, patologia comum na ELT, e encefalopatia hipertensiva, foi apontada por Solinas et al. (2002), que relataram três casos de pacientes que desenvolveram ELT e Esclerose Hipocampal anos após a ocorrência de encefalopatia hipertensiva.

O conhecimento das comorbidades é importante para estabelecer perspectivas e melhorar o diagnóstico da epilepsia, pois alguns problemas podem-se sobrepor aos outros (TELLEZ-ZENTENO et al., 2005).

### 2.1.3. Modelos experimentais

O modelo experimental de epilepsia deve possuir a possibilidade de reproduzir, ou modelar, características presentes nas situações clínicas. Várias espécies de roedores (rato, camundongo e cobaia), insetos (*Drosófila*), primatas (*Papio*, *Macaca*, saguis), aves (*Gallus*) entre outros, já foram empregados em estudos para simular a epilepsia experimentalmente induzida. Utilizam-se, mais frequentemente, camundongos e ratos, por praticidade de se criar em laboratório e pelo conhecimento adquirido quanto às bases neuroanatômicas, neuroquímicas e comportamentais dos mesmos. Os modelos experimentais de epilepsia podem ser obtidos *in vivo*, ou seja, quando a indução de crises no animal são feitas por meio de agentes químicos, físicos (criogenia) ou elétricos, e este é mantido vivo para

acompanhamento da epileptogênese; e *in vitro*, como por exemplo o emprego da cultura de células nervosas para estudar substâncias ou procedimentos que possam induzir as crises (LÖSCHER et al., 1988; LÖSCHER, 1999; PITKANEN et al., 2006; PURPURA et al., 1972).

Um dos modelos mais utilizados para mimetizar a epilepsia adquirida, com lesão identificável no SNC é o modelo de epilepsia induzido por pilocarpina. A pilocarpina, agonista colinérgico muscarínico, quando administrada por via intraperitoneal em altas doses a roedores (~320 mg/kg), induz quadro de alterações comportamentais com manifestação de crises motoras límbicas, que se iniciam de 15 a 30 minutos após a administração da dose, e podem perdurar por horas (SE), caracterizando o período agudo do modelo. Caso o animal sobreviva ao quadro agudo, este passa por um período latente, no qual não apresenta crises comportamentais, por um período que dura em média 14 dias, e termina no momento em que o animal apresenta a primeira crise espontânea, sinalizando que a epilepsia foi estabelecida (CAVALHEIRO, 1995; LEITE et al., 1990; TURSKI et al., 1983).

O sistema colinérgico tem um papel no desenvolvimento da epileptogênese (MICHOTTE et al., 2000; PERSINGER et al., 2001). A acetilcolina (ACh) é um importante neurotransmissor excitatório no cérebro (OLNEY et al., 1983 e 1986; NATHANSON et al., 1999). A ativação dos receptores colinérgicos do SNC é induzida pela ACh, sendo que cerca de 99% destes receptores são muscarínicos e 1% são nicotínicos (ELGOYHEN et al., 2000). Existem 5 tipos de subtipos de receptores muscarínicos: M1, M2, M3, M4, e M5 (BONNER et al., 1987). Os receptores M1, M3 e M5 possuem efeito estimulante e estão acoplados à proteína G, ativam fosfolipase C, aumentando a produção de do segundo mensageiro inositol trifosfato (IP3) e de diacilglicerol, levando a liberação de cálcio intracelular e metabolização do ácido araquidônico. Já os receptores M2 e M4 possuem efeito inibitório, inibem a adenilil ciclase, diminuindo os níveis de AMPc (HULME et al., 1990; PERALTA et al., 1987 e 1988; WESS et al., 1990). A distribuição dos receptores muscarínicos se dá em todo corpo, desempenhando funções diversas, sendo que no SNC são importantes na memória e na fisiopatologia das doenças afetivas e na esquizofrenia (DAVIS et al., 1975 e 1980; JOPE, 1979).

Estudos *in vitro* mostram que o efeito epileptogênico da pilocarpina e de outros agentes colinérgicos ocorre devido às descargas elétricas originadas em neurônios do hipocampo, devido ao bloqueio das correntes de potássio transmembranar. Tal mecanismo poderia explicar a maciça ativação dos neurônios do hipocampo durante o SE induzido pela pilocarpina. Este SE, leva à morte celular e reorganização sináptica do circuito hipocampal, provocando mudanças epileptogênicas, tornando o dano permanente. A lesão neuronal não é

decorrente do efeito tóxico da pilocarpina, mas sim do efeito excitotóxico, envolvendo receptores para glutamato e influxo de íons cálcio. As crises observadas no SE, diferem das crises espontâneas posteriores a ele, devido à reorganização dos circuitos neuronais após a ocorrência do mesmo. As crises espontâneas, que ocorrem após o SE, são bastante similares, farmacodinamicamente, às crises límbicas (focais/parciais) originadas pelo *kindling* elétrico (modelo de indução de crises e epilepsia por estimulação elétrica de áreas no sistema límbico, amígdala e hipocampo). Assim, em ambos os modelos, a carbamazepina, o fenobarbital, a fenitoína e o ácido valpróico são efetivos, enquanto a etossuximida (utilizada para tratar ausência) é ineficaz. Achados histológicos no modelo da pilocarpina, revelam a presença de lesão neuronal em inúmeras áreas cerebrais, atingindo principalmente a formação hipocampal (regiões de CA1, CA3 e hilo do giro denteado), o córtex entorrinal e piriforme, e a amígdala, porém não se restringe a essas áreas, podendo-se verificar lesões em mais de 35 áreas cerebrais (CASTRO et al. 2011; LEITE et al., 1990; SCORZA et. al., 2009; TURSKI et al., 1983). Outros modelos bem utilizados na literatura para estudo da condição epiléptica são linhagens de animais geneticamente susceptíveis à epilepsia, particularmente aqueles que podem ter gatilhos sensoriais acústicos, as cepas audiogênicas. A primeira linhagem de animais do modelo em questão foi desenvolvida por Krushinsky et al. (1979), sendo denominada Krushinsky-Molodkina. Outra linhagem, derivada de ratos Sprague-Dawley foi desenvolvida na Universidade do Arizona (EUA), os GEPRs - *Genetic Epilepsy-Prone Rats* (Dailey e cols, 1989). Nestes últimos, houve a separação de dois fenótipos de acordo com a crise desenvolvida (os GEPRs-3, apresentando crises moderadas e os GEPRs-9, apresentando crises severas). No Brasil, foi desenvolvida a linhagem denominada WAR (*Wistar Audiogenic Rat*) no Laboratório de Neurofisiologia e Neuroetologia Experimental, do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, na Universidade de São Paulo, pelo grupo do Prof. Norberto Garcia-Cairasco (DORETTO et al., 2003).

O modelo de indução das crises epilépticas por abrasamento ou '*kindling*' foi descoberto por Goddard (1967), que utilizava estímulos elétricos, e tem sido muito utilizado como um modelo animal da ELT. Neste modelo, a resposta neuronal é alterada sem que seja necessária a existência de lesões morfológicas (SUTULA et al., 1988), como é o caso do modelo pilocarpina (MORIMOTO et al., 2004).

O *kindling* audiogênico é diferente do protocolo original de Goddard, pois no caso do *kindling* audiogênico, os animais já são susceptíveis à epilepsia e os estímulos induzem as crises, não havendo a necessidade de uso de eletrodos nem estimulação por drogas. Após estímulos sonoros repetidos, as crises tônico-clônicas generalizadas passam a possuir

características de crises do lobo temporal (crises límbicas), observadas em seres humanos, o que sugere o recrutamento de estruturas límbicas e o agravamento das crises (GARCIA-CAIRASCO et al., 1996; MARESCAUX et al., 1987; MORAES et al., 2000; NARITOKU et al., 1992; VERGNES et al., 1987).

#### 2.1.4. Anticonvulsivantes

A escolha entre diferentes anticonvulsivantes é baseada em três fatores: características clínicas (tipo de crise ou síndrome epilética) risco de efeitos adversos e custo. (DEVINSKY et al., 2000). O tratamento da epilepsia pode se basear na ação dos fármacos em vários alvos farmacológicos diferentes, entre eles: os canais para sódio, cálcio, potássio e o neurotransmissor GABA, o que permite que os fármacos desta classe sejam classificados de acordo com o alvo de ação (TEIXEIRA, 2015).

As epilepsias são, geralmente, tratadas com antiepiléticos, porém, em alguns casos, nas chamadas epilepsias farmacorresistentes, pode ser necessária a remoção cirúrgica do foco epilético. Para o tratamento, já existe uma grande quantidade de medicamentos disponíveis no mercado, sendo que a escolha irá variar de acordo com o tipo de crise, a frequência com que ocorre, a idade e estilo de vida do paciente. Os medicamentos antiepiléticos geralmente são eficazes quando administrados em monoterapia, mas admitem-se politerapias quando há a dificuldade em controlar a crise do paciente. Podem ocorrer episódios com efeitos indesejáveis ao paciente durante o tratamento, sendo comuns: cansaços, tonturas e ganho de peso; porém, quadros mais graves de reação alérgica, depressão e psicose também podem ocorrer. É fundamental o acompanhamento médico durante o tratamento; a descontinuidade do tratamento pode ser indicada pelo clínico, quando o paciente fica de dois a quatro anos livre de crises. A retirada abrupta do tratamento pode causar SE, que é considerado uma emergência clínica (FERNANDES, 2013).

##### 2.1.4.1. Carbamazepina

A carbamazepina é um antidepressivo tricíclico, descoberto pelo químico Walter Schindler na Suíça em 1953, é um dos medicamentos antiepilépticos mais utilizados no mundo, aprovada para uso pela FDA desde 1974. Algumas indicações deste fármaco são: tratamento de convulsões tônico-clônicas, transtorno de humor, nevralgia do trigêmeo entre outras (GIERBOLINI et al., 2016; TOLOU-GHAMARI et al., 2013).

O mecanismo de ação da carbamazepina baseia-se na estabilização da membrana hiperexcitada dos neurônios, por meio do bloqueio dos canais para sódio dependentes da diferença de potencial elétrico; o que mantém a despolarização, diminuindo a ativação repetida dos potenciais de ação. Desta forma, inibe as descargas neuronais repetitivas, reduzindo a propagação sináptica dos impulsos excitatórios. Além disso, a carbamazepina provoca um efeito depressivo sobre o *turnover* da dopamina e da noradrenalina, conferindo-lhe propriedades antimaniacas (GIERBOLINI et al., 2016; KESTER, KARPA & VRANA, 2012).

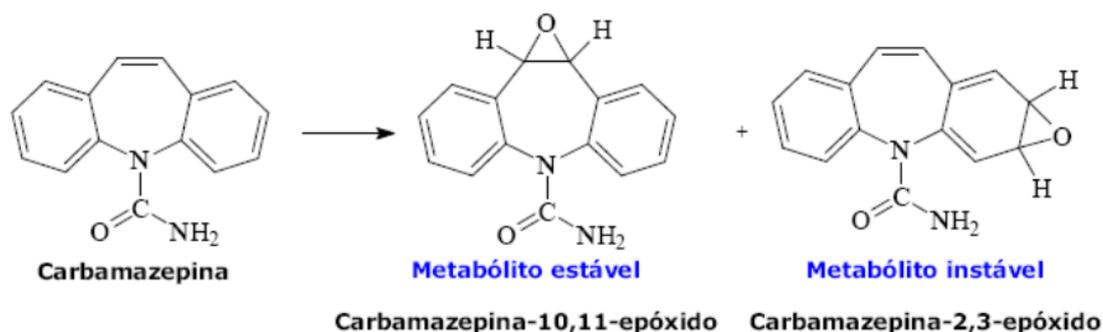
A carbamazepina é absorvida lentamente, porém, ainda existem poucos dados que correlacionem sua absorção com sua concentração no sangue, após administração oral. Após a administração via oral, atinge a concentração máxima em 4-8 horas em humanos; este tempo pode ser retardado para 24 horas quando se administra uma dose alta. É metabolizada pelo complexo enzimático CYP450 hepático, com a capacidade de induzir o seu próprio metabolismo. É substrato de CYP 1A2, 2C8, 2C9/10 e 3A3/4. A isoforma CYP3A4 é a principal via para sua biotransformação, sendo responsável por 30- 50% do total de seu *clearance* (KESTER, KARPA & VRANA, 2012; SPINA et al., 1996).

Os efeitos adversos mais frequentes são náuseas, vômitos, reações cutâneas alérgicas, problemas sanguíneos como anemia, leucopenia e trombocitopenia, embora sejam mais raros. Podem ocorrer outros efeitos, como perturbações da condução cardíaca, ataxia, sonolência, alucinações. É contraindicada em pacientes com bloqueio auriculoventricular, porfiria e durante a gravidez (GIERBOLINI et al., 2016; PELLOCK, 1987; TOLOU-GHAMARI et al., 2013).

A carbamazepina dá origem a um metabólito ativo chamado carbamazepina-10,11-epóxido (CBZ-E), que está relacionado à intoxicação do SNC e aos efeitos indesejáveis do tratamento. O uso crônico pode levar a indução do próprio metabolismo e indução de várias isoformas do citocromo CYP450 e da uridina 5'-difosfo-glucuronosiltransferase (UGT) (PATSALOS et al., 2003; ZACCARA et al., 2014).

Devido ao baixo índice terapêutico, está propensa a interações farmacológicas significativas, pois pequenas mudanças na concentração plasmática podem resultar em perda

da eficácia ou sinais de intoxicação. A inibição da CYP 3A4 e da epóxido-hidrolase, responsável pela conversão da carbamazepina-epóxido em diol inativo, e a indução de 2C19 e 3A3/4 consistem em importantes caminhos para suas interações (MARCOLIN, 2004).



**Figura 1** - estrutura química da molécula de carbamazepina e seus metabólitos.

**Fonte:** ARAÚJO et al., 2010.

## 2.2. Inibidores da Enzima Conversora da Angiotensina (iECA)

Os medicamentos inibidores da enzima conversora da angiotensina (iECA) foram descobertos na década de 60 a partir de venenos de serpentes que intensificavam as respostas à bradicinina, inibindo a cinase II, hoje conhecida como enzima conversora da angiotensina, estes compostos foram chamados de fatores potencializadores da bradicinina. Verificou-se que tais fatores baixavam a pressão arterial em pacientes com hipertensão essencial (BYERS & WOLFENDER, 1972).

O primeiro iECA a ser eficaz por via oral foi o D-3-mercaptopetilpropanoil-L-prolina, mais conhecido como captopril que começou a ser comercializado na década de 80, porém, com alguns efeitos colaterais relevantes. Os fármacos dessa classe agem, fundamentalmente, pela inibição da enzima conversora da angiotensina, bloqueando a transformação da angiotensina I em II no sangue e nos tecidos, embora outros fatores possam estar envolvidos neste mecanismo de ação. (SARKAR et al., 2006).

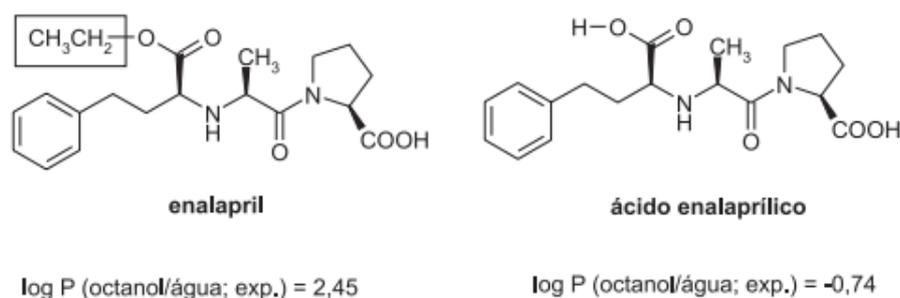
São eficazes no tratamento da hipertensão arterial, reduzindo a morbidade e a mortalidade por acidentes cardiovasculares nos hipertensos, pacientes com insuficiência cardíaca, pacientes com infarto agudo do miocárdio, em especial quando apresentam baixa fração de ejeção, pacientes de alto risco para doença aterosclerótica, sendo também úteis na prevenção secundária do acidente vascular cerebral (ARGAÑARAZ et al., 2008).

A cascata bioquímica do sistema renina angiotensina (SRA) se inicia com a liberação do angiotensinogênio. Essa proteína de alto peso molecular é então clivada pela renina formando o decapeptídeo angiotensina I (AngI). A enzima conversora da angiotensina e outras enzimas como quinases, em menor proporção, clivam esse peptídeo formando a angiotensina II (AngII), um octapeptídeo ativo que tem alta afinidade pelos receptores AT1 e AT2. O receptor AT1, uma vez ligado a AngII, ativa uma série de cascatas de sinalização intracelular, que em última instância provoca a vasoconstrição generalizada, caracterizando a hipertensão (ERDOS & SKIDGEL, 1990).

Almeida et al. (2012) verificaram, que, pacientes com epilepsia do lobo temporal (ELT) apresentam um aumento na expressão de receptores de angiotensina II, AT1 e AT2, no cérebro, o que comprova a relação entre a ELT com o sistema renina-angiotensina-aldosterona.

### 2.2.1. Maleato de enalapril

O maleato de enalapril é um iECA, que apresenta poucos efeitos colaterais e pode ser administrado em doses menores e menos frequentes; é um dos fármacos mais utilizados para tratamento da hipertensão. É um pró-fármaco hidrolisado por esterases no fígado, produzindo o enalaprilato, o qual é um inibidor altamente potente da enzima conversora da angiotensina e, portanto, um importante anti-hipertensivo. O enalaprilato contém um substituto prolina e difere do captopril por ser um análogo de um tripeptídeo, em lugar de um dipeptídeo. (MACFADYEN et al. 1993; WANG et al., 2006).



**Figura 2** - Estruturas químicas do maleato de enalapril e seu metabólito, enalaprilato.

**Fonte:** PEREIRA, D. G.; 2007.

O enalaprilato sofre rápida absorção quando administrado por via oral com biodisponibilidade de 60%, a qual não é reduzida pela presença dos alimentos. As concentrações plasmáticas máximas do enalapril e do enalaprilato são alcançadas em 1 h e de 3- 4 h, respectivamente. O enalaprilato tem taxa de ligação às proteínas plasmáticas de aproximadamente 50%, no entanto essa ligação depende da sua concentração. O enalapril apresenta meia-vida de 1,3 h, enquanto o enalaprilato, devido a sua forte ligação à enzima conversora da angiotensina, tem uma meia-vida plasmática de 11h. Quase todo o fármaco é eliminado pela urina na forma de enalapril inalterado ou enaprilato. A dose oral de enalapril varia de 2,5 -40 mg/dia (em dose única ou fracionada), sendo que a sua dose inicial definida é de 10 mg (MACFADYEN et al. 1993).

### 3. JUSTIFICATIVA

O tratamento da epilepsia muitas vezes não atinge os objetivos, não trazendo melhoras ao paciente. Não se sabe, porém, se a patologia afeta a farmacocinética e ou o metabolismo dos fármacos, pois não existem estudos clínicos ou experimentais comparando pacientes epiléticos e não epiléticos. Desta maneira, este estudo, visa, experimentalmente, elucidar se a predisposição genética para a epilepsia afeta a farmacocinética de dois fármacos bastante utilizados na patologia, a carbamazepina e o enalapril; o primeiro como anticonvulsivante propriamente dito e o segundo por estar ligado à cascata do sistema renina-angiotensina-aldosterona, a qual, recentemente, descobriu-se estar ligada às patologias no sistema nervoso central.

## 4. OBJETIVO

A seguir serão listados o objetivo geral e os objetivos específicos.

### 4.1. Objetivo geral

Avaliar o papel da predisposição genética para a epilepsia na farmacocinética da carbamazepina e enalapril *in vivo*.

### 4.2. Objetivos específicos

- Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para a determinação de carbamazepina e enalapril em plasma de ratos por UPLC;
- Avaliar a farmacocinética dos medicamentos carbamazepina e enalapril, em associação ou monoterapia, em animais WAR e controle.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

A seguir estão listados os materiais e as metodologias adotadas neste estudo.

### 5.1. Fármacos

Os fármacos que foram administrados aos animais foram obtidos por duas formas: o maleato de enalapril foi obtido em farmácia de manipulação, isento de excipientes, com pureza maior que 99%. A carbamazepina foi obtida comercialmente (Tegretol<sup>®</sup>) na forma de suspensão, 20 mg/mL, do laboratório Novartis<sup>®</sup> (São Paulo, Brasil). Os anestésicos cloridrato de cetamina 0,1% (Dopalen<sup>®</sup>) e a xilazina 2% (Anesadan<sup>®</sup>) foram obtidos comercialmente, do laboratório Ceva<sup>®</sup> (Paulínea, Brasil). O anestésico midazolam (Dormonid<sup>®</sup>, 5 mg/mL) foi obtido do laboratório Roche<sup>®</sup> (Rio de Janeiro, Brasil). O hidrocloreto de pilocarpina e o paraldeído foram obtidos da empresa Sigma-Aldrich<sup>®</sup> (Steinheim, Alemanha).

### 5.2. Substâncias químicas de referência

As análises foram realizadas com padrões primários de maleato de enalapril, carbamazepina e diazepam todos adquiridos da Sigma-Aldrich<sup>®</sup> (Steinheim, Alemanha), com grau de pureza superior a 99% todos dentro do prazo de validade.

### 5.3. Solventes e reagentes

Para a realização da validação das análises das amostras, bem como validação da metodologia, foram utilizados os seguintes solventes e reagentes: acetato de etila grau HPLC, metanol grau HPLC, éter-dietílico grau HPLC, acetonitrila grau HPLC, obtidos do laboratório VETEC (São Paulo, Brasil); formiato de amônio obtidos da Sigma-Aldrich<sup>®</sup> (Steinheim, Alemanha), cloreto de sódio obtido da Indústria Impex<sup>®</sup> (São José dos Campos, Brasil), água ultrapura (milli-Q, Millipore<sup>®</sup> - Molsheim, França).

#### 5.4. Equipamentos e materiais

As análises foram realizadas em UPLC-MS/MS Shimadzu LCMS-8030 (Kyoto, Japão), constituído por bombas LC-20 AD, injetor automático SIL-20 AHT, forno para coluna CTO-20-A, controladora CBM-20A, detector triplo quadrupolo e software para integração LabSolutions 5.42 (Shimadzu®). Além do UPLC-MS/MS, foram utilizados diversos tipos de equipamentos e materiais (Tabela 1).

**Tabela 1** - Equipamentos e materiais utilizados.

Equipamento/ acessório	Marca	Modelo/ descrição
Balança analítica	<i>Kern</i>	410
Agitador vertical	<i>IKA</i>	VIBRAX VXR basic
Banho Ultrassônico	<i>Unique</i>	USC-2800 <sup>a</sup>
Banho de água	Novatécnica	NT 265
pHmetro	<i>Tecnopon</i>	-
Bomba de vácuo	<i>Sparmax</i>	New pump
Centrífuga	Novatécnica	NT-811
Concentradora de amostras	<i>Labconco</i>	CentriVap
Micropipetas	<i>Digipet/ Kacil/ Pipet express</i>	50, 200 e 1000 µL
Balões volumétricos	<i>Pyrex</i>	10, 25, 250, 500, 1000 mL
Provetas	<i>Pyrex</i>	50, 100, 500 mL
Coluna	<i>Shimadzu</i>	XR-ODS/C18/ 100mm x 3mm x2µm
Seringa	<i>Descarpack</i>	1 mL
Agulha de gavagem	<i>Insight</i>	IC-810
Guilhotina para roedores	<i>Insight</i>	EB-271
Tubos de silicone	<i>VWR International</i>	0,50 X 0,93 X 0,20 mm
Selante de silicone	<i>Dow corning</i>	768

**Fonte:** Do autor.

#### 5.5. Análise da carbamazepina e do enalapril em plasma

### 5.5.1. Soluções-padrão e reagentes

Foram preparadas soluções-estoque do padrão de carbamazepina (1mg/mL), enalapril (1mg/mL) e padrão interno (PI) diazepam (1mg/mL) em metanol. As soluções de trabalho foram preparadas para carbamazepina e enalapril, para construção das curvas analíticas e controles de qualidade em *pool* de plasma branco, e para o diazepam utilizado como PI. As concentrações de solução de trabalho de carbamazepina e do enalapril foram definidas com base nos estudos de Ates et. al. (2007), Wang et. al. (2007) e Beig et. al. (2013) e preparadas a partir de solução mãe em metanol. O PI foi diluído e utilizado na concentração de 100 ng/mL em metanol. A curva analítica foi construída por meio do enriquecimento de alíquotas de 200  $\mu$ L de plasma com 50  $\mu$ L de cada solução-padrão, resultando em concentrações plasmáticas de 1, 5, 10, 50, 100, 200, 500 e 1000 ng/mL e 1, 5, 10, 50, 100, 150, 200, 300 ng/mL para o enalapril. Os controles de qualidade em 1, 500 e 1000 ng/mL para carbamazepina e 1, 150 e 300 ng/mL para enalapril.

### 5.5.2. Preparo de amostra e análise cromatográfica

A determinação da carbamazepina e do enalapril em plasma de rato foi adaptada a partir dos estudos descritos por Ates et. al. (2007), Wang et. al. (2007) e Beig et al. (2013), utilizando extração líquido-líquido para preparo das amostras e separação/quantificação por UPLC. Os parâmetros do UPLC foram otimizados pelo equipamento. Em suma, a 200  $\mu$ L de plasma adicionam-se 25  $\mu$ L de PI (500 ng/mL), 0,1g de cloreto de sódio (NaCl), 200  $\mu$ l de tampão acetato (1M) pH= 4,6 e 3 mL de solução éter dietílico: acetato de etila (6:4, v/v). Agitou-se por 15 minutos em agitador vertical (1500 rpm) e centrifugou-se a 1800 g por 15 minutos. Alíquotas de 2 mL da fase orgânica foram levadas à secura, em concentradora de amostras, em temperatura de 60°C, ressuspendidas em 200  $\mu$ L de fase móvel (acetonitrila:tampão formiato de amônio 2mM, 75:25v/v) para posterior injeção de 100  $\mu$ L no UPLC-MS/MS. O método bioanalítico desenvolvido que melhor se enquadrou nos parâmetros de validação, está descrito na Tabela 2.

**Tabela 2** - Condições cromatográficas do método bioanalítico desenvolvido para quantificação de enalapril e carbamazepina em plasma por UPLC-MS/MS.

Parâmetros	Descrição
Técnica bioanalítica	UPLC- MS/MS
Detecção	Enalapril: 377,90>233,90; 377,90>91,10; 377,9>117,05 Carbamazepina: 236,80>193,90; 236,80>193,00; 236,80>191,85 PI: 285,00>154,00; 285,00>192,95; 285,00>221,95
Coluna analítica	XR-ODS/C18/ Phenyl
Fase móvel	Acetonitrila: Tampão formiato de amônio 2 mM - pH: 2,4 (75:25 v/v)
Vazão da fase móvel	0,2 mL/min
Volume de injeção	100 µL
Linearidade	Enalapril: 1 - 300 ng/mL Carbamazepina: 1 -1000 ng/mL
Tempos de retenção	Enalapril: 3,06 min. Carbamazepina: 3,50 min. Diazepam: 4,34 min.
Tempo de análise	6,01 min.
Tipo de integração	Base-a-base
Equação da Curva	$y = ax + b$

**Fonte:** Do autor.

## 5.6. Validação do método bioanalítico

Com a finalidade de demonstrar que o método desenvolvido é adequado para a análise proposta foi realizada a validação analítica. O método foi validado de acordo com a resolução RDC n.º 27, de 17 de maio de 2012 e os parâmetros avaliados foram: linearidade, limite

inferior de quantificação (LIQ), limite de detecção, efeito residual, precisão, exatidão e estabilidade.

#### 5.6.1. Linearidade

Na confecção das curvas analíticas, adicionou-se 50 µL de padrão de enalapril e carbamazepina a 200µL de plasma branco em oito concentrações distintas, sendo elas 1, 10, 50, 200, 500 e 1000 ng/mL para a carbamazepina e 1, 5, 10, 50, 150 e 300 ng/mL para o enalapril, e 25 µL de PI na concentração de 100 ng/mL. Os calibradores foram processados conforme descrito no item 5.5.2.

#### 5.6.2. Limite Inferior de Quantificação (LIQ)

O LIQ foi determinado através da aplicação do método de extração de tal forma que o analito fosse quantificado na menor concentração possível com coeficiente de variação (CV) ≤ 20%. Sua determinação foi realizada por meio de 6 replicatas, considerando sua adequada visualização cromatográfica.

#### 5.6.3. Limite de detecção

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

Esse parâmetro pode ser calculado segundo a fórmula:

$$LD = \frac{D_{pa} \times 3}{IC}$$

Onde,

Dpa: desvio padrão do intercepto com o eixo Y da curva analítica

IC: inclinação da curva analítica

#### 5.6.4. Efeito residual

O efeito residual (*carryover*) é o efeito causado por contaminação proveniente de análises anteriores, as quais podem levar ao aparecimento ou aumento do sinal do fármaco ou PI. Para análise, realizaram-se três injeções da mesma amostra branco, sendo uma antes e duas após a injeção do limite superior de quantificação (LSQ) de cada analito.

#### 5.6.5. Efeito matriz

O efeito matriz é o efeito na resposta do analito ou PI causado pelos componentes da matriz biológica. Para cálculo do efeito 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).

O fator de matriz normalizado foi calculado conforme fórmula a seguir:

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

#### 5.6.6. Precisão e exatidão

A precisão avalia, em idênticas condições do ensaio, o grau de repetibilidade entre os resultados individuais de análises quando o processo é aplicado diversas vezes numa mesma amostra homogênea. A precisão intracorrída foi avaliada em uma mesma corrida (n=6) e a

intercorridas em três dias diferentes. Este parâmetro é expresso como coeficiente de variação (CV) ou desvio padrão relativo (DPR).

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

Para este estudo foram realizadas injeções de amostras nas concentrações de 1 ng/mL correspondente ao controle de qualidade de baixa concentração (CQB), 150 ng/mL correspondente ao controle de qualidade de média concentração (CQM) e 300 ng/mL correspondente ao controle de qualidade de alta concentração (CQA) para o enalapril. Já para a carbamazepina, as concentrações foram 1 ng/mL correspondente ao controle de qualidade de baixa concentração (CQB), 500 ng/mL correspondente ao controle de qualidade de média concentração (CQM) e 1000 ng/mL correspondente ao controle de qualidade de alta concentração (CQA).

A exatidão expressa a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor nominal, da mesma forma que a precisão, estabelecendo condições idênticas de ensaio, em uma amostra homogênea. A exatidão intracorridas e a exatidão intercorridas foi avaliada por meio do cálculo do Erro Padrão Relativo (EPR) conforme a fórmula abaixo. A exatidão intracorrida foi avaliada em um mesmo dia e a intercorridas em três dias diferentes. Não se admitem valores acima de 15% do valor nominal, com exceção do LIQ para o qual o valor estabelecido é de 20%.

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

Para a avaliação dos parâmetros precisão e exatidão, foram analisadas amostras fortificadas com padrões de enalapril e carbamazepina em concentrações descritas acima após sofrerem extração líquido-líquido.

#### 5.6.7. Estabilidade

Para assegurar que a estabilidade do analito foi mantida nas condições de preparo, análise e estocagem das amostras, foram realizados testes de estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento, estabilidade de curta duração e estabilidade das amostras processadas.

A estabilidade é demonstrada quando não se observar desvio superior a 15 % (quinze por cento) da média das concentrações obtidas com relação ao valor nominal (BRASIL, 2012).

#### 5.6.7.1. Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento

Frequentemente, as amostras do estudo podem ser congeladas e descongeladas para re-análises. Por esse motivo, deve ser avaliada a estabilidade do analito na matriz biológica após, no mínimo três ciclos de congelamento e descongelamento. Amostras de plasma (200  $\mu$ L) fortificadas nas concentrações de 1 e 1000 ng/mL (n=5 para cada concentração) para carbamazepina e 1 e 300 ng/mL (n=5 para cada concentração) para o enalapril foram congeladas por 24 horas. Após esse período, foram descongeladas em temperatura ambiente e novamente congeladas por 12 horas. O processo foi repetido por mais 12 horas de congelamento e após o descongelamento total das amostras, procedeu-se à extração e análise em UPLC-MS/MS. Os resultados obtidos foram comparados com amostras recém-preparadas.

#### 5.6.7.2. Estabilidade de curta duração

Amostras fortificadas com padrões (n=6, para cada concentração) nas concentrações de 1 e 1000 ng/mL para carbamazepina e 1 e 300 ng/mL para o enalapril foram deixadas em repouso nas condições normais do laboratório (temperatura, umidade e luminosidade) e durante o processo de preparo das amostras (6 h). Em seguida, foram submetidas à extração líquido-líquido e analisadas em UPLC-MS/MS. Os resultados obtidos foram comparados com amostras recém-preparadas.

### 5.6.7.3. Estabilidade das amostras processadas

Alíquotas de plasma branco foram fortificadas com padrões (n=6 para cada concentração) nas concentrações de 1 e 1000 ng/mL para carbamazepina e 1 e 300 ng/mL para o enalapril, foram processadas por extração líquido-líquido e mantidas sob as mesmas condições das amostras em estudo. O período foi superior ao intervalo de tempo compreendido entre o término de preparo das amostras e o final da corrida analítica mais longa. Na sequência, ocorreu análise por UPLC-MS/MS. Os resultados obtidos foram comparados com amostras recém-preparadas.

## 5.7. Estudos experimentais

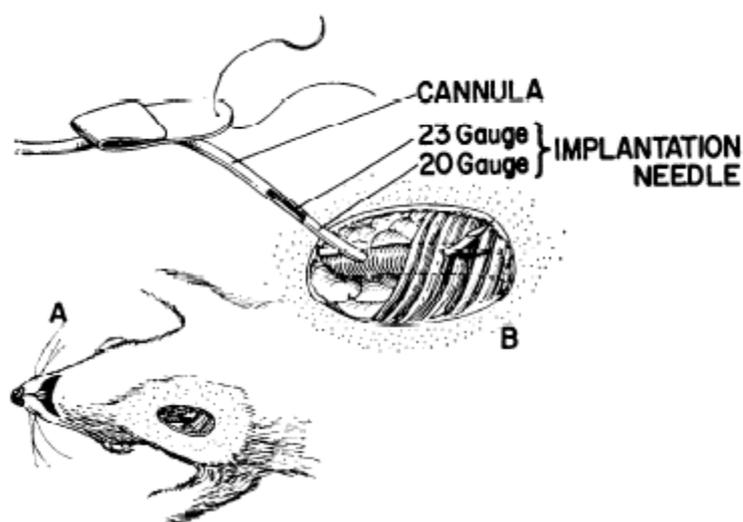
A seguir estão listados a metodologia dos estudos experimentais.

### 5.7.1. Canulação da veia jugular

Para a análise farmacocinética foram utilizados ratos Wistar (grupo controle), fornecidos pelo biotério central da Universidade Federal de Alfenas e ratos WAR (Wistar Audiogenic Rats), fornecidos pelo Laboratório de Neurofisiologia e Neuroetologia Experimental do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso Animal da Universidade Federal de Alfenas, com o número de registro 577/2014 (Anexo I). Os animais, após período de aclimação, foram pesados e selecionados os animais na faixa de 275–375g para serem submetidos à cirurgia de canulação da veia jugular.

Os animais foram anestesiados com a mistura de cloridrato de cetamina (50 mg/kg), xilazina (25 mg/kg) e midazolam (5mg/kg) por via intraperitoneal. A técnica foi adaptada de Hans & Ojeda (1974). Após a anestesia, os animais foram tricotomizados na região clavicular, a incisão foi feita na região onde a veia jugular se insere atrás do músculo peitoral maior. Uma agulha adaptada, acoplada à cânula foi empurrada para o lúmen da veia até a inserção no músculo, passando através do mesmo. Após isso, a agulha foi retirada e a cânula puxada para dentro do músculo e sob pressão suave, colocada no interior do vaso. A cânula foi suturada no

músculo para o ancoramento da mesma. A outra extremidade foi passada via subcutânea, para a região nugal do animal, onde ela ficou exteriorizada, e, com um nó para evitar o extravasamento de sangue. A região clavicular do animal foi suturada e limpa para evitar infecção. O animal ficou em sala aquecida até a sua recuperação.



**Figura 3** - Desenho esquemático da cirurgia de canulação da veia jugular.

**Fonte:** Hans & Ojeda, 1974.

5.7.1.1. Grupos de animais controle (Ratos Wistar; n=6) e Grupos de animais epiléticos (Ratos WAR; n=6).

- Grupo Carbamazepina: Os animais em estado de jejum de 12 horas receberam por via oral (gavagem) carbamazepina (Tegretol<sup>®</sup>) na dose de 25 mg/kg (BEIG, 2013).

- Grupo Enalapril: Os animais em estado de jejum de 12 horas receberam por via oral (gavagem) enalapril racêmico dissolvido em água na dose de 30 mg/kg (NUNEZ, 1997).

- Grupo associação Carbamazepina - Enalapril: Os animais em estado de jejum de 12 horas receberam por via oral (gavagem) a carbamazepina (Tegretol<sup>®</sup>) na dose de 25 mg/kg (BEIG, 2013), além de enalapril racêmico por via oral (gavagem) dissolvido em água na dose de 30 mg/kg (NUNEZ, 1997).

Os mesmos três grupos: Carbamazepina, enalapril e associação carbamazepina e enalapril foram repetidos para os ratos WAR, totalizando seis grupos experimentais. As doses, coletas de sangue, e o “n” seguiram o mesmo descrito acima para animais controle.

As amostras de sangue (500  $\mu$ L) foram colhidas pela cânula implantada nos animais nos tempos 5, 10, 20, 40 minutos, 1; 1,5; 2; 3; 4 e 6 horas após a administração em todos os grupos. Foi realizada a reposição com salina após cada coleta. A heparina foi utilizada como anticoagulante. Foram utilizados 6 animais para cada grupo. Os plasmas obtidos foram armazenados a  $-70^{\circ}\text{C}$  até a análise conforme o item 5.5.2. Após as coletas os animais foram sacrificados por decapitação.

#### 5.8. Análise farmacocinética

A análise farmacocinética foi realizada utilizando-se o software WinNonlin<sup>®</sup> versão 4.0 (Pharsight Corp, Mountain View, Califórnia, EUA). Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados com base nas concentrações plasmáticas obtidas experimentalmente. Os dados de concentração plasmática *versus* tempo, após a administração oral dos fármacos foram analisados empregando-se o modelo monocompartimental, que foi o que melhor se adequou aos dados obtidos. A área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo ( $\text{AUC}^{0-\infty}$ ) foi determinada pelo método linear trapezoidal de tempo zero até a última amostra coletada e extrapolada até o infinito dividindo-se a última concentração quantificada pela constante de velocidade de eliminação.

O software WinNonlin<sup>®</sup> gerou as estimativas iniciais e os limites superiores e inferiores para a correta estimativa final dos parâmetros farmacocinéticos (GABRIELSON; WEINER, 2000). A estimativa final inclui o *clearance* total aparente ( $\text{Cl}_{\text{T/f}}$ ).

#### 5.9. Análise estatística

Os testes estatísticos foram realizados com o auxílio do programa GraphPad Instat<sup>®</sup> (Califórnia, EUA) para a obtenção da mediana e do intervalo de confiança 95% (IC 95%).

O teste de Mann-Whitney bicaudal para dados não pareados foi empregado para comparar os parâmetros farmacocinéticos; no teste estatístico o nível de confiança foi fixado  $p \leq 0,05$ .

## 6. RESULTADOS

Aqui serão apresentados os resultados da metodologia analítica e do estudo experimental.

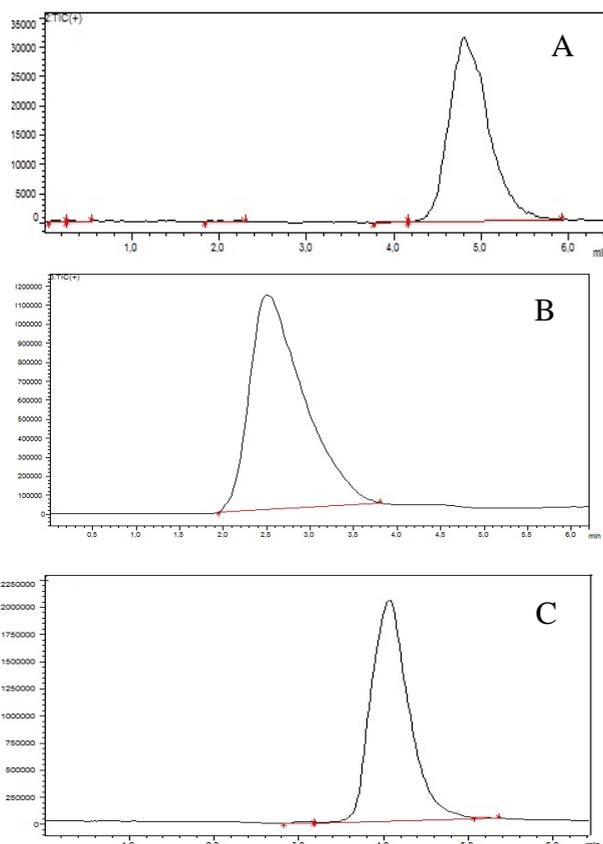
### 6.1. Desenvolvimento e validação do método bioanalítico para quantificação de carbamazepina e enalapril em plasma de rato.

Na otimização das condições da análise foram testados vários parâmetros diferentes para a extração e para a cromatografia, dentre elas pH de extração (testes variaram de 2,4 a 5,2), líquido extrator (podendo citar acetonitrila, éter etílico, acetato de etila e clorofórmio), fase móvel e sua vazão, uso do padrão interno (foram testados fenobarbital, amiodarona, cetoconazol, diazepam), entre outras.

As condições adequadas foram: pH de extração de 4,6, líquido extrator composto por éter etílico: acetato de etila (60:40 v/v), fase móvel composta por acetonitrila: tampão formiato de amônio 2 mM pH 2,4, com vazão de 0,2 mL/min, o padrão interno escolhido foi o diazepam, na concentração de 100 ng/mL e o tempo de análise estabelecido foi de 6,01 minutos.

A análise da carbamazepina e do enalapril em plasma de ratos foi realizada após o preparo de amostra por extração líquido-líquido conforme o item 5.5.2. A separação dos compostos foi obtida utilizando coluna *Shim-pack ODS Phenyl*<sup>®</sup> 100 mm x 3,0 mm x 2,0 µm (C18) com fase móvel constituída por acetonitrila: tampão formiato de amônio 2 mM, pH 2,4 (75:25 v/v).

A Figura 4 mostra o cromatograma dos analitos carbamazepina, diazepam e enalapril.



**Figura 4** - Análise cromatográfica do diazepam (A), do enalapril (B) e da carbamazepina (C).

**Fonte:** Do autor.

### 6.1.1. Linearidade

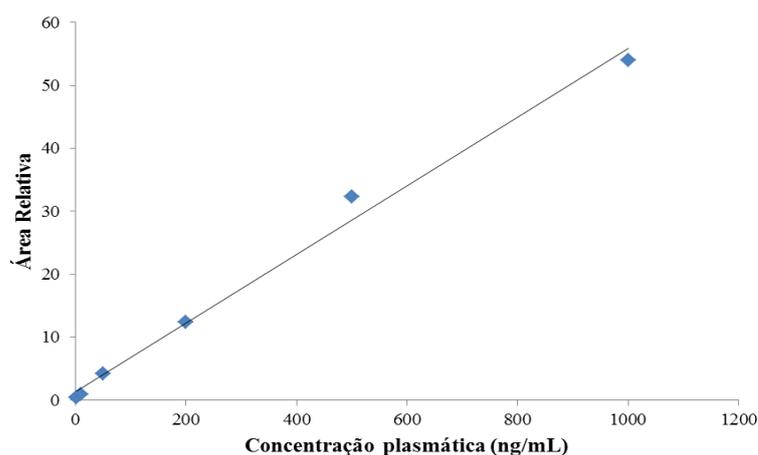
De acordo com a RDC 27/2012, alguns critérios devem ser considerados para análise e aceitação dos pontos da curva analítica, a menor concentração nominal deve ter desvio menor ou igual a 20%, as demais concentrações não devem ter desvio superior a 15% em relação ao valor nominal. Além disso, é necessário que no mínimo 75% dos padrões de calibração sejam aprovados nas exigências acima e que no mínimo seis padrões de concentrações distintas, assim como o limite inferior de detecção (LIQ) e o limite superior de quantificação (LSQ) também atendam as exigências anteriores. A relação entre concentração e resposta foi definida por meio de uma curva analítica contendo seis concentrações distintas para a carbamazepina, variando de 1 a 1000 ng/mL em plasma e outra curva com seis concentrações distintas para o enalapril, variando de 1 a 300 ng/mL. Na confecção de uma das curvas analíticas, adicionou-se padrão de carbamazepina ao plasma branco de ratos não tratados, em

seis concentrações distintas (1, 10, 50, 100, 200, 500 e 1000 ng/mL) e também adicionou-se padrão de enalapril em seis concentrações distintas (1, 5, 10, 50, 150, 300 ng/mL) e PI na concentração de 50 ng/mL, realizando três repetições para cada ponto. Na análise da curva analítica, também foram incluídas amostras de plasma branco e plasma branco adicionadas de PI (amostra zero). Os parâmetros relativos à curva analítica do método para quantificação de carbamazepina e enalapril em plasma de rato por UPLC-MS/MS na faixa de concentração de 1 a 1000 ng/mL e 1 a 300 ng/mL, respectivamente, são demonstrados nas Tabelas 3 e 4, respectivamente. As Figuras 5 e 6 representam as curvas analíticas resultante da análise de três curvas de calibração realizadas em dias distintos, para cada ponto foram feitas três réplicas.

**Tabela 3-** Parâmetros relativos à curva analítica do método analítico para a quantificação de carbamazepina em plasma de rato por UPLC-MS/MS na faixa de concentração de 1 a 1000 ng/mL.

Parâmetro	Valor
Coefficiente angular (a)	0,054
Coefficiente linear (b)	1,403
Coefficiente de correlação linear ( $r^2$ )	0,992

Fonte: Do autor.



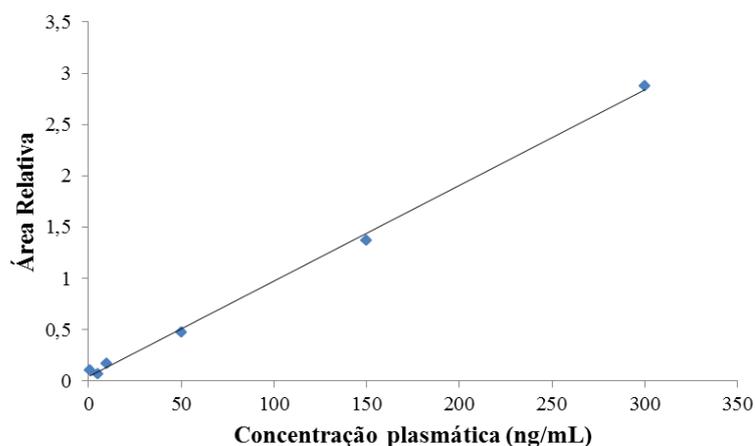
**Figura 5 -** Curva analítica da carbamazepina em plasma de rato.

Fonte: Do autor.

**Tabela 4** - Parâmetros relativos à curva analítica do método analítico para a quantificação de enalapril em plasma de rato por UPLC-MS/MS na faixa de concentração de 1 a 300 ng/mL.

Parâmetro	Valor
Coefficiente angular (a)	0,009
Coefficiente linear (b)	0,044
Coefficiente de correlação linear ( $r^2$ )	0,998

**Fonte:** Do autor.



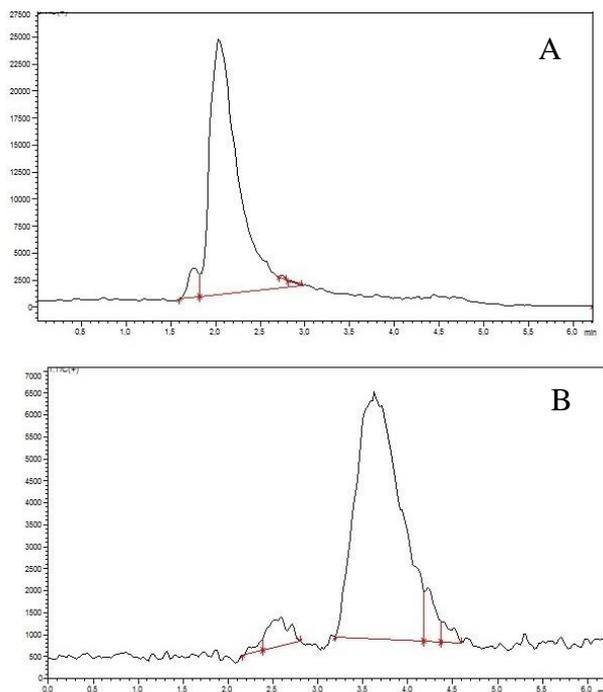
**Figura 6** - Curva analítica do enalapril em plasma de rato.

**Fonte:** Do autor.

O método mostrou-se linear tanto para a carbamazepina na faixa de concentração de 1 a 1000 ng/mL com coeficiente de regressão linear ( $r$ ) 0,99; quanto para o enalapril na faixa de concentração 1 a 300 ng/mL com coeficiente de regressão linear ( $r$ ) de 0,99.

#### 6.1.2. Limite inferior de quantificação (LIQ)

O limite de quantificação obtido na metodologia desenvolvida foi de 1 ng/mL para os dois analitos, com coeficiente de variação  $\leq 20\%$ , e apresentou precisão e exatidão satisfatórias, conforme a Tabela 5. A Figura 7 mostra o cromatograma do LIQ.



**Figura 7** - Análise cromatográfica do LIQ do enalapril (A) e da carbamazepina (B).

**Fonte:** Do autor.

**Tabela 5** - Limite de quantificação para carbamazepina e enalapril em plasma de ratos.

		Carbamazepina	Enalapril
Intracorridas n=6	Precisão (CV%)	8,59	12,18
	Exatidão (Inexatidão%)	3,27	4,08
Intercorridas n= 3 (dias)	Precisão (CV%)	13,38	3,75
	Exatidão (Inexatidão%)	10,52	5,07

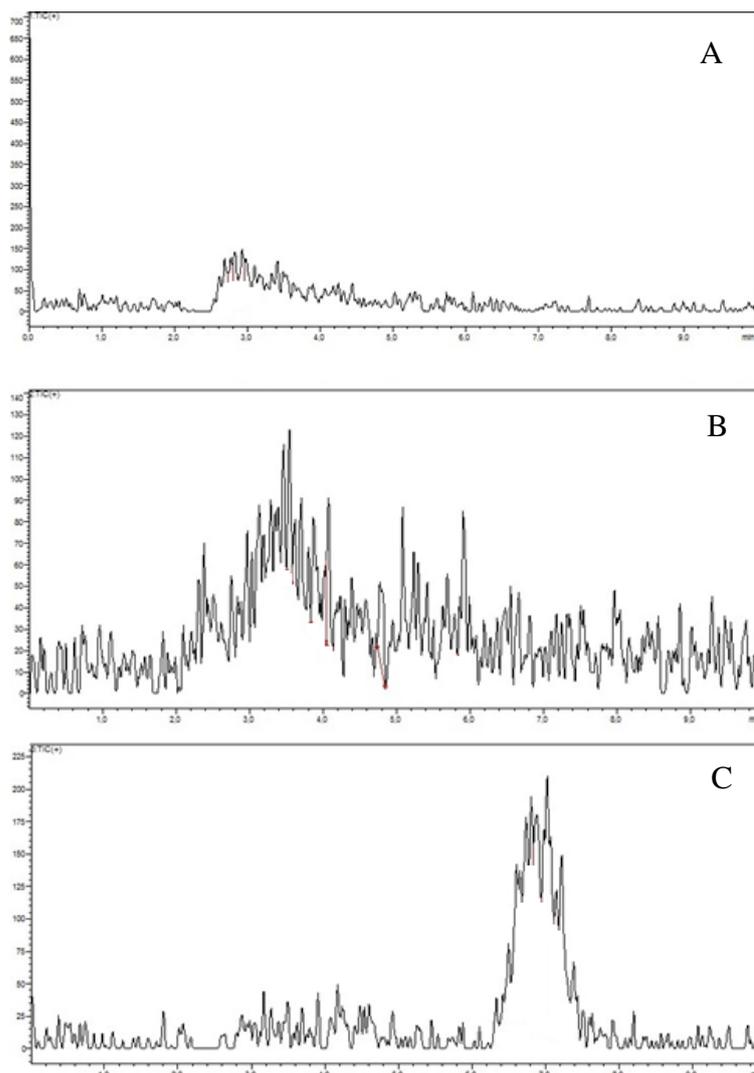
CV= Coeficiente de variação [(SD/média)x100]

% Inexatidão = [(C<sub>obs</sub> - C<sub>adicionada</sub>)/C<sub>adicionada</sub>] $\times$ 100

**Fonte:** Do autor.

### 6.1.3. Efeito residual

Não houve efeito residual nos tempos de retenção dos analitos, como pode ser observado na Figura 8, ressalta-se que a escala está com valores baixos.



**Figura 8** - Cromatograma do ensaio de efeito residual da carbamazepina (A), do diazepam (B) e do enalapril (C).

**Fonte:** Do autor.

#### 6.1.4. Efeito matriz

Através da análise de triplicatas para cada concentração, CQA e CQB, para cada um dos fármacos, foram calculados os coeficientes de variação pelo fator de matriz normalizado. Os resultados estão nas Tabelas 6 e 7.

**Tabela 6** - Efeito matriz referente ao método analítico para quantificação de carbamazepina em plasma de ratos.

Concentração	CQB (1 ng/mL)	CQA (1000 ng/mL)
CV(%)	3,78	14,39

CV= Coeficiente de variação [(SD/média)x100]

Fonte: Do autor.

**Tabela 7** - Efeito matriz referente ao método analítico para quantificação de enalapril em plasma de ratos.

Concentração	CQB (1 ng/mL)	CQA (300 ng/mL)
CV(%)	11,49	12,16

CV= Coeficiente de variação [(SD/média)x100]

Fonte: Do autor.

#### 6.1.5. Precisão e exatidão

Foi determinada a precisão e exatidão intracorridas e intercorridas para os controles, como consta na Tabela 8. Os resultados de precisão e exatidão estão de acordo com os desvios aceitos pela RDC 27/2012 (BRASIL, 2012).

**Tabela 8** - Precisão e exatidão intracorridas e intercorridas referente ao método analítico para a determinação de carbamazepina em plasma de ratos.

		CQB	CQM	CQA
Intracorridas n=6	Precisão (CV%)	14,41	13,38	6,38
	Exatidão (Inexatidão%)	10,07	8,00	6,90
Intercorridas n= 3 (dias)	Precisão (CV%)	9,01	4,31	9,31
	Exatidão (Inexatidão%)	5,47	1,33	1,37

CV= Coeficiente de variação [(SD/média)x100]

% Inexatidão = [(C<sub>obs</sub> - C<sub>adicionada</sub>)/C<sub>adicionada</sub>] $\times$ 100

Fonte: Do autor.

### 6.1.6. Estabilidade

#### 6.1.6.1. Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento

As amostras submetidas aos ciclos de congelamento e descongelamento mantiveram-se estáveis. Os resultados obtidos foram comparados com amostras de controle de qualidade recém preparadas, nas concentrações baixa e alta conforme demonstram as Tabelas 9 e 10.

**Tabela 9** - Resultados referentes às amostras do teste de estabilidade da carbamazepina em plasma de rato submetidas a sucessivos ciclos de congelamento e descongelamento.

Amostra	CQB RP	CQB 3° Ciclo	CQA RP	CQA 3° Ciclo
Média	1,02 ng/mL	0,87 ng/mL	1005 ng/mL	974 ng/mL
CV (%)	4,30	14,38	5,70	11,50

CV= Coeficiente de variação [(SD/média)x100]

**Fonte:** Do autor.

**Tabela 10** - Resultados referentes às amostras do teste de estabilidade de enalapril em plasma de rato submetidas a sucessivos ciclos de congelamento e descongelamento.

Amostra	CQB RP	CQB 3° Ciclo	CQA RP	CQA 3° Ciclo
Média	1,2 ng/mL	0,92 ng/mL	309 ng/mL	289 ng/mL
CV (%)	2,43	13,00	7,94	12,70

CV= Coeficiente de variação [(SD/média)x100]

**Fonte:** Do autor.

#### 6.1.6.2. Estabilidade de curta duração

As amostras mostraram-se estáveis em ambas as concentrações, baixa e alta conforme as Tabelas 11 e 12.

**Tabela 11** - Resultados referentes às amostras do teste de estabilidade de carbamazepina em plasma de rato mantidas à temperatura ambiente por 6 horas e depois processadas e analisadas.

Amostra	CQB RP	CQB 6h	CQA RP	CQA 6h
Média	0,97 ng/mL	0,84 ng/mL	997 ng/mL	972 ng/mL
CV (%)	9,00	14,30	12,80	10,50

CV= Coeficiente de variação [(SD/média)x100]

Fonte: Do autor.

**Tabela 12** - Resultados referentes às amostras do teste de estabilidade de enalapril em plasma de rato mantidas à temperatura ambiente por 6 horas e depois processadas e analisadas.

Amostra	CQB RP	CQB 6h	CQA RP	CQA 6h
Média	1,04 ng/mL	0,93 ng/mL	307 ng/mL	295 ng/mL
CV (%)	11,20	13,60	7,70	8,90

CV= Coeficiente de variação [(SD/média)x100]

Fonte: Do autor.

### 6.1.6.3. Estabilidade das amostras pós-processamento

As amostras avaliadas no teste de estabilidade pós-processamento foram preparadas e extraídas, ficando acondicionadas em temperatura ambiente (24°C) por 5 horas. Como se pode observar nas Tabelas 13 e 14, as amostras apresentaram-se estáveis, atendendo os requisitos da RDC 27/2012, ou seja, desvios abaixo de 15%.

**Tabela 13** - Resultados referentes às amostras do teste de estabilidade de carbamazepina em plasma de rato depois de processadas e mantidas a temperatura ambiente por 5 horas.

Amostra	CQB RP	CQB 5h	CQA RP	CQA 5h
Média	1,03 ng/mL	0,92 ng/mL	998 ng/mL	974 ng/mL
CV (%)	6,80	8,70	4,5	10,50

CV= Coeficiente de variação [(SD/média)x100]

Fonte: Do autor.

**Tabela 14** - Resultados referentes às amostras do teste de estabilidade de enalapril em plasma de rato depois de processadas e mantidas a temperatura ambiente por 5 horas.

Amostra	CQB RP	CQB 5h	CQA RP	CQA 5h
Média	1,07 ng/mL	0,96 ng/mL	303 ng/mL	298 ng/mL
CV (%)	3,3	2,2	2,1	3,80

CV= Coeficiente de variação [(SD/média)x100]

**Fonte:** Do autor.

## 6.2. Estudos experimentais

Os resultados obtidos nos estudos experimentais em ratos estão descritos nos itens abaixo.

### 6.2.1. Farmacocinética da carbamazepina em ratos

O método desenvolvido para a quantificação de carbamazepina e enalapril foi aplicado às amostras de animais tratados com a carbamazepina em dose única, por via oral nos grupos controle e WAR. Os valores obtidos estão representados na Tabela 15 e na Figura 9. Para o estudo farmacocinético da carbamazepina, o modelo que melhor se adequou foi o monocompartimental.

**Tabela 15** - Parâmetros farmacocinéticos ( $AUC^{0-\infty}$  e  $Cl_T/f$ ) para a carbamazepina administrada por via oral em ratos (n=6, por grupo; dose: 25 mg/kg). Mediana; intervalo de confiança (IC95%).

GRUPO	CCM	CWM	CCA	CWA
$AUC^{0-\infty}$ (hr.ng/mL)	19539 (10293 - 24428)	11021 (8704,10 - 14641)	35796 <sup>a</sup> (11579 - 75962)	9395,30 (8157,50 - 11470)
$Cl_T/f$ (L/hr/kg)	1,248 (0,63 – 1,74)	2,27 (0,99 – 2,81)	0,74 <sup>a</sup> (0,23 – 1,60)	2,66 (2,17 – 3,03)

CCM: ratos controle tratados com carbamazepina em monoterapia;

CWM: ratos WAR tratados com carbamazepina em monoterapia;

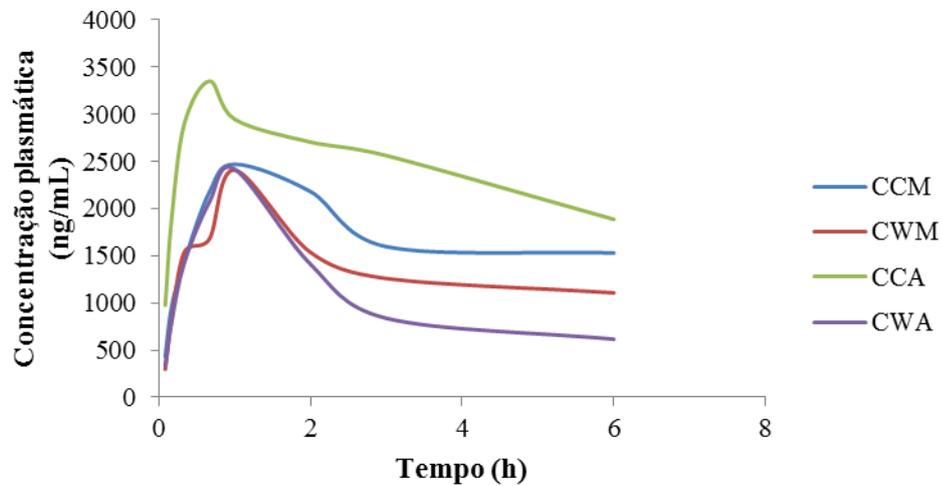
CCA: ratos controle tratados com associação de carbamazepina e enalapril;

CWA: ratos WAR tratados com associação de carbamazepina e enalapril.

<sup>a</sup>Diferença estatística entre CCA e CWA

Teste de Mann-Whitney, bicaudal para dados não pareados (p<0,05).

Fonte: Do autor.



**Figura 9** - Curvas de concentração plasmática da carbamazepina em função do tempo para os grupos

CCM: ratos controle tratados com carbamazepina em monoterapia;

CWM: ratos WAR tratados com carbamazepina em monoterapia;

CCA: ratos controle tratados com associação de carbamazepina e enalapril;

CWA: ratos WAR tratados com associação de carbamazepina e enalapril.

Os dados estão representados pela média dos valores.

Fonte: Do autor.

### 6.2.2. Farmacocinética do enalapril em ratos

O método desenvolvido para a quantificação de carbamazepina e enalapril foi aplicado às amostras de animais tratados com o enalapril nos grupos controle e WAR. Os valores obtidos estão representados na Tabela 17 e na Figura 10. Para o estudo farmacocinético do enalapril, o modelo que melhor se adequou foi o monocompartimental.

**Tabela 16** - Parâmetros farmacocinéticos ( $AUC^{0-\infty}$  e  $Cl_T/f$ ) para o enalapril administrado por via oral em ratos (n=6 por grupo; dose: 30 mg/kg). Mediana; intervalo de confiança (IC95%).

GRUPO	ECM	EWM	ECA	EWA*
$AUC^{0-\infty}$ (hr.ng/mL)	133,70 <sup>b,e</sup> (38,05 – 196,42)	273,05 <sup>d</sup> (143,75 – 511,08)	46,01 <sup>c</sup> (43,46 – 48,39)	-
$Cl_T/f$ (L/hr/kg)	267,96 <sup>b,e</sup> (34,31 – 777,38)	109,85 <sup>d</sup> (38,96 – 204,22)	653,37 <sup>c</sup> (617,42 – 689,33)	-

ECM: ratos controle tratados com enalapril em monoterapia;

EWM: ratos WAR tratados com enalapril em monoterapia;

ECA: ratos controle tratados com associação de carbamazepina e enalapril;

EWA: ratos WAR tratados com associação de carbamazepina e enalapril.

<sup>b</sup> Diferença estatística entre ECM e EWM ( $p < 0,05$ ).

<sup>c</sup> Diferença estatística entre ECA e EWA ( $p < 0,05$ ).

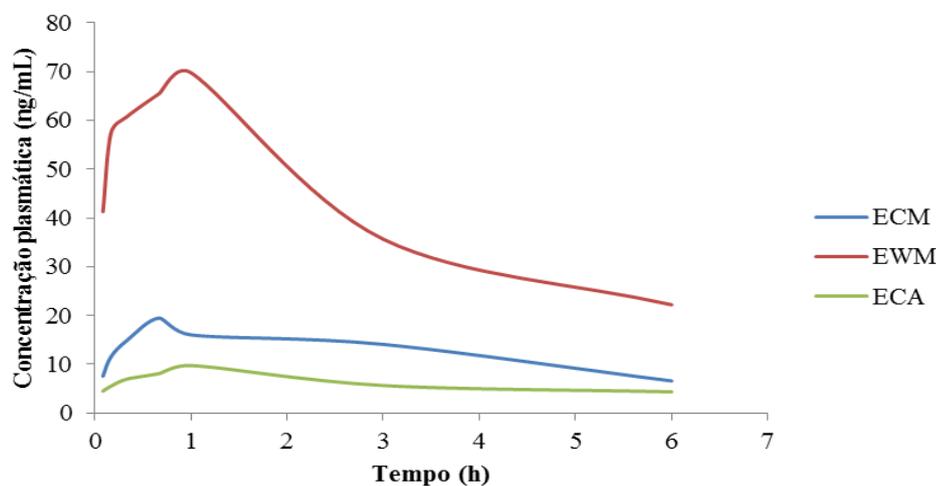
<sup>d</sup> Diferença estatística entre EWM e EWA ( $p < 0,05$ ).

<sup>e</sup> Diferença estatística entre ECM e ECA ( $p < 0,05$ ).

Teste de Mann-Whitney, bicaudal para dados não pareados.

\*O grupo EWA apresentou áreas abaixo do limite de quantificação do método desenvolvido, não sendo possível calcular os parâmetros farmacocinéticos.

**Fonte:** Do autor.



**Figura 10** - Curvas de concentração plasmática de enalapril em função do tempo para os grupos:

ECM: ratos controle tratados com enalapril em monoterapia;

EWM: ratos WAR tratados com enalapril em monoterapia;

ECA: ratos controle tratados com associação de carbamazepina e enalapril;

EWA: ratos WAR tratados com associação de carbamazepina e enalapril.

Obs.: O grupo EWA apresentou áreas abaixo do limite de quantificação do método desenvolvido, não sendo possível calcular os parâmetros farmacocinéticos. Os dados são representados pela média dos valores.

**Fonte:** Do autor.

## 7. DISCUSSÃO

No presente trabalho, desenvolveu-se e validou-se um método com as características: tempo de análise curto, preparo de amostras simples e rápido, baixo consumo de solventes e detectabilidade adequada para quantificação de carbamazepina e enalapril em plasma de rato através da cromatografia líquida de ultra performance acoplada a espectrometria de massas (UPLC-MS/MS) (HIDAKA et al., 2005; QUEIROZ et al., 2008; ALVES et al., 2010; LEE et al., 2012; PATIL et al., 2012; SERRALHEIRO et al., 2013).

Métodos de quantificação de carbamazepina são muito descritos na literatura, assim como métodos desenvolvidos para a determinação de maleato de enalapril, ambos em plasma de animais. Há métodos que utilizam cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrômetro de massas, métodos de preparo de amostras que envolvem extração em fase sólida (KOSTOPOULOU & NIKOLAOU, 2008; MOWAFY et al, 2012; USLU & ÖZDEN, 2013; SERRALHEIRO et al., 2013, AL-QAIM et al., 2014; SONG et al., 2014; VOSOUGH, et al., 2014). Porém, não foi encontrada na literatura qualquer metodologia analítica que permitisse a quantificação dos dois analitos simultaneamente. Isto era necessário em nossa metodologia, uma vez que as coletas seriadas em um mesmo animal reduzem o volume possível a ser coletado, tornando-se importante para o grupo a interação a análise simultânea dos analitos.

O desenvolvimento do método se baseou nos estudos de WANG (2007) que desenvolveu uma metodologia analítica para determinação de enalapril e ATES (2007) e BEIG (2013), que desenvolveram metodologias para carbamazepina em plasma para a avaliação em estudos cinéticos. A partir das metodologias citadas, desenvolveu-se uma nova adaptada às condições do Laboratório de Análises de Toxicantes e Fármacos, da Universidade Federal de Alfenas.

O método desenvolvido atende os parâmetros de aceitação da RDC 27/2012 da ANVISA, apresentando-se linear, preciso e exato, sendo adequado para a quantificação dos analitos de interesse em plasma de ratos.

O uso de modelos animais em estudos farmacocinéticos é bastante comum. Atualmente, o conceito dos 3 R's (reduzir, refinar e substituir) vem sendo frisado pelos órgãos fiscalizadores da utilização animal em pesquisa em todo o mundo. Resumidamente, a política dos 3R's significa a redução do número de animais utilizados na pesquisa, a melhora na condução dos estudos, no sentido de reduzir o sofrimento ao mínimo possível, e a busca de

métodos alternativos que possam substituir os testes *in vivo*. Os dois primeiros representam os objetivos a curto-prazo e o último, a meta máxima a ser alcançada (CAZARIN et al. 2004).

Dentre as ações para a redução do uso de animais está a técnica cirúrgica de canulação animal para a realização de múltiplas coletas em um mesmo sujeito. Assim, com essa técnica, é possível utilizar apenas um animal na confecção de uma curva de farmacocinética, levando a uma diminuição expressiva no número de animais necessários para a experimentação. Neste trabalho foi feita a técnica de canulação da veia jugular dos ratos. A técnica foi padronizada de modo que o animal apresentasse o menor desconforto possível, atendendo o segundo princípio dos 3R's. Foram otimizados parâmetros como: tipo e dose dos anestésicos usados (dentre os fármacos testados podemos citar tiopental, isoflurano, cloridrato de cetamina, xilazina, midazolam e diazepam) e treinamento do cirurgião, de modo a aliviar e/ou poupar o animal de qualquer tipo de sofrimento, o que poderia interferir negativamente para os resultados do trabalho, além de ferir questões éticas.

A epilepsia é uma desordem neurológica crônica, com presença de crises, podendo ocorrer quadros de crises convulsivas espontâneas e recorrentes, que são resultado de uma hiperexcitação e hipersincronismo do cérebro. Por ser uma condição estigmatizada desde tempos remotos, quando as crises eram atribuídas a entidades demoníacas (ou divinas), ela representa um grande impacto nos âmbitos social, econômico e psicossocial, uma vez que o paciente, dependendo do grau do distúrbio, pode ter sua independência, mobilidade, educação, emprego e relacionamentos pessoais afetados (FISHER et al. 2005).

Em adultos, epilepsia do lobo temporal é o principal tipo de epilepsia focal, tem grande importância por se tratar de uma condição grave e resistente à fármacos. Além disso, pode ser agravada pela existência de comorbidades de origem psiquiátrica, hormonal ou sistêmica, o que torna o quadro ainda mais complexo de tratamento (ENGEL, 1996).

A condição neurológica epilepsia apresenta refratariedade em seu tratamento em muitos casos. Muitas vezes, os pacientes são submetidos à politerapias, uma vez que o tratamento em monoterapia não surte o efeito esperado. Estudos populacionais demonstram que cerca de 19-20% dos pacientes epiléticos fazem uso de politerapias com medicamentos antiepiléticos. Verificou-se que existe um alto número de pacientes com epilepsia refratária, dos quais 64% destes, incluindo adultos e crianças, fazem uso de politerapia; sendo que 35% destes adultos possuem alguma comorbidade em associação com a doença, o que eleva o risco de interação medicamentosa. Os perigos da politerapia e da interação medicamentosa aumentam de acordo com a idade, assim como a presença de comorbidades associadas, dentre as mais relevantes aquelas relacionadas ao sistema circulatório (TSIROPOULOS et al., 2006;;

JOHANNESSEN et al., 2007; VAN DE VRIE-HOEKSTRA et al. 2008; JOHANNESSEN et al., 2009; RYTTER et al. 2009).

Pouco se sabe a respeito dos mecanismos moleculares que influenciam a resistência ao tratamento em indivíduos com epilepsia, porém, uma gama de estudos sugere de que as proteínas transportadoras de influxo/efluxo executam um papel importante neste processo, tais como a Oatp1, MRP1, MRP2, Pept1, P-gP, entre outras. A glicoproteína P (P-gP), que age como uma bomba de efluxo ATP-dependente que transporta fármacos e xenobióticos para fora das células do fígado, rins, cérebro (BBB) e trato gastrointestinal e a proteína MRP1, age de forma semelhante a P-gp, tem sido muito estudada (THIEBAUT et al, 1987; HEBERT, 1997; WATKINS, 1997; REGESTA, et al., 1999; KWAN & BRODIE, 2002).

Dentre os diversos fármacos para o tratamento da epilepsia, a carbamazepina ainda é o de primeira escolha, sendo um dos medicamentos oferecidos gratuitamente pelo Sistema Único de Saúde brasileiro (BRASIL, 2015). A carbamazepina atua na estabilização das membranas hiperexcitadas, bloqueando os canais para sódio dependentes da diferença de potencial elétrico, o que diminui a ativação dos potenciais de ação, resultando em uma despolarização mantida e controle muitas vezes adequado das crises (WILLOW et al., 1985; MACDONALD & KELLY, 1993; RUSH & ELLIOT, 1997; KUO et al., 1997; GIERBOLINI et al., 2016).

Apesar da eficiência da carbamazepina, o uso deste fármaco deve ser observado, uma vez que sua janela terapêutica é estreita, o que pode levar a casos de intoxicação. O produto do metabolismo deste medicamento é a carbamazepina-10,11- epóxido, um composto altamente reativo, que deve ser convertido em um composto inativo por ação enzimática da epóxido hidrolase; portanto, qualquer modificação na atividade enzimática pode levar a quadros de resposta adversa ao medicamento. Além disso, a carbamazepina pode sofrer autoindução do seu metabolismo, quando usada por muito tempo e heteroindução, quando administrada em concomitância com fenitoína e barbitúricos (PATSALOS et al., 2003; PERUCCA, 2006).

Conforme os dados obtidos por este estudo, quando a carbamazepina é administrada por via oral em monoterapia, na dose de 25 mg/kg a ratos controle (CCM) e ratos que possuem um *background* genético para a epilepsia (CWM), não há diferença significativa nos valores de  $AUC^{0-\infty}$  e Cl entre estes dois grupos, conforme a Tabela 15; portanto a predisposição para a epilepsia não afeta a disposição cinética da carbamazepina.

Quando comparão-se os ratos controle que foram tratados com a monoterapia (CCM) com os tratados com a associação (CCA), verifica-se que também não houve diferença

estatística com relação aos parâmetros farmacocinéticos avaliados para estes grupos, somente tendência de aumento de  $AUC^{0-\infty}$  e consequente redução de *clearance* no grupo CCA. Isto permite dizer que a administração de enalapril não modifica a farmacocinética da carbamazepina em animais saudáveis.

Ainda, quando comparamos os animais WAR que receberam carbamazepina em monoterapia (CWM) com os que a receberam, mas associada ao enalapril (CWA), verifica-se que não houve diferença estatística nos parâmetros avaliados para a farmacocinética da carbamazepina (Tabela 16), permitindo inferir que em condições de suscetibilidade para a epilepsia a associação também não afeta a farmacocinética da carbamazepina.

Porém, percebe-se que o valor de  $AUC^{0-\infty}$  da carbamazepina foi cerca de 4 vezes menor (9395 vs 35796 ng.h/mL) no grupo de animais WAR que receberam carbamazepina em associação com o enalapril (CWA), quando comparado com o grupo Wistar que recebeu o mesmo tratamento (CCA). Os valores de *clearance* no grupo CWA foram maiores que no grupo CCA (2,66 vs 0,74 L/hr/kg), ou seja, o *background* genético da cepa WAR interfere na farmacocinética da carbamazepina quando esta é administrada em associação com o enalapril.

Estudos em roedores já demonstraram o aumento na expressão de diferentes transportadores de efluxo/influxo, tais como P-gP, MRP1, MRP2 e BCRP em modelos de crises induzidas. O aumento da expressão da P-gp foi verificado no endotélio capilar do cérebro, na região perivascular dos astrócitos, na região parenquimal e nos neurônios. (RIZZI et al., 2002; VAN VLIET et al., 2004; LÖSCHER et al., 2005) Além disso, ressalta-se que a carbamazepina é substrato da P-gP, além de indutora enzimática das subfamílias da CYP 2C9 e 3A (LAZAROWSKI e CZORNYJ, 2011).

De Sarro et al. (2012) verificaram que quando administravam enalapril a ratos com *background* genético para epilepsia (DBA/2), associado a outros AEDs, não observou-se a diminuição da severidade das crises epiléticas audiogênicas. Tal ineficácia da associação do enalapril com a carbamazepina para controle das crises possivelmente pode ser associada, dentre outros motivos, aos achados deste estudo, onde observou-se redução da biodisponibilidade do antiepilético, além de outros mecanismos que possam estar envolvidos.

Łukawski et al. (2011) em estudo de crises induzidas por eletrochoque, verificaram que a associação de enalapril e carbamazepina não foi capaz de evitar que 50% dos animais em estudo tivessem a crise controlada, enquanto que quando associado ao ácido valpróico, o enalapril melhorou a atividade deste no controle da crise. Desta maneira, percebe-se que há alteração do efeito da carbamazepina, quando administrada em associação ao enalapril, em controle das crises tanto em modelos induzidos, quanto em modelos de *background* genético.

O sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) tem grande participação na regulação de uma gama de processos fisiológicos, dentre eles equilíbrio de água no corpo, manutenção da pressão arterial, comportamento sexual e regulação de hormônios glândula pituitária. Na cascata bioquímica, o angiotensinogênio é o precursor inativo, sendo clivado pela renina, liberando a angiotensina I (AngI). A AngI tem baixa atividade biológica, mas após sofrer ação da enzima conversora da angiotensina, ela gera angiotensina II (AngII), peptídeo ativo. A continuação da cascata envolve a liberação de outra gama de peptídeos relacionados com a angiotensina, tais como angiotensina 1-7, angiotensina III, angiotensina IV, entre outros desempenhando uma variedade de efeitos biológicos, dentre eles, o efeito anticonvulsivo (WRIGHT & HARDING, 2004; PEREIRA et al., 2010).

Componentes do SRAA foram encontrados no cérebro apresentando algumas funções, incluindo o comportamento, o estresse, controle central da pressão arterial, entre outras, sendo que a AngII atua como um neurotransmissor/neuromodulador através de sua ação sobre os receptores AT1 e AT2 presente em várias regiões do cérebro (CHEN et al., 1993; MEFFERT et al., 1996; YAMADA et al., 1996; WRIGHT & HARDING, 2004; SAAVEDRA et al., 2005) Pereira et al. (2010) verificaram um aumento na expressão dos componentes do SRA e do receptor AT1 no encéfalo de animais WAR submetidos à indução de crises repetidas.

Os medicamentos inibidores da enzima conversora da angiotensina são responsáveis por interromper a cascata bioquímica do SRAA, inibindo a conversão de AngI para AngII. O enalapril é um fármaco dessa classe; quando metabolizado, se converte em enalaprilato, metabólito ativo com alta afinidade pela enzima conversora da angiotensina (SARKAR et al., 2006).

O enalapril é absorvido no intestino através dos transportadores PEPT1, PEPT2 e OATP1, ao atingir a corrente sanguínea, este pró-fármaco é levado ao fígado, onde é captado do sangue pelos transportadores OATP1 hepáticos (PANG et al., 1998), no interior dos hepatócitos é metabolizado pelas enzimas hepáticas carboxilesterases a enalaprilato e excretado para a bile via MRP2 (PANG et al., 2002).

Como observado neste estudo, o enalapril, quando administrado na dose de 30 mg/kg em monoterapia a ratos controle (ECM) e ratos WAR (EWM), apresentou diferença nos parâmetros farmacocinéticos entre estes grupos, com um aumento da  $AUC^{0-\infty}$  para os grupos WAR (105,25 vs 273,05ng.h/mL), o que demonstra que a predisposição para a epilepsia interfere na farmacocinética do medicamento, reduzindo o *clearance* do enalapril (267,52 vs 109,85 L/h/kg) e aumentando a biodisponibilidade.

Alguns estudos apontam que algumas doenças, como diabetes, doenças hepáticas e intestinais podem levar a um aumento na expressão dos receptores PEPT1, PEPT2 (THAMOTHARAN et al., 1999; GANGOPADHYAY et al., 2002; TRAMONTI et al. 2006; OGASAWARA et al., 2010), sendo assim, nossa hipótese é que a condição epiléptica pode ter levado a um aumento na expressão destes transportadores, o que desencadeou uma maior absorção do enalapril nos animais WAR.

Quando comparamos os grupos de animais controle que receberam enalapril em monoterapia (ECM) e o grupo controle que recebeu a associação deste com a carbamazepina (ECA), observou-se diferença estatística nos parâmetros avaliados  $AUC^{0-\infty}$  (133,7 vs 46,01ng.h/mL) e *clearance* (267,96 vs 653,37 L/h/kg) mostrando que a associação altera a farmacocinética do enalapril, com redução de biodisponibilidade e consequente aumento de *clearance*.

Gui et al (2008) descreveram que a carbamazepina é inibidora do OATP1B1 (em estudo *in vitro*) e o enalapril é substrato do mesmo (LIU et al., 2006) além do OATP1B3; sendo assim, há uma diminuição da absorção do enalapril em nível intestinal, além disso, a quantidade de enalapril que for absorvida e chegar no fígado terá o transporte para dentro dos hepatócitos afetado pela inibição causada pela carbamazepina, permanecendo mais tempo no sangue, pois poderá somente usar uma via de entrada, o OATP1B3 hepática (Tabela 17).

Além do enalapril, a carbamazepina também é transportada pelo MRP2 (PURANIK et al., 2013). A redução da biodisponibilidade do enalapril pode ter ocorrido por competição dos fármacos pelo transportador, uma vez que ambos o utilizam e a biodisponibilidade da carbamazepina foi aumentada em situação de associação em animais controle (Tabela 16).

No caso dos grupos da associação, observou-se que a concentração plasmática do enalapril para o grupo WAR (EWA) era menor que o limite inferior de quantificação (1 ng/mL) do método analítico desenvolvido e validado neste estudo, em todos os tempos de colheita, o que impossibilitou a determinação dos parâmetros farmacocinéticos; porém pode também ser considerado como diferença estatística significativa, pois os valores quantificados no grupo ECA reduziram-se de tal forma que não foram detectáveis no grupo EWA.

A inibição da proteína de transporte OATP1B1 pela carbamazepina (GUI et al., 2008) associada ao aumento da expressão de Pg-P, MRP1 e MRP2 em indivíduos com epilepsia não tratada quando comparados a indivíduos saudáveis (LIU et al., 2015), pode ser importante para explicação da refratariedade ao tratamento, dificultando a absorção do fármaco e facilitando a excreção do fármaco para a bile. Uma vez que a dose de carbamazepina utilizada não foi alta, seguiu cinética linear e foi administrada por via oral, sofrendo todas as etapas de

transporte, ressalta-se que a condição de *background* genético do rato WAR, pode estar relacionada a aumento de excreção de enalaprilato e enalapril para bile, explicando o fato de menor em  $AUC^{0-\infty}$  em EWA.

A hipótese de aumento da expressão dos transportadores citados anteriormente neste texto pode ter contrabalanceado a competição entre carbamazepina e enalapril por estes, o que pode ter levado à redução da biodisponibilidade nos grupos que se relacionou à patologia e à associação medicamentosa (CWA e EWA) quando comparado somente (CCA e ECA). Ressalta-se que todas as hipóteses citadas, são baseadas em estudos já publicados na literatura, sendo necessárias avaliações adicionais para confirmação das mesmas.

## 8. CONCLUSÃO

- O método bioanalítico desenvolvido e validado para quantificação simultânea de carbamazepina e enalapril em plasma de rato foi adequado à quantificação dos fármacos em estudos farmacocinéticos de dose única.
- A associação de enalapril altera a disposição cinética da carbamazepina em ratos WAR.
- O enalapril tem sua biodisponibilidade aumentada em ratos WAR quando comparados a ratos controle em monoterapia.
- A associação de carbamazepina reduz a biodisponibilidade do enalapril em ratos controle e WAR, sendo mais pronunciada em animais com *background* genético para epilepsia.

## BIBLIOGRAFIA

AL-QAIM, F. F.; ABDULLAH, P.; OTHMAN, M. R.; LATIPA, J.; AFIQA, W. A Validation Method Development for Simultaneous LC-ESI-TOF/MS Analysis of Some Pharmaceuticals in Tangkas River-Malaysia. **Journal Brazilian Chemistry Society**, Vol. 25, No. 2, 271-281, 2014.

ALMEIDA, S. S. et. al. Carbamazepine inhibits angiotensin I-converting enzyme, linking it to the pathogenesis of temporal lobe epilepsy. **Translational Psychiatry**, v. 2, pp. 1-5, 2012.

ALVES, G.; FORTUNA, A.; SOUSA, J.; DIREITO, R.; ALMEIDA, A.; ROCHA, M. et al. Enantioselective assay for therapeutic drug monitoring of eslicarbazepine acetate: No interference with carbamazepine and its metabolites. **Therapeutic Drug Monitoring**, 32: 512–516, 2010.

ANNEGERS, J. F.; COAN, S. P. SUDEP: Overview Of Definitions And Review Of Incidence Data. **Seizure**, vol. 8, pp. 347 – 352, 1999.

ARAÚJO, D.S., SILVA, H.R.R.; FREITAS, R.M. Carbamazepina: Uma revisão da literatura. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Vol.: 7(4): 30-45, 2010.

ARGAÑARAZ, G. A.; KONNO, A. C.; PEROSA, S. R.; SANTIAGO, J. F.; BOIM, M. A.; VIDOTTI, D. B.; VARELLA, P. P.; COSTA, L. G.; CANZIAN, M.; PORCIONATTO, M. A. et al. The renin–angiotensin system is upregulated in the cortex and hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy related to mesial temporal sclerosis. **Epilepsia**, v. 49, pp. 1348–1357, 2008.

ASADI-POOYA, A. A.; SPERLING, M. R. Clinical features of sudden unexpected death in epilepsy. **Journal of Clinical Neurophysiology**, Volume 26, Issue 5, pp. 297-301, 2009.

ATES, Z.; ÖZDEN, T.; ÖZILHAN, S.; TOPTAN, S. Simultaneous Determination of Carbamazepine and its Active Metabolite Carbamazepine-10,11-epoxide in Human Plasma by UPLC. **Chromatographia**, 66, S123–S127, 2007.

AVANZINI, G.; FRANCESCHETTI, S.; Cellular biology of epileptogenesis. **Lancet Neurology** 2, 33-42, 2003.

BANERJEE, P. N.; FILLIPI, D.; HAUSER, W .A. The descriptive epidemiology of epilepsy - A review. **Epilepsy Research**, VOL. 85, 31—45, 2009.

BAPTISTA, M.V.; MAEDER, P.; DEWARAT, A.; BOGOUSSLAVSKY, J. Conflicting Images. **Lancet**, 351: 141, 1998.

BEIG, A.; DAHAN, A. Quantification of carbamazepine and its 10,11- epoxide metabolite in rat plasma by UPLC-UV and application to pharmacokinetic study. **Biomedical Chromatography**, 2013.

- BENICKY, J., SÁNCHEZ-LEMUS, E., HONDA, M., PANG, T., ORECNA, M., WANG, J., LENG, Y., CHUANG, D.M., SAAVEDRA, J.M. Angiotensin II AT1 receptor blockade ameliorates brain inflammation. **Neuropsychopharmacology**, 36 (4), 857–870, 2011.
- BERG, A. T.; BERKOVIC S. F.; BRODIE M. J.; BUCHHALTER J.; CROSS J. H.; BOAS W. V. E.; ENGEL J.; FRENCH, F.; GLAUSER, T. A.; MATHERN, G. W.; MOSHE, S. L.; NORDLI, D.; PLOUIN, P.; SCHEFFER, I. E.; Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005–2009. **Epilepsia**, 51(4):676–685, 2010.
- BERKOVIC, S.F.; ANDERMANN, F.; OLIVIER, A.; ETHIER, R.; MELANSON, D.; ROBITAILLE, Y. et al. Hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy demonstrated by magnetic resonance imaging. **Annals of Neurology**, 29:175-82, 1991.
- BETTING, L. E.; GUERREIRO, C. A. M. Tratamento das Epilepsias Parciais. **Journal Epilepsy Clinical Neurophysiology**, 14(Suppl 2):25-31, 2008.
- BONNER, T.I., BUCKLEY, N.J., YOUNG, A.C., BRANN, M.R. Identification of a family of muscarínico acetylcholine receptor genes. **Science**, v. 237, p. 527-532, 1987.
- BORO, A.; HAUT, S. Medical comorbidities in the treatment of epilepsy. **Epilepsy & Behavior** 4, S2–S12, 2003.
- BORTOLINI, L., KULAK, C., BORBA, V., SILVADO, C., BOGUSZEWSKI, C. Efeitos endócrinos e metabólicos das drogas antiepilépticas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, 53 (7), 2009.
- BYERS, L.D.; WOLFENDEN, R. A potent reversible inhibitor of carboxypeptidase A. **The Journal of Biological Chemistry**, 247:606-8, 1972.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC 27, de 17 de maio de 2012**. Guia para validação de métodos bioanalíticos. 2012. Disponível em: [http://bvms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0027\\_17\\_05\\_2012.html](http://bvms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0027_17_05_2012.html). Acesso em: 16 de março de 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais : RENAME 2014 / Ministério da Saúde**, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. – 9. ed. rev. e atual - 230 p. – Brasília : Ministério da Saúde, 2015.
- 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 neurodegeneration after status epilepticus induced by systemic and intrahippocampal pilocarpine in Wistar rats. **Brain research**, 1374, 43-55, 2011.
- CAVALHEIRO, E. A. The pilocarpine model of epilepsy. **The Italian Journal of Neurological Sciences**, v.16, n.1-2, p.33-7, 1995.

CHEN, L.; PRAKASH, O.; RE, R.N. The interaction of insulin and angiotensin II on the regulation of human neuroblastoma cell growth. **Molecular and Chemical Neuropathology**, 18:189–196, 1993.

DAVIS, K.L., HOLLISTER, L.E., BERGER, P.A., BARCHAS, J.D. Cholinergic imbalance hypotheses of psychoses and movement disorders: strategies for evaluation. **Psychopharmacologia Commun**, v. 1, p. 533-543, 1975.

DAVIS, W.M., HATOUN, N.S. Synergism of the toxicity of physostigmine and neostigmine by lithium or by a reserpinelike agent (R04-1284). **Toxicology**, v.17, p. 1-7, 1980.

DELANTY, N., VAUGHAN, C., FRENCH, J. Medical causes of seizures. **Lancet**, 352:383-90, 1998.

DE SARRO, G.; DI PAOLA, E. D.; GRATTERI, S.; GARERI, P.; RISPOLI, V.; SINISCALCHI, A.; TRIPEPI, G.; GALLELLI, L.; CITRARO, R.; RUSSO, E. Fosinopril and zofenopril, two angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors, potentiate the anticonvulsant activity of antiepileptic drugs against audiogenic seizures in DBA/2 mice. **Pharmacological Research**, v. 65, pp. 285– 296, 2012.

DUNCAN, S. Sexuality issues in epilepsy. Managing epilepsy and co-existing disorders. **Boston: Butterworth–Heinemann**, p. 293–303, 2002.

ELGOYHEN, A.B., KATZ, E., ROTHLIN, C.V., VERBITSKY, M. Mixed nicotinic-muscarinic properties of the  $\alpha 9$  nicotinic cholinergic receptor. **Neuropharmacology**, v. 39, p. 2515-2524, 2000.

ENGEL J. Jr.; Concepts of epilepsy. **Epilepsia**, 36(Suppl. 1):23-9; 1995.

ENGEL JR, J. Introduction to temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Research**.; 26:141-50, 1996.

ERDOS, E. G., SKIDGEL R.A. Renal metabolism of angiotensin I and II. **Kidney International Supplements**, v 30: S24-7, 1990.

FERDER, L. F., INSERRA, F., MARTINEZ-MALDONADO, M. Inflammation and the metabolic syndrome: role of angiotensin II and oxidative stress. **Current Hypertension Reports**, 8 (3), 191–198, 2006.

FERDER, L.F., INSERRA, F., BASSO, N. Effects of renin–angiotensin system blockade in the aging kidney. **Experimental Gerontology**, 38 (3), 237–244, 2003.

FERNANDES, M. J. S. Epilepsia do lobo temporal: mecanismos e perspectivas. **Estudos avançados**, 27 (77): 85-93, 2013.

FICKER, D. M.; SO, E. L.; SHEN, W. K.; ANNEGERS, J. F.; O'BRIEN, P.C.; CASCINO, G. D.; BELAU, P.G. Population-based study of the incidence of sudden unexplained death in epilepsy. **Neurology**, V. 51(5):1270-4, 1998.

FISHER, R. S.; ACEVEDO, C.; ARZIMANOGLU, A. et al. A practical clinical definition of epilepsy. **Epilepsia**, 55(4):475–482, 2014.

FISHER, R., BOAS W., BLUME W., ELGER C., GENTON P., LEE P., ENGEL J. Epileptic Seizures and Epilepsy: definition proposed by the international league against epilepsy (ILAE) and the international bureau for epilepsy (IBE). **Epilepsia**, V. 46(4) 470-472, 2005.

FLOCKART, D.A.; TANUS-SANTOS, J.E. Implications of cytochrome P450 interactions when prescribing medication for hypertension. **Archives of internal medicine**, 162: 405–12, 2002.

GABRIELSON, J.; WEINER, D. Pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis: concepts and applications. **Estocolmo: Swedish Pharmaceutical Press**, 200, 924 p.

GANGOPADHYAY, A.; THAMOTHARAN, M.; ADIBI, S. A. Regulation of oligopeptide transporter (Pept-1) in experimental diabetes. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, 283(1), G133-G138, 2002.

GARCIA-CAIRASCO, N.; WAKAMATSU, H.; OLIVEIRA, J.A.C.; GOMES, E.L.T.; DEL BEL, E.A.; MELLO, L.E.A.M. Neuroethological and morphological (Neo –Timm staining) correlates of limbic recruitment during the development of audiogenic kindling in seizure susceptible Wistar rats. **Epilepsy Research**, 26: 177-192, 1996.

GIERBOLINI, J.; GIARRATANO, M.; BENBADIS, S. R. Carbamazepine-related antiepileptic drugs for the treatment of epilepsy - a comparative review. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, 17:7, 885-888, 2016.

GODDARD, G. Development of epileptic seizures through brain stimulation at low intensity. **Nature**, 214: 1020-1021, 1967.

GOUVEIA, T. L. F. The levels of renin–angiotensin related components are modified in the hippocampus of rats submitted to pilocarpine model of epilepsy. **Neurochemistry International**, (61) 54–62; 2012.

GUI, C.; MIAO, Y.; THOMPSON, L.; WAHLGREN, B.; MOCK, M.; STIEGER, B. et al. Effect of pregnane X receptor ligands on transport mediated by human OATP1B1 and OATP1B3. **European Journal of Pharmacology**, 584: 57-65, 2008.

HARMS, P. G.; OJEDA S. R. A rapid and simple procedure for chronic cannulation of the rat jugular vein. **Journal Of Applied Physiology**, Vol. 36, No. 3, 1974.

HERMANN, B.P.; SEIDENBERG, M.; BELL, B. Psychiatric comorbidity in chronic epilepsy: identification, consequences, and treatment of major depression. **Epilepsia**, 41(Suppl 2):S31–41, 2000.

HIDAKA, M.; OKUMURA, M.; FUJITA, K.; OGIKUBO T.; YAMASAKI, K.; IWAKIRI, T. et al. Effects of pomegranate juice on human cytochrome p450 3A (CYP3A) and carbamazepine pharmacokinetics in rats. **Drug Metabolism and Disposition**, 33: 644–648, 2005.

HULME, E. C. Muscarinic acetylcholine receptors: typical G-coupled receptors. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, v. 44, p. 39-54, 1990.

JACKSON, J.H. A study of convulsions. Selected writings of John Hughlings Jackson. Vol 1. **On epilepsy and epileptiform convulsions**. London: Staples Press;8-36, 1958.

JOHANNESSEN LANDMARK, C.; LARSSON, P.G.; RYTTER, E.; JOHANNESSEN, S.I. Antiepileptic drugs in epilepsy and other disorders: A population-based study of prescriptions. **Epilepsy Research**,87, 31-39, 2009.

JOHANNESSEN LANDMARK, C.; RYTTER, E.; JOHANNESSEN, S.I. Clinical use of antiepileptic drugs at a referral center for epilepsy. **Seizure**, V. 16, 356-364, 2007.

JOPE, R.S. High affinity choline transport and acetylCoA production in brain and their roles in the regulation of acetylcholine synthesis. **Brain Research Reviews**, v. 1, p. 313-344, 1979.

KESTER, M., KARPA, K.& VRANA, K. **Elsevier's Integrated Review Pharmacology**. 2 ed, Elsevier, 2012.

KOSTOPOULOU, M.; NIKOLAOU, A. Analytical problems and the need for sample preparation in the determination of pharmaceuticals and their metabolites in aqueous environmental matrices. **Trends in Analytical Chemistry**, Vol. 27, No. 11, pp. 1023-1035, 2008.

KOTAGAL, P. Seizure symptomatology of temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Surgery**, p. 143-156, 1991.

KRUSHINSKY, I.; MOLODKINA, I.; FLESS, D.; DOBROKHOTOVA, I.; STESHENKO, A.; SEMIOKHINA, A.; ZORINA, Z.; ROMANOVA, I. The functional state of the brain during sonic stimulation. In: **Physiological effects of noise**, Eds Welch, B. e Welch, A. New York; Plenum Press: 151, 1970.

KUO, C. C.; CHEN, R. S.; LU, L.; CHEN, R. C. Carbamazepine inhibition of neuronal Na<sup>+</sup> currents-quantitative distinction from phenytoin and possible therapeutic implications. **Molecular Pharmacology**, 51:1077-1083, 1997.

KWAN, P.; BRODIE, M.J. Refractory epilepsy: a progressive, intractable but a preventable condition? **Seizure**, v. 11: 77-84, 2002.

LAZAROWSKI, A. and CZORNYJ, L. Minireview: Potential role of multidrug resistant proteins in refractory epilepsy and antiepileptic drugs interactions. **Drug metabolism and drug interactions**, 26(1):21-26, 2011.

LEITE, J. P. et al. Spontaneous recurrent seizures in rats: an experimental model of partial epilepsy. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v.14, n.4, p.511-7, 1990.

LEE, Y.S.; KIM, Y.W.; KIM, S.G.; LEE, I.; LEE, M.G.; KANG, H.E. Effects of poloxamer 407-induced hyperlipidemia on the pharmacokinetics of carbamazepine and its 10,11-epoxide metabolite in rats: Impact of decreased expression of both CYP3A1/2 and microsomal epoxide hydrolase. **European Neuropsychopharmacology**, 22: 431-440, 2012.

LI, L. M., SANDER, J.W. National demonstration project on epilepsy in Brazil. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, 61(1):153-6; 2003.

LIU, L.; CUI, Y.; CHUNG, A.Y.; SHITARA, Y.; SUGIYAMA, Y.; KEPPLER, D. et al. Vectorial transport of enalapril by Oatp1a1/Mrp2 and OATP1B1 and OATP1B3/MRP2 in rat and human livers. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 318: 395–402, 2006.

LIU, X.; YUE, X.; CHEN, S.; CHEN, J.; LI, R. Significance of the expression of MRP1 and MRP2 in peripheral blood mononuclear cells of children with intractable epilepsy. **Experimental and Therapeutic Medicine**, 10(5):1784-1788, 2015.

LÖSCHER, W. Animal models of epilepsy and epileptic seizures. In: Eadie MJ, Vajda F, editors. Antiepileptic drugs. **Handbook of experimental pharmacology**, Berlin: Springer; p. 19–62, 1999.

LÖSCHER, W.; SCHMIDT D. Which animal models should be used in the search for new antiepileptic drugs? A proposal based on experimental and clinical considerations. **Epilepsy Research**, 2:145–81, 1988.

LOSCHER, W.; POTSCHKA, H. Blood–brain barrier active efflux transporters: ATPbinding cassette gene family, **NeuroRx** 2, 86–98, 2005.

ŁUKAWSKI, K.; JAKUBUS, T.; JANOWSKA, A.; RASZEWSKI, G.; CZUCZWAR, S.J. Enalapril enhances the anticonvulsant activity of lamotrigine in the test of maximal electroshock. **Pharmacological Reports**, v.65(4):1012-7, 2013.

MACDONALD, R. L. and KELLY, K. M. Antiepileptic drug mechanism of action. **Epilepsia**, 34:S1–S8, 1993.

MACFADYEN, R. J.; MEREDITH P. A.; ELLIOT H. L. Enalapril Clinical Pharmacokinetics and Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Relationships An Overview. **Clinical Pharmacokinetics**; 25 (4): 274-282, 1993.

MARCHETTI, R. L. et al. Transtornos mentais associados à epilepsia. **Jornal da Revista Psiquiatria Clínica**; v.32, n.3, p.170-182, 2005.

MARCOLIN, M. A.; CANTARELLI, M. G.; JUNIOR, M. G. Interações farmacológicas entre medicações clínicas e psiquiátricas. **Revista Psiquiatria Clínica**, 31 (2);70-81, 2004.

MARESCAUX, C.; VERGNES, M.; KIESMANN, M.; DEPAULIS, A.; MICHELETTI, G.; WARTER, J. Kindling of audiogenic seizures in Wistar rats: an EEG study. **Experimental Neurology**, 97(1):160-8, 1987.

MATTSON, R. H. Medical management of epilepsy in adults. **Neurology**, 51(5 Suppl 4):S15-20, 1998.

- MEFFERT, S.; STOLL M.; STECKLINGS U.M.; BOTTARI, S.P.; UNGER, T. The angiotensin II AT2 receptors inhibits proliferation and promotes differentiation in PC12W cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 122:59–67, 1996.
- MICHOTTE, Y., KHAN, G.M., SMOLDERS, I., EBINGER, G. Anticonvulsant effect and neurotransmitter modulation of focal and systemic 2-chloroadenosine against the development of pilocarpine-induced seizures. **Neuropharmacology**, v. 39, p. 2418-2432, March 2000.
- MORAES, M.F.D, GALVIS-ALONSO, O.Y., GARCIA-CAIRASCO, N.G. Audiogenic kindling in the Wistar rat: a potential model for recruitment of limbic structures. **Epilepsy Research**, v. 39, p. 251-259, 2000.
- MORIMOTO, K.; FAHNESTOCK, M.; RACINE, R.J. Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. **Progress in Neurobiology**, vol. 73, pp. 1–60, 2004.
- MORRELL, M.J. Catamenial epilepsy and issues of fertility, sexuality and reproduction. **The treatment of epilepsy**, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; p. 671–80, 2001.
- MORRELL, M.J.; GULDNER G.T. Self-reported sexual function and sexual arousability in women with epilepsy. **Epilepsia**, 37(12):1204–10, 1996.
- MOWAFY, H. A.; ALANAZI, F. K.; EL MAGHRABYD, G. M. Development and validation of an HPLC–UV method for the quantification of carbamazepine in rabbit plasma. **Saudi Pharmaceutical Journal**, Vol. 20(1): 29–34; 2012.
- NASHEF, L. Sudden unexpected death in epilepsy: terminology and definitions. **Epilepsia**, Volume 38, Issue Supplement s11, pp. S6–S8, 1997.
- NORONHA, A. L. A.; BORGES, M. A.; MARQUES, L. H. N.; ZANETTA, D. M. T.; FERNANDES, P. T.; BOER, H.; ESPÍNOLA, J.; MIRANDA C. T.; PRILIPKO, L.; BELL, G. S.; SANDER, J. W.; LI, M. L. Prevalence and Pattern of Epilepsy Treatment in Different Socioeconomic Classes in Brazil. **Epilepsia**, 48(5):880–885, 2007.
- NATHANSON, N.M., McKINNON, L.A., KALAYDJIAN, A.E., HAMILTON, S.E., ROSOFF, M.L., NADLER, L.S. Molecular analysis of the regulation of muscarinic receptor expression and function. **Life Sciences**, v. 64, n. 6/7, p. 375-379, 1999.
- OGASAWARA, K.; TERADA, T.; KATSURA, T. et al. Hepatitis C virus-related cirrhosis is a major determinant of the expression. levels of hepatic drug transporters. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, 25(2):190–199, 2010.
- OLNEY, J. W.; GUBAREFF, T.; LABRUYERE, J. Seizure-related brain damage induced by cholinergic agents. **Nature**, 301, 520 – 522, 1983.
- OLNEY, J.W., COLLINS, R.C., SLOVITER, R.S. Excitotoxic mechanisms of epileptic brain damage. **Advances in neurology**, v. 44, p. 857-877, 1986.
- OWEN, A.; PIRMOHAMED, M.; TETTEY, J. N.; MORGAN, P.; CHADWICK, D.; PARK, B. K. Carbamazepine is not a substrate for P-glycoprotein. **British journal of clinical pharmacology**, 51(4), 345-349, 2001.

PANG, K.S.; WANG, P.J.; CHUNG, A.Y.; WOLKOFF, A.W. The modified dipeptide, enalapril, an angiotensin-converting enzyme inhibitor, is transported by the rat liver organic anion transport protein. **Hepatology**, 28(5):1341-6, 1998.

PANG, K. S.; CHUNG, A.; CUI, Y.; KEPPLER, D. Abolition of biliary excretion of enalapril and enalaprilat in EHBR perfused livers and enalapril is transported by OATP-2 and OATP-8. In **AAPS (American Association of Pharmaceutical Scientists) Annual Meeting**, pp. 12-14, 2002.

PARENT, J. M. et al. Aberrant Seizure-Induced Neurogenesis in Experimental Temporal Lobe Epilepsy. **Annals of Neurology**, v.59, p.81-91, 2006.

PATIL, S.; KUMAR, L.; KOHLI, G.; BANSAL, A. Validated HPLC method for concurrent determination of antipyrine, carbamazepine, furosemide and phenytoin and its application in assessment of drug permeability through caco-2 cell monolayers. **Scientia Pharmaceutica**, 80: 89–100, 2012.

PATSALOS, P.N.; PERUCCA, E. Clinically important drug interactions in epilepsy: general features and interactions between antiepileptic drugs. **Lancet Neurology**, V. 2, 347-356, 2003.

PATSALOS, P.N.; PERUCCA, E. Clinically important drug interactions in epilepsy: interactions between antiepileptic drugs and other drugs. **Lancet Neurology**, V. 2, 473-481, 2003.

PELLOCK, J. M. Carbamazepine side effects in children and adults. **Epilepsia**, vol. 28, pp. 64-70, 1987.

PERALTA, E. G.; WINSLOW, J. W.; PETERSON, G. L.; SMITH, D. H.; ASHKENAZI, A.; RAMACHANDRAN, J.; SCHIMERLIK, M. I.; CAPON, D. J. Primary structure and biochemical properties of an M2 muscarinic receptor. **Science**, v. 236, p. 600-605, 1987.

PERALTA, E. G.; ASHKENAZI, A.; WINSLOW, J. W.; RAMACHANDRAN, J.; CAPON, D. J. Differential regulation of PI hydrolysis and adenylyl cyclase by muscarinic receptor subtypes. **Nature**, 334, 434 – 437, 1988.

PEREIRA, D. G. Importância Do Metabolismo No Planejamento De Fármacos. **Química Nova**, Vol. 30, No. 1, 171-177, 2007.

PEREIRA, M. G.; BECARI, C.; OLIVEIRA, J. A.; SALGADO, M. C. O.; GARCIA-CAIRASCO, N., & COSTA-NETO, C. M. Inhibition of the renin–angiotensin system prevents seizures in a rat model of epilepsy. **Clinical Science**, 119(11), 477-482, 2010.

PERSINGER, M.A., LEUNG, L.S., STEWART, L.S. Diurnal variation in pilocarpine-induced generalized tonicclonic seizure activity. **Epilepsy Research**, v. 44, p. 207-212, 2001.

PERUCCA, E. Clinically relevant drug interactions with antiepileptic drugs. **British Journal of Clinical Pharmacology**, V. 61, 246-255, 2006.

PERUCCA, E.; RICHENS, A. Antiepileptic drug interactions. In: Frey HH, Janz D. **Antiepileptic drugs: handbook of experimental pharmacology**, vol 74. Berlin: Springer-Verlag, 831–55, 1985.

PITKÄNEN, A.; SCHWARTZKROIN, P.A.; MOSHÉ, S.L. Models of seizures and epilepsy. **Amsterdam: Elsevier**; 2006.

PURANIK, Y.G.; BIRNBAUM, A.K.; MARINO, S.E. *et al.* Association of carbamazepine major metabolism and transport pathway gene polymorphisms and pharmacokinetics in patients with epilepsy. **Pharmacogenomics**, 14(1), 35–45, 2013.

PURPURA, D.P.; PENRY, J.K.; TOWER, D.; WOODBURY, D.M.; WALTER, R. **Experimental models of epilepsy—a manual for the laboratory worker**, New York: Raven Press; 1972.

QUEIROZ, R.H.C.; BERTUCCI, C.; MALFARÁ, W.R.; DREOSSI, S.A.C.; CHAVES, A.R.; VALÉRIO, D.A.R. *et al.* Quantification of carbamazepine, carbamazepine-10,11- epoxide, phenytoin and phenobarbital in plasma samples by stir bar-sorptive extraction and liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 48: 428–434, 2008.

REGESTA, G.; TANGANELLI, P. Clinical aspects and biological bases of drug-resistant epilepsies. **Epilepsy Research**, v. 34: 109-22, 1999.

RIZZI, M.; CACCIA, S.; GUISO, G.; RICHICHI, C.; GORTER, J.A.; ARONICA, E.; ALIPRANDI, M.; BAGNATI, R.; FANELLI, R.; D'INCALCI, M.; SAMANIN, R.; VEZZANI, A. Limbic seizures induce P-glycoprotein in rodent brain: functional implications for pharmacoresistance, **Journal of Neuroscience**, 22, 5833–5839, 2002.

ROCHA E SILVA, M., BERALDO, W.T., ROSENFELD, G., Bradykinin hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulins by snake venoms and by trypsin. **American Journal of Physiology**, 156, 261–273, 1949.

RUSH, A. M. and ELLIOTT, J. R. Phenytoin and carbamazepine-Differential inhibition of sodium currents in small cells from adult rat dorsal root ganglia. **Neuroscience Letters**, 226: 95–98, 1997.

RYTTER, E.; JOHANNESSEN LANDMARK, C.; JOHANNESSEN, S.I. Admission of children to a referral center for epilepsy- does it make a difference? **Seizure**, v. 18, 573-579, 2009.

SAAVEDRA, J.M. Brain angiotensin II: new development, unanswered questions and therapeutic opportunities. **Cellular and Molecular Neurobiology**, 25:485– 512, 2005.

SARKAR, P.; NICHOLSON, G.; HALL, G. Brief review: Angiotensin converting enzyme inhibitors and angioedema: anesthetic implications. **Canadian Journal of Anesthesia**, V.: 53: 10, pp 994–1003, 2006.

SCHLINDWEIN-ZANINI, R.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, MIRNA, M.; PORTUGUEZ, W. Artigo de revisão: Aspectos neuropsicológicos da Epilepsia do Lobo Temporal na infância. **Revista de neurociências**, 2008.

SCORZA, F. A. et. al. The pilocarpine model of epilepsy: what have we learned? **Anais da Academia Brasileira de Ciências** [online], vol.81, n.3, pp. 345-365, 2009.

SCOTT, D.E.; **The history of epileptic therapy**. Carnforth: Parthenon, 1993.

SERRALHEIRO, A.; ALVES G.; FORTUNA, A.; ROCHA, M.; FALCÃO, A. First HPLC–UV method for rapid and simultaneous quantification of phenobarbital, primidone, phenytoin, carbamazepine, carbamazepine-10,11-epoxide, 10,11-trans-dihydroxy-10,11 dihydrocarbamazepine, lamotrigine, oxcarbazepine and licarbazepine in human plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 925, pp. 1–9, 2013.

SEVCENCU, C; STRUIJK, J. J. Autonomic alterations and cardiac changes in epilepsy. **Epilepsia**, 51(5):725–737, 2010.

SHORVON, S.; TOMSON, T. Sudden unexpected death in epilepsy. **Lancet**, Vol. 378: 2028–38, 2011.

SOLINAS C; BRIELLMANN, R.S.; HARVEY, A.S.; MITCHELL, L.A.; BERKOVIC, S.F. Hypertensive encephalopathy Antecedent to hippocampal sclerosis and temporal lobe epilepsy? **Neurology**, v. 60, pp. 1534-1535, 2003.

SONG, J.; GAO, J.; SHI, S.; TIAN, D.; YIN, W. Evaluation of the Bioequivalence of Two Tablet Formulations of Enalapril after Single Oral Administration to Chinese Healthy Volunteers. **Latin American Journal of Pharmacy**, 33 (6): 942-7, 2014.

SPINA, E.; PISANI, F.; PERUCCA, E. Clinically significant pharmacokinetic drug interactions with carbamazepine. **Clinical Pharmacokinetics**, Volume 31, Issue 3, pp 198-214, 1996.

STEVENS, J.R. Interictal clinical manifestations of complex partial seizures. **Advances in neurology: complex partial seizures and their treatment**, vol. 11, p. 85; 1975.

STÖLLBERGER, C.; FINSTERER, J. Left ventricular hypertrabeculation/noncompaction. **Journal of the American Society of Echocardiography**, Volume 17, Number 1. Pp. 91-100, 2004.

STROLIN-BENEDETTI, M.; BANI, M. Metabolism-based interactions involving oral azole antifungals in humans. **Drug Metabolism Reviews**, 31: 665–717, 1999.

SUNDQVIST, A. Epilepsy: a clinical diagnostic overview. **Europe Jornal Pain**, 6(Suppl A):21-5; 2002.

SURGES, R.; HENNEBERGER, C.; ADJEI, P.; SCOTT, C. A.; SANDER, J. W.; WALKER, M. C. Do Alterations In Inter-Ictal Heart Rate Variability Predict Sudden Unexpected Death In Epilepsy? **Epilepsy Research**, v. 87, ISSUES 2-3, PP. 277-280, 2009.

TARTARA, A.; GALIMBERTI, C.A.; MANNI, R. et al. Differential effects of valproic acid and enzyme-inducing anticonvulsants on nimodipine bioavailability in epileptic patients. **British Journal of Clinical Pharmacology**, 32: 335–40, 1991.

TEIXEIRA, L. S. M. **Contribuição do tratamento com fármacos Antiepiléticos para o declínio cognitivo na Epilepsia**. Lisboa. Dissertação de mestrado. 61 f. Universidade Lusófona Humanidades e Tecnologias, 2012.

TELLEZ-ZENTENO, J. F.; MATIJEVIC, S.; WIEBE, S. Somatic comorbidity of epilepsy in the general population in Canada. **Epilepsia**, 46:1955–1962, 2005.

THAMOTHARAN, M.; BAWANI, S. Z.; ZHOU, X.; ADIBI, S. A. Hormonal regulation of oligopeptide transporter pept-1 in a human intestinal cell line. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, 276(4), C821-C826, 1999.

THIEBAUT, F.; TSURUO, T.; HAMADA, H.; GOTTESMAN, M.M.; PASTAN, I.; WILLINGHAM, M.C. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. **National Academy Science**, v. 84, p. 7735-7738, 1987.

TISHLER, D.M.; WEINBERG, K.I.; HINTON, D.R.; BARBARO, N.; ANNETT, G.M.; RAFFEL, C. MDR1 gene expression in brain of patients with medically intractable epilepsy. **Epilepsia**, 36:1–6, 1995.

TOLOU-GHAMARI, Z.; ZARE, M.; HABIBABADI, J. M.; NAJAFI, M. R. A quick review of carbamazepine pharmacokinetics in epilepsy from 1953 to 2012. **Journal of Research in Medical Sciences**, 18:S81-S85, 2013.

TOMSON, T.; NASHEF, L.; RYVLIN, P. Sudden Unexpected Death In Epilepsy: Current Knowledge And Future Directions. **The lancet neurology**, vol. 7, issue11, pp. 1021-1031, 2008.

TRAMONTI, G.; XIE, P.; WALLNER, E.I.; DANESH, F.R.; KANWAR, Y.S. Expression and functional characteristics of tubular transporters: P-glycoprotein, PEPT1, and PEPT2 in renal mass reduction and diabetes. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, 291(5):F972–F980, 2006.

TRINKA, E. Epilepsy: comorbidity in the elderly. **Acta Neurologica Scandinavica**, 108 (Suppl. 180): 33–36, 2003.

TSIROPOULOS, I.; GICHANGI, A.; ANDERSEN, M.; BJERRUM, L.; GAIST, D.; HALLAS, J. Trends in utilization of antiepileptic drugs in Denmark. **Acta Neurologica Scandinavica**, 113, 405-411, 2006. Erratum in: *Acta Neurol. Scand.*, 114, 70, 2006.

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.315-35, 1983.

USLU, B.; ÖZDEN, T. HPLC and UPLC Methods for the Simultaneous Determination

of Enalapril and Hydrochlorothiazide in Pharmaceutical Dosage Forms. **Chromatographia**, vol. 76, pp.1487–1494, 2013.

VAN DE VRIE-HOEKSTRA, N.W.; DE VRIES, T.W.; VAN DEN BERG, P.B.; BROUWER, O.F.; DE JONG-VAN DEN BERG, L.T. Antiepileptic drug utilization in children from 1997-2005--a study from the Netherlands. **European Journal of Clinical Pharmacology**, V. 64, 1013-1020, 2008.

VAN VLIET, E.; ARONICA, E.; REDEKER, S.; MARCHI, N.; RIZZI, M.; VEZZANI, A.; GORTER, J. Selective and persistent upregulation of mdr1b mRNA and P-glycoprotein in the parahippocampal cortex of chronic epileptic rats, **Epilepsy Research**, v. 60, 203–213, 2004.

VENAGAS, M. A. A.; AVILEZ A. B., JIMENEZ S. M.; Bioquímica de la epilepsia y modelos experimentales de epilepsia. **Revista de Especialidades Médico Quirúrgicas**, vol. 9, núm. 3, setembro-dezembro, pp. 15-20, 2004.

VERGNES, M.; KIESMANN, M.; MARESCAUX, C.; DEPAULIS, A.; MICHELETTI, G. Kindling of audiogenic seizures in the rat. **International Journal of Neuroscience**. 36(3-4):167-76, 1987.

VOSOUGH, M.; GHAFGHAZI, S.; SABETKASAEI, M. Chemometrics enhanced HPLC–DAD performance for rapid quantification of carbamazepine and phenobarbital in human serum samples. **Talanta**. v. 119. 17–23, 2014.

WANG, P.; LIANG, Y.; CHEN, B.; ZHOU, N.; YI, L.; YU Y.; YI, Z. Simultaneous Determination of Enalapril and Enalaprilat in Human Plasma by LC-MS: Application to a Bioequivalence Study. **Chromatographia**, v. 65, p. 209-215, 2007.

WESS, J.; BONNER, T. I.; DÖRJE, F.; BRANN, M. R. Delineation of muscarinic receptor domains conferring selectivity of coupling to guanine nucleotide-binding proteins and second messengers. *Mol. Pharmacol.*, v. 38, p. 517-523, 1990.

WIESER, H.G. ILAE Commission Report. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. **Epilepsia**. V. 45, 695-714, 2004.

WILLOW, M.; GONOI, T.; CATTERALL, W. A. Voltage clamp analysis of the inhibitory action of diphenylhydantoin and carbamazepine on voltage-sensitive sodium channels in neuroblastoma cells. **Molecular pharmacology**. 27:549–558, 1985.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Epilepsy. Disponível em:<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/en/index.html>> . Acesso em 21/06/2016.

WRIGHT J.W.; HARDING J. The brain angiotensin system and extracellular matrix molecules in neural plasticity, learning and memory. *Prog Neurobiol*, v. 72:263–293, 2004.

YAMADA, T.; HORIUCHI, M.; DZAU, V.J. Angiotensin II type 2 receptor mediates programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:156– 160, 1996.

ZACCARA, G.; PERUCCA, E. Interactions between antiepileptic drugs, and between antiepileptic drugs and other drugs. **Epileptic Disorders**; 16 (4): 409-32, 2014.

## ANEXO

## Anexo I: Carta de aprovação do comitê de ética em uso animal.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
Universidade Federal de Alfenas . UNIFAL-MG  
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714 . Alfenas/MG . CEP 37130-000  
Fone: (35) 3299-1000 . Fax: (35) 3299-1063



Alfenas, 28 de agosto de 2014.

Prof.<sup>a</sup> Vanessa Bergamin Boralli Marques

Prezada Professora,

O projeto sob sua coordenação, registro nº 577/2014, intitulado “Influência da epilepsia na farmacocinética do enalapril e da carbamazepina em ratos” está em conformidade com os princípios éticos exigidos na experimentação animal, tendo sido apreciado e aprovado por essa Comissão.

Por ser verdade, firmo o presente.

Prof Dr Carlos Giovanni de Oliveira Nascimento  
Presidente da CEUA – Unifal-MG