

Universidade de Coimbra
Faculdade de Farmácia



Caracterização neurofarmacocinética da lamotrigina em ratos

Maria Margarida Coutinho de Seabra Castel-Branco Caetano | 2002

Dissertação de candidatura ao grau de Doutor
apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

**Trabalho realizado no Laboratório de Farmacologia
da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.
Suportado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia
Programa Praxis XXI (BD/18351/98).**

**À memória de meu Pai.
À minha Mãe.**

**Ao João
e à Isabelinha.**

É com profunda gratidão que, neste momento, exprimo o meu bem-haja a todos aqueles que, das mais variadas formas, fizeram caminho comigo e, hoje, se congratulam com o trabalho realizado:

Ao Professor Doutor Amílcar Falcão, agradeço não só a orientação científica, com os ensinamentos e as importantes críticas com que foi permanentemente acompanhando o desenvolvimento dos trabalhos, como principalmente a amizade e a confiança que, desde o primeiro momento, me ofereceu. E porque acreditou sempre que seríamos capazes de levar a bom porto tal árdua tarefa, mesmo quando os ventos foram contrários, o meu mais sincero obrigada;

À Professora Doutora Tice Macedo, co-orientadora desta dissertação, agradeço o incentivo bem como a disponibilidade e as facilidades concedidas para a realização do presente trabalho, através do Instituto de Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, que dirige;

À Professora Doutora Maria Margarida Caramona, Directora do Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, o meu bem-haja pelo acolhimento providenciado e por todo o entusiasmo com que foi acompanhando o desenrolar dos trabalhos;

À Professora Doutora Isabel Vitória: pela imprescindível ajuda e ensinamentos prestados no âmbito da experimentação animal; pelas longas horas passadas em conjunto – com os animais – no laboratório; e pela amizade que foi crescendo ao longo destes anos, o meu mais profundo obrigada;

Ao Professor Doutor José Martínez Lanao, Director do Departamento de Farmácia e Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade de Salamanca (Espanha), agradeço a disponibilidade com que me acolheu por diversas vezes em Salamanca e toda a colaboração e ensinamentos prestados no âmbito da farmacocinética;

Ao Professor Doutor Francisco González López, do Departamento de Farmácia e Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade de Salamanca (Espanha), pelo empenhamento pessoal e indispensável colaboração no desenvolvimento da técnica analítica, “muchas gracias”;

À Catarina Alexandra, à Joana Paixão e à Belém que, ao passarem pelo Laboratório de Farmacologia, na ânsia de se iniciarem na investigação científica, me prestaram uma ajuda preciosíssima na execução dos protocolos experimentais, muito obrigada;

Aos meus colegas de jornada – Anabela Almeida, Guida Costa, Marília Rocha e Frederico Pereira –, ao recordar os momentos mais bonitos e os mais árduos destes anos de crescimento científico e pessoal, simplesmente obrigada;

Aos colegas e amigos do Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Farmácia, o meu agradecimento pela forma calorosa como me acolheram e pela disponibilidade e apoio sempre demonstrados;

A todos os que trabalham no Instituto de Farmacologia da Faculdade de Medicina, agradeço a forma como me receberam;

A todos os que me deram ajuda preciosa, e tão discretamente, na Biblioteca da Faculdade de Farmácia, o meu muito obrigada;

À GlaxoSmithKline, agradeço o fornecimento do princípio activo em estudo neste trabalho de investigação – a lamotrigina;

À Fundação para a Ciência e a Tecnologia que, através do Programa Praxis XXI, pela concessão de uma bolsa de doutoramento (BD/18351/98), permitiu a realização e divulgação deste trabalho, expresso também os meus agradecimentos.

E porque o doutoramento não se resume à escrita de uma tese, mas compreende, sobretudo, um período de intenso crescimento científico e pessoal, refiro por último todos os familiares e amigos que, de uma forma mais ou menos consciente, se lançaram comigo nesta aventura e, sem o saberem, foram essenciais para que o dia de hoje seja uma realidade. À minha Mãe, aos meus avozitos, aos meus irmãos e sobrinhos e a todos os amigos, o meu coração agradece o que não consegue dizer em palavras.

E porque o espírito com que se acaba é pai daquele com que se começa, ao meu João e à nossa Isabelinha, na linha da continuidade da vida, dedico desde já todo o futuro que hoje recomeça!

“Apaixona-me, na vida,
saber que posso colaborar numa obra,
algo que me sustém na busca da perfeição
do pensamento e das coisas,
que está para além de mim,
que dá sentido a todo o esforço humano.
Neste momento, de partida e de chegada,
por saber-me parte de um todo e de um tudo
que é maior do que eu,
transbordam em mim a confiança e a alegria.
Então, tudo o que em mim e no mundo
é humano faz sentido”.

Pierre Teilhard de Chardin | 1916

RESUMO | ABSTRACT

Caracterização neurofarmacocinética da **lamotrigina** em ratos

RESUMO

A lamotrigina é um antiepiléptico de nova geração que apresenta um vasto espectro de eficácia, nomeadamente na abordagem de crises parciais com ou sem generalização secundária, de crises tónico-clónicas primariamente generalizadas, de crises de ausência e de crises atónicas. Embora na prática clínica a lamotrigina seja razoavelmente bem tolerada pelos doentes, a dificuldade que existe no estabelecimento de uma relação bem definida entre os níveis plasmáticos obtidos e a resposta farmacológica desencadeada faz com que, actualmente, seja ainda difícil determinar o valor clínico deste antiepiléptico.

Partindo do princípio de que a interpretação dos níveis plasmáticos de qualquer antiepiléptico requer que esses níveis reflectam as concentrações atingidas no cérebro, que é o local onde ele vai exercer a sua acção farmacológica, o presente trabalho de investigação tem por objecto a caracterização neurofarmacocinética da lamotrigina. Por razões de ordem ética e logística, tal estudo foi realizado em animais de laboratório. Assim, após ter-se desenvolvido e validado um técnica cromatográfica para a determinação de lamotrigina em matrizes biológicas, procedeu-se ao estudo dos perfis de concentração de lamotrigina obtidos no plasma e no cérebro de ratos após a administração de uma dose única de fármaco por via intraperitoneal. A partir dos dados obtidos, realizou-se um estudo farmacocinético aprofundado com vista à caracterização do processo de distribuição da lamotrigina entre a circulação sistémica e o sistema nervoso central. Por último, procurou caracterizar-se a distribuição cerebral deste antiepiléptico, através da quantificação do fármaco em diversas regiões cerebrais.

Os resultados obtidos revelaram a existência de linearidade entre a dose de lamotrigina administrada e os níveis plasmáticos e cerebrais atingidos. Na análise conjunta dos dois tipos de curva traçados, a relação entre os níveis plasmáticos e os correspondentes níveis cerebrais mostrou ser também linear, a partir do momento em que o sistema atingiu o equilíbrio; deste modo, os níveis plasmáticos de lamotrigina revelaram-se bons indicadores dos níveis de fármaco no local de acção. A análise cinética do processo de distribuição da lamotrigina entre o plasma e o cérebro revelou que, em doses baixas, a lamotrigina passa mais rapidamente pelo cérebro, pelo que se pode esperar, nesses casos, uma resposta farmacológica de menor intensidade. Tais resultados sugerem que se obtém maior eficácia terapêutica com a utilização de doses de lamotrigina mais elevadas, o que, por sua vez, está de acordo com a actual aceitabilidade clínica de uma margem terapêutica para a lamotrigina mais elevada do que a inicialmente prevista. Por último, a distribuição cerebral da lamotrigina mostrou ser homogénea, o que abre caminho à compreensão dos múltiplos mecanismos de acção que o fármaco apresenta, ao mesmo tempo que pode justificar o vasto espectro de actividade apresentado por este antiepiléptico de nova geração.

ABSTRACT

Lamotrigine is a new generation antiepileptic drug which shows broad-spectrum efficacy against partial seizures, generalized tonic-clonic seizures, absence seizures, drop attacks and other seizure types. Although the use of lamotrigine in clinical practice is reasonably well tolerated by patients, the resulting benefits of its administration are subject to a more complex evaluation. In fact, there seems to exist a linear relationship between the administered dosage and the plasma concentrations obtained; nevertheless, the way in which the plasma levels and the induced pharmacological response inter-relate remains unknown.

As with all antiepileptics, lamotrigine needs to cross the blood-brain barrier to exercise its therapeutic effect. Consequently, the interpretation of the lamotrigine plasma levels requires the assessment of the drug concentration at the neuronal sites of action. From this perspective, the neuropharmacokinetic characterization of lamotrigine would necessarily have to include a parallel study of the evolution of lamotrigine concentrations in the blood and in the brain over time. This characterization constitutes the aim of the present research. For ethical and logistical reasons, this type of work had to resort to animal experimentation. Therefore, after having developed and validated a chromatographic technique for the determination of lamotrigine in biological matrices, the study of the lamotrigine concentration profiles obtained in the blood and in the brain of rats over time, after its acute administration, was performed. Thus, the data obtained was submitted to an extensive pharmacokinetic analysis in order to characterize the lamotrigine distribution process between the systemic circulation and the central nervous system. Additionally, the lamotrigine brain distribution pattern was studied by analysing brain samples from various brain areas.

The results obtained establish a linear relationship between the dose of lamotrigine administered and the plasma or brain levels measured. Linear correlations were also found between lamotrigine plasma and brain levels, since the system has reached equilibrium; consequently, the plasma levels of lamotrigine can be considered good indicators of lamotrigine levels at its site of action. The kinetic analysis of the distribution process of lamotrigine between the blood and the brain showed that, for the lowest dose used, the lamotrigine passage through the brain was faster. And since the drug will be less time at its site of action, a lower response intensity could be expected, which could explain the actual clinical tendency to consider the lamotrigine therapeutic range higher than in earlier studies. In addition, the distribution pattern of lamotrigine in the brain seemed to be homogeneous, providing a better understanding of its anticonvulsant profile as well as suggesting new approaches to the comprehension of its multiple mechanisms of action.

SUMÁRIO

SIGLAS E ABREVIATURAS	031	2.5. Margem terapêutica	077
I. INTRODUÇÃO	037	2.6. Utilização clínica	079
1. EPILEPSIA	039	2.6.1. Indicações terapêuticas	079
1.1. Enquadramento histórico	039	2.6.2. Tolerabilidade	081
1.2. Conceitos sobre epilepsia	040	2.6.3. Interações medicamentosas	083
1.3. Classificação das epilepsias e síndromes epiléticas	044	2.6.3.1. Efeitos de outros antiepiléticos na farmacocinética da lamotrigina	083
1.3.1. Classificação com base na etiologia	044	2.6.3.2. Efeitos da lamotrigina na farmacocinética de outros antiepiléticos	085
1.3.2. Classificação com base no tipo de crise	046	2.6.3.3. Interações farmacodinâmicas	085
1.4. Terapêutica da epilepsia	049	2.6.3.4. Interações da lamotrigina com outros fármacos	087
1.4.1. Antiepiléticos clássicos	049	2.6.4. Dosagem e administração	089
1.4.2. Antiepiléticos de nova geração	050	II. OBJECTIVOS	091
1.4.3. Mecanismos de acção dos fármacos antiepiléticos	052	III. MATERIAL E MÉTODOS	095
2. LAMOTRIGINA	053	1. TÉCNICA ANALÍTICA	097
2.1. História da lamotrigina	053	1.1. Generalidades sobre cromatografia	097
2.2. Descrição do fármaco	054	1.2. Tratamento das amostras biológicas	101
2.2.1. Estrutura molecular	054	1.3. Condições cromatográficas	105
2.2.2. Propriedades físico-químicas	055	1.4. Validação da técnica analítica	106
2.3. Propriedades farmacocinéticas	056	2. DESENHO EXPERIMENTAL	120
2.3.1. No ser humano	056	2.1. Selecção da formulação mais adequada para a administração da lamotrigina	123
2.3.2. No rato	059	2.2. Caracterização da cinética plasmática e cerebral da lamotrigina	124
2.4. Propriedades farmacodinâmicas	063	2.3. Caracterização da distribuição cerebral da lamotrigina	124
2.4.1. Mecanismo de acção	063		
2.4.2. Avaliação experimental da resposta farmacológica da lamotrigina	067		

3. ANÁLISE FARMACOCINÉTICA	127
3.1. Análise cinética da lamotrigina no plasma e no cérebro	127
3.1.1. Estudo da relação entre a dose administrada e os níveis de lamotrigina obtidos	127
3.1.2. Análise compartimental	128
3.1.3. Análise não-compartimental	132
3.2. Análise cinética da distribuição da lamotrigina entre o plasma e o cérebro	134
3.2.1. Estudo da relação entre níveis plasmáticos e níveis cerebrais correspondentes	135
3.2.2. Análise compartimental	135
3.2.3. Análise não-compartimental	139
IV. RESULTADOS	149
1. TÉCNICA ANALÍTICA	151
2. DESENHO EXPERIMENTAL	179
2.1. Seleção da formulação mais adequada para a administração da lamotrigina	179
2.2. Caracterização da cinética plasmática e cerebral da lamotrigina	184
2.3. Caracterização da distribuição cerebral da lamotrigina	189
3. ANÁLISE FARMACOCINÉTICA	190
3.1. Análise cinética da lamotrigina no plasma e no cérebro	190
3.1.1. Estudo da relação entre a dose administrada e os níveis de lamotrigina obtidos	190
3.1.2. Análise compartimental	196
3.1.3. Análise não-compartimental	199
3.2. Distribuição da lamotrigina entre o plasma e o cérebro	200
3.2.1. Estudo da relação entre níveis plasmáticos e níveis cerebrais correspondentes	200
3.2.2. Análise compartimental	202
3.2.3. Análise não-compartimental	204

V. DISCUSSÃO	205
1. TÉCNICA ANALÍTICA	207
1.1. Desenvolvimento da técnica analítica	207
1.2. Validação da técnica analítica	208
2. DESENHO EXPERIMENTAL	220
2.1. Seleção da formulação mais adequada para a administração da lamotrigina	223
2.2. Caracterização da cinética plasmática e cerebral da lamotrigina	227
2.3. Caracterização da distribuição cerebral da lamotrigina	227
3. ANÁLISE FARMACOCINÉTICA	230
3.1. Análise cinética da lamotrigina no plasma e no cérebro	230
3.1.1. Estudo da relação entre a dose administrada e os níveis de lamotrigina obtidos	230
3.1.2. Análise compartimental	236
3.1.3. Análise não-compartimental	237
3.2. Distribuição da lamotrigina entre o plasma e o cérebro	237
3.2.1. Estudo da relação entre níveis plasmáticos e níveis cerebrais correspondentes	237
3.2.2. Análise compartimental	240
3.2.3. Análise não-compartimental	242
VI. CONCLUSÕES	243
VII. BIBLIOGRAFIA	249

SIGLAS E ABREVIATURAS

AIC	Cr�terio de Akaike (<i>Akaike's Information Criterion</i>)
ANOVA	Análise de variância
A _{LTG}	�rea do pico da lamotrigina
A _{Pi}	�rea do pico do padrão interno
AUC	�rea sob a curva
AUMC	�rea sob o primeiro momento da curva
AUFS	Unidades de absorvância (<i>Absorbance Units Full Scale</i>)
BZD	Benzodiazepinas
CBZ	Carbamazepina
CL	<i>Clearance</i> (depura�o)
CL/V	<i>Clearance</i> (depura�o) de distribui�o normalizada com o volume tecidual
C _c	Concentra�o cerebral
C _p	Concentra�o plasmática
C _{máx}	Concentra�o máxima
CV	Coefficiente de varia�o
DP	Desvio-padrão
ED ₅₀	Dose eficaz a 50% (<i>median effective dose</i>)
EDTA	�cido etileno-diamino-tetracético (<i>ethylene diamine tetra acetic acid</i>)
%ER	Porcentagem de erro relativo
ESM	Etossuccimida
FBM	Felbamato
f _c	Frac�o livre de fármaco no cérebro

f_p	Fracção livre de fármaco no plasma	r	Coefficiente de correlação
$FUD = F(t)$	Função unitária de disposição	r^2	Coefficiente de determinação
GABA	Ácido γ -aminobutírico	r.p.m.	Rotações por minuto
GBP	Gabapentina	s	Operador de Laplace
Glu	Glutamato	$t_{1/2a}$	Tempo de semivida de absorção
HPLC	Cromatografia líquida de elevada resolução (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)	$t_{1/2el}$	Tempo de semivida de eliminação
$I(t)$	Função de incorporação do fármaco no sistema	$t_{máx}$	Tempo em que se alcança a concentração máxima
IC ₉₀	Intervalo de confiança a 90%	TMR	Tempo médio de residência
IC ₉₅	Intervalo de confiança a 95%	TMT	Tempo médio de trânsito
ILAE	Liga internacional contra a epilepsia (<i>International League Against Epilepsy</i>)	TGB	Tiagabina
i.p.	Intraperitoneal	TPM	Topiramato
k_a	Constante aparente de velocidade de absorção	V_c	Volume de distribuição do compartimento cerebral
k_{el}	Constante aparente de velocidade de eliminação	V_p	Volume de distribuição do compartimento plasmático
k_{12}	Constante aparente de velocidade de transferência do plasma (1) para o cérebro (2)	V_d	Volume de distribuição
k_{21}	Constante aparente de velocidade de transferência do cérebro (2) para o plasma (1)	V_i	Velocidade de incorporação
LEV	Levetiracetam	VGB	Vigabatrina
LTG	Lamotrigina	VPA	Ácido valpróico
M	Média aritmética	w_i	Factor de ponderação (<i>weighting factor</i>)
OXC	Oxcarbazepina	X_c	Quantidade de fármaco livre no cérebro
PB	Fenobarbital	X_p	Quantidade de fármaco livre no plasma
PHT	Fenitoína	ZNS	Zonisamida
PRM	Primidona		
Q	Fluxo sanguíneo		
R	Coefficiente de partilha cérebro / plasma		
$R(t)$	Função de resposta do sistema		

I. INTRODUÇÃO

1. EPILEPSIA

1.1. Enquadramento histórico

A epilepsia é uma doença conhecida desde tempos remotos e que afecta actualmente 1% da população mundial, ou seja, cerca de 50 milhões de pessoas (PERUCCA, 1996; BIALER, 2002). A palavra *epilepsia* deriva do termo grego επιλαμβανειν (*epilamvanein*), que significa *ser atacado*. De facto, na Grécia antiga todas as doenças eram consideradas como um castigo exercido pelos deuses ou espíritos malignos contra a pessoa e, portanto, um ataque sofrido pelo indivíduo; no entanto, dadas as características das crises epilépticas, que se assemelham às das possessões demoníacas, a epilepsia era considerada a “doença sagrada” por excelência (ENGEL e PEDLEY, 1997). Também em Roma, a epilepsia tinha uma conotação negativa, de tal modo que as leis romanas obrigavam à suspensão de qualquer comício se um dos circunstantes fosse acometido de um ataque epiléptico; por esta razão, a epilepsia denominava-se de *morbus comitialis* (ESTEVES, 1994).

Foi Hipócrates quem, 400 anos antes da era de Cristo, reconheceu, pela primeira vez, a epilepsia como uma doença do cérebro, que devia ser tratada com dietas e medicamentos em detrimento das mezinhas religiosas. Contudo, só em meados do século XIX, com John Hughlings Jackson, se iniciou a abordagem científica do fenómeno epiléptico. Estabelecendo que as crises são causadas por descargas ocasionais, rápidas, excessivas e localizadas da substância cinzenta; que existem vários tipos de crises, cada uma com a sua fisiologia; e que uma crise generalizada ocorre quando o cérebro normal é invadido por uma actividade iniciada num foco anormal, entre outras considerações, John Hughlings Jackson tornou-se o pai dos conceitos contemporâneos de epilepsia (RALL e SHLEIFER, 1990; ENGEL e PEDLEY, 1997).

Muitos dos desenvolvimentos da neurociência básica da segunda metade do século XX relacionam-se com a epilepsia, quer directamente – por exemplo, através de estudos celulares dos mecanismos da doença – quer indirectamente – por exemplo, mediante a investigação da excitabilidade cortical e do seu controlo (ENGEL e PEDLEY, 1997). Contudo, muito pouco se sabe ainda acerca do processo da epileptogénese, pelo que não se pode fazer muito, do ponto de vista clínico, para a protecção de indivíduos com fortes probabilidades de virem a desenvolver epilepsia. Já se pode, no entanto, actuar com melhores resultados na fenomenologia das crises, no intuito de as prevenir assim que se começam a manifestar (DICTER, 1997).

Em todas as épocas, e quase até à actualidade, os doentes epiléticos têm sido marginalizados, quer do ponto de vista social, quer profissional ou mesmo familiar. Actualmente, o melhor conhecimento da doença e as variadas possibilidades terapêuticas permitem afirmar que a maior parte dos doentes epiléticos é perfeitamente recuperável, gozando de completa integração familiar e social (ESTEVES, 1994).

1.2. Conceitos sobre epilepsia

A *epilepsia* não é uma doença específica. Na verdade, é uma vasta categoria de sintomas complexos, que resultam de um elevado número de funções cerebrais desordenadas que, por sua vez, podem ser secundárias de uma imensa variedade de processos patológicos. Parte da diversidade que caracteriza a expressão clínica das crises deriva do facto de diferentes áreas cerebrais serem responsáveis por diferentes aspectos da fenomenologia epilética (ENGEL e PEDLEY, 1997). A epilepsia pode considerar-se como uma desordem crónica do sistema nervoso central caracterizada por crises repetidas que,

aparecendo subitamente, constituem episódios intermitentes de actividade eléctrica excessiva do cérebro acompanhados dos correspondentes sintomas clínicos (FUERST, 1990).

A *crise* ou *ataque epilético* é a manifestação clínica da epilepsia, consistindo num episódio repentino e intermitente, de actividade eléctrica excessiva, que ocorre algures no sistema nervoso central (predominantemente no córtex cerebral). Ao local onde se produz a descarga corresponde uma determinada manifestação clínica (motora, sensorial, autonómica e/ou psicológica) e um determinado traçado electroencefalográfico que se encontra fora dos padrões normais (ESTEVES, 1994; BLUME e WOLF, 1997; ENGEL e PEDLEY, 1997).

Descrevem-se, em seguida, os principais tipos de crise (GRAM, 1990; RALL e SHLEIFER, 1990; SHORVON, 1990; ZARRANZ, 1992; ESTEVES, 1994; DREIFUSS, 1997):

Crises generalizadas

As crises generalizadas emergem de descargas epiléticas que se estendem a ambos os hemisférios cerebrais, de forma ampla e simultânea, desde o início da crise. A perda ou a diminuição da consciência – uma das primeiras manifestações deste tipo de crises – é um exemplo claro da implicação de ambos os hemisférios desde os primeiros momentos da crise. As manifestações motoras, quando ocorrem, afectam as quatro extremidades. As crises generalizadas podem ser ou não convulsivas, classificando-se em diferentes grupos:

> As *ausências* (denominadas de *pequeno mal* em classificações mais antigas) são crises generalizadas não convulsivas, que levam à interrupção momentânea das actividades em curso: têm início súbito, duram apenas alguns segundos, e terminam

tão rapidamente como começaram – o indivíduo sente-se, por breves instantes, desligado do ambiente em que se encontra, apresentando um rosto sem expressão, olhos fixos e pálpebras semicerradas. As crises de ausência podem classificar-se em *simples* ou, quando acompanhadas de outras manifestações clínicas, em *complexas*.

> As *crises mioclónicas* (denominadas de *pequeno mal impulsivo* em classificações mais antigas) são aquelas que, iniciando-se repentinamente e durando muito pouco tempo, consistem em movimentos musculares súbitos e bruscos, que podem ser generalizados ou confinados a algumas áreas, como, por exemplo, à face e ao tronco, ou a uma ou mais extremidades, ou mesmo a músculos ou a grupos de músculos individuais. Estas crises podem repetir-se em intervalos curtos ou ser relativamente isoladas.

> As *crises tónicas* envolvem uma contracção muscular rígida e violenta, capaz de colocar os membros em posições fixas, o que origina a queda do indivíduo.

> As *crises clónicas* caracterizam-se por movimentos musculares bruscos e repetidos na ausência do componente tónico.

> As *crises tónico-clónicas* (denominadas de *grande mal* em classificações mais antigas) são de natureza convulsiva, iniciando-se com uma perda súbita de consciência, ao que se segue a perda de tônus muscular e a queda do indivíduo, sendo ainda muitas vezes acompanhadas de inibição respiratória capaz de desencadear um estado de cianose; seguem-se uma fase de contracções tónicas e outra de movimentos clónicos convulsivos, de duração variável; surgem depois depressão respiratória profunda e relaxamento muscular total, após o que o indivíduo permanece ainda inconsciente durante um período indeterminado de tempo; no final, o doente entra numa fase de sono profundo.

> As *crises atónicas* ou *astáticas* consistem numa diminuição súbita do tônus muscular conducente à queda do indivíduo.

Crises parciais

Nas crises parciais, a actividade epiléptica limita-se geralmente a uma zona focal do cérebro. As primeiras alterações clínicas e electroencefalográficas indicam a activação inicial de um sistema de neurónios limitado a uma parte de um dos hemisférios cerebrais. Dependendo do foco de origem do fenómeno, assim será a porção do corpo envolvida na manifestação clínica da crise. As crises parciais têm início súbito e podem repetir-se várias vezes durante o dia, inclusive no tempo de sesta ou sono nocturno.

Se não se verificar perda de consciência, a crise parcial denomina-se *simples*; se ocorrer diminuição de consciência, denomina-se *complexa*. Nesta última situação, alguns indivíduos, antes de ficarem inconscientes, experimentam uma sensação estranha – como se fosse uma aragem prenunciadora da crise vindoura – denominada de *aura*. Outros indivíduos associam às manifestações clínicas próprias da crise parcial complexa certos automatismos: actividades motoras que podem constituir simplesmente a continuação da actividade que se estava a fazer antes da perda da consciência ou uma nova actividade iniciada no preciso momento em que se perdeu a consciência.

Pode acontecer que a actividade epiléptica não se autolimite, antes se estenda até atingir os dois hemisférios cerebrais. Nesse caso, está-se perante uma *crise parcial secundariamente generalizada*.

1.3. Classificação das epilepsias e síndromes epilépticas

Dada a complexidade do fenómeno epiléptico, a epilepsia pode classificar-se de várias maneiras, tendo em conta diferentes aspectos: manifestações clínicas (geralmente o tipo de crise), alterações electroencefalográficas, etiologia, fisiopatologia, anatomia e/ou idade (GRAM, 1990; SHORVON, 1990). A classificação da epilepsia contribui decididamente para um maior sucesso no seu tratamento. De facto, torna-se num instrumento bastante útil no processo de escolha do fármaco antiepiléptico inicial, atendendo a que essa escolha se deve basear no diagnóstico preciso da crise convulsiva e na eficácia do fármaco antiepiléptico no tipo de crise identificado (DREIFUSS, 1997).

1.3.1. Classificação com base na etiologia

As epilepsias podem classificar-se, segundo a sua etiologia, em idiopáticas, sintomáticas ou criptogénicas (COMMISSION, 1989; FUERST, 1990; GRAM, 1990; SHORVON, 1990; ZARRANZ, 1992; ESTEVES, 1994; BLUME e WOLF, 1997; ENGEL e PEDLEY, 1997; WOLF, 1997):

Idiopáticas

As epilepsias idiopáticas – do grego ιδιοζ, “próprio de cada um”, e παθος, “sofrimento, padecimento” – pressupõem que não há outra causa subjacente para além de uma possível predisposição hereditária. Estas epilepsias não se seguem, por isso, a lesões cerebrais nem a outras anormalidades neurológicas, assim como não são resultantes de uma diminuição mental. A sua manifestação está intimamente relacionada com a idade do indivíduo. Este tipo de epilepsias responde com facilidade à terapia com fármacos antiepilépticos.

Sintomáticas

As epilepsias sintomáticas – do grego συν, “juntamente com”, e πτωσιζ, “ocorrência” – surgem em consequência de um transtorno, suspeitado ou conhecido, do sistema nervoso central, com origem no próprio sistema ou noutra parte do organismo. Por exemplo, situações de trauma ou febre, infecções, tumores, ingestão de agentes tóxicos, doenças cerebrovasculares ou diversas condições metabólicas podem induzir diferentes formas de epilepsia. Por essa razão, estas epilepsias são também denominadas de *secundárias*. A manifestação da crise está dependente da localização da anormalidade causativa estrutural e normalmente é parcial, podendo verificar-se ou não generalização secundária. Este tipo de epilepsias é resistente à terapia em diversos graus.

Criptogénicas

As epilepsias criptogénicas – do grego κρυπτοζ, “obscuro”, e γενεσιζ, “origem” – constituem cerca de 60-70% de todas as epilepsias e incluem as epilepsias cuja etiologia não pode ser suficientemente identificada, ou seja, todas as epilepsias de causa oculta. Esta situação resulta do facto de a etiologia da epilepsia ser muitas vezes multifactorial, o que torna impossível determinar com exactidão a sua causa. Presumivelmente, este tipo de epilepsias é sintomático, mas a sua causa permanece desconhecida.

1.3.2. Classificação com base no tipo de crise

Em 1969, a Liga Internacional Contra a Epilepsia (ILAE – *International League Against Epilepsy*) elaborou um esquema denominado “classificação internacional dos tipos de crise”. Este esquema, revisto em 1981, classifica o tipo de crise tomando apenas em consideração manifestações clínicas e dados electroencefalográficos (tabela I.1). No entanto, pelo facto de um determinado tipo de convulsão poder expressar várias “classes” de epilepsia e algumas epilepsias poderem cursar com vários tipos de convulsão, esta classificação revelou-se pouco abrangente. A ILAE criou então, em 1985, um novo esquema denominado “classificação internacional das epilepsias e síndromes epilépticas”, o qual, revisto em 1989, é hoje amplamente utilizado. Esta classificação agrupa as epilepsias de uma forma mais exaustiva, tomando em consideração não só o tipo de crise e os dados electroencefalográficos como também dados de prognose, fisiopatológicos e etiológicos. Com base no presumível local de origem da crise (crises parciais ou generalizadas) e na sua etiologia (crises idiopáticas, sintomáticas ou criptogénicas), as epilepsias e síndromes epilépticas são divididas em quatro grandes classes; dentro de cada classe, por sua vez, formam-se subgrupos de doentes com base noutras variáveis, como a idade, a história familiar, o desenvolvimento do cérebro, a função intelectual, a etiologia específica, dados electroencefalográficos ou manifestações clínicas (tabela I.2) (COMMISSION, 1989; GRAM, 1990; SHORVON, 1990; WOLF, 1997). Apesar desta classificação ser um instrumento muito útil no diagnóstico das epilepsias na prática clínica, nem sempre as situações clínicas reais são devidamente identificadas, muitas vezes devido a uma menor experiência dos seus utilizadores. Neste contexto, Rinaldi *et al.* (2000) elaboraram, recentemente, um algoritmo que visa a facilitação da aplicação prática da referida classificação. O algoritmo segue a estrutura original da classificação apresentada pela

ILAE em 1989 e permite a aplicação prática desse esquema no momento do diagnóstico em diferentes contextos clínicos. As limitações verificadas na utilização do algoritmo reflectem, em parte, as limitações intrínsecas do próprio esquema de classificação, evidenciando a necessidade de aparecimento de um novo esquema mais adequado à actual prática clínica.

Tabela I.1 Classificação internacional dos tipos de crise.

-
- I. Crises parciais (início numa área localizada do cérebro)
 - A. Crises parciais simples (sem perda de consciência)
 - Com sinais motores
 - Com sintomas somato-sensoriais ou sensoriais especiais
 - Com sinais e sintomas autonómicos
 - Com sintomas psíquicos
 - B. Crises parciais complexas (com perda de consciência)
 - Início como crise parcial simples seguida de perda de consciência
 - Com perda de consciência desde o início
 - C. Crises parciais secundariamente generalizadas
 - Crises parciais simples que evoluem para generalizadas
 - Crises parciais complexas que evoluem para generalizadas
 - Crises parciais simples que evoluem para parciais complexas e depois para generalizadas
 - II. Crises generalizadas (envolvem ambos os hemisférios cerebrais)
 - A.1. Ausência (pequeno mal)
 - A.2. Ausência atípica
 - B. Crises mioclónicas
 - C. Crises clónicas
 - D. Crises tónicas
 - E. Crises tónico-clónicas (grande mal)
 - F. Crises atónicas
 - III. Crises epilépticas não classificadas
-

Adaptado de GRAM, 1990; SHORVON, 1990; WOLF, 1997.

Tabela I.2 Classificação internacional das epilepsias e síndromes epiléticas.

-
1. Epilepsias e síndromes focais, parciais ou locais (relacionadas com a localização)
 - 1.1. Idiopáticas
 - Epilepsia rolândica (epilepsia benigna da infância com pontas centro-temporais)
 - Epilepsia occipital
 - Epilepsia primária da leitura
 - 1.2. Sintomáticas
 - Epilepsia parcial contínua crónica progressiva
 - Síndromes com modalidades específicas de desencadeamento
 - Epilepsias dos lobos temporal, frontal, parietal ou occipital
 - 1.3. Criptogénicas
 2. Epilepsias e síndromes generalizadas
 - 2.1. Idiopáticas
 - Convulsões neonatais benignas (familiares ou não)
 - Epilepsia mioclónica benigna da infância
 - Epilepsia infantil ou juvenil com ausências
 - Epilepsia mioclónica infantil ou juvenil
 - Epilepsia com crises de grande mal (ao acordar)
 - Outras epilepsias idiopáticas generalizadas
 - Epilepsia com crises desencadeadas por estímulos específicos
 - 2.2. Criptogénicas ou sintomáticas
 - Síndrome de West (espasmos infantis)
 - Síndrome de Lennox-Gastaut
 - Epilepsia com convulsões mioclónico-astáticas
 - Epilepsia com ausências mioclónicas
 - 2.3. Sintomáticas
 - Síndromes específicas (consequência de diversas situações clínicas)
 - Epilepsia e síndromes indeterminadas (focais ou generalizadas)
 3. Epilepsias e síndromes indeterminadas focais ou generalizadas
 - 3.1. Com crises focais e generalizadas
 - Crises neonatais
 - Epilepsia com ponta-onda contínua durante o sono
 - Epilepsia infantil mioclónica grave
 - Afasia epilética adquirida (síndrome de Landau-Kleffner)
 - Outras epilepsias indeterminadas
 - 3.2. Sem traços focais ou generalizados inequívocos
 4. Síndromes especiais (relacionadas com a situação)
 - Convulsões febris
 - Estado de mal epilético isolado ou crises isoladas
 - Convulsões que resultam de perturbações metabólicas ou estados tóxicos
-

Adaptado de COMMISSION, 1989; GRAM, 1990; SHORVON, 1990; WOLF, 1997.

1.4. Terapêutica da epilepsia

1.4.1. Antiepiléticos clássicos

Desde meados do século XIX que a abordagem terapêutica da epilepsia se tem vindo a implementar com o objectivo de prevenir a ocorrência de crises em indivíduos epiléticos. Os primeiros compostos a serem utilizados foram os brometos, em 1857, e durante quase sessenta anos constituíram a única terapêutica disponível na prática clínica para a abordagem da epilepsia. Em 1912, foi descoberta a eficácia antiepilética do fenobarbital (PB). Seguiu-se a introdução da fenitoína (PHT), em 1938. Em 1972, foi a vez da carbamazepina (CBZ) e, em 1978, a do ácido valpróico (VPA). Desde então, e até ao início dos anos 90, as opções para a terapêutica medicamentosa da epilepsia limitaram-se aos principais antiepiléticos clássicos – fenobarbital, fenitoína, carbamazepina e ácido valpróico – e a compostos como a primidona (PRM), a etossuccimida (ESM) e algumas benzodiazepinas (BZD) (SHORVON, 1990; PORTER e ROGAWSKI, 1992; BIALER, 1993; LÖSCHER e SCHMIDT, 1994; WHITE, 1999; BIALER, 2002).

A terapêutica clássica, no entanto, não se revelou totalmente satisfatória: se a utilização destes fármacos, por um lado, permitia a erradicação das crises epiléticas em cerca de 70% dos indivíduos, cerca de 25-30% dos doentes revelavam-se refractários à terapia. Para além disso, a estes fármacos associavam-se efeitos laterais e interacções farmacológicas bastante relevantes, o que veio a limitar bastante a sua utilização, concretamente em regimes de politerapia (BIALER, 1993; GOA, ROSS e CHRISP, 1993; KÄLVÄINEN, KERÄNEN e RIEKKINEN, 1993; BENETELLO, 1995; GOLDSMITH e BITTENCOURT, 1995; PERUCCA, 1996; WHITE, 1997; McCABE, 2000).

1.4.2. Antiepilépticos de nova geração

Grandes esforços estavam a ser feitos, entretanto, quer na investigação básica quer na clínica, com o objectivo de se melhorar o controlo terapêutico dos doentes epiléticos, nomeadamente dos refractários à terapêutica clássica. E foi na década de 90 que a situação se alterou substancialmente com a introdução no mercado de um número elevado de novos antiepilépticos: felbamato (FBM), gabapentina (GBP), lamotrigina (LTG), levetiracetam (LEV), oxcarbazepina (OXC), tiagabina (TGB), topiramato (TPM), vigabatrina (VGB) e zonisamida (ZNS). Os estudos clínicos realizados em doentes refractários à terapêutica clássica revelaram que, quando se associava um destes novos antiepilépticos ao tratamento clássico previamente estabelecido, se verificava uma redução significativa na frequência das crises (igual ou superior a 50%) em cerca de metade dos doentes em estudo. Surgia assim uma nova oportunidade terapêutica para 12 milhões de pessoas em todo o mundo (BIALER, 1993; LÖSCHER e SCHMIDT, 1994; PERUCCA, 1996; WHITE, 1999; McCABE, 2000; PERUCCA, 2002).

Em contraste com o desenvolvimento empírico da maioria dos antiepilépticos clássicos, os antiepilépticos de nova geração são o resultado de uma abordagem racional baseada nos eventos básicos relacionados com a epilepsia. A compreensão das bases eléctricas e celulares da iniciação e propagação das crises permitiu identificar diversos processos fisiopatológicos, que se converteram em alvos preferenciais dos novos antiepilépticos (BRODIE, 1992; PORTER e ROGAWSKI, 1992; KÄLVÄINEN, KERÄNEN e RIEKKINEN, 1993; LÖSCHER e SCHMIDT, 1994; BENETELLO, 1995; GOLDSMITH e BITTENCOURT, 1995; MELDRUM, 1996a; WHITE, 1999).

Por sua vez, um maior conhecimento acerca dos mecanismos de acção apresentados por estes novos fármacos permitiu a sua utilização, de uma forma mais racional, em

politerapia, combinando modos de acção complementares. Curiosamente, a limitada experiência na utilização destes novos fármacos na prática clínica fez com que o principal critério para a selecção do fármaco mais adequado em cada situação fosse o do principal mecanismo de acção por ele apresentado. A elevada especificidade resultante do desenvolvimento destes novos fármacos trouxe ainda vantagens em termos de uma melhor tolerabilidade e de um potencial de interacções mais reduzido (GOLDSMITH e BITTENCOURT, 1995; KWAN, SILLS e BRODIE, 2001; PERUCCA, 2002).

Contudo, esta nova geração de antiepilépticos ainda não foi capaz de substituir a terapêutica clássica. Na realidade, menos de 10-15% dos doentes refractários conseguem permanecer completamente controlados quando são sujeitos à acção de qualquer um destes novos fármacos. O maior leque de escolha que eles oferecem nem sempre é acompanhado de um conhecimento aprofundado das indicações, contra-indicações e modo de utilização mais adequados, nem tem em conta a variabilidade farmacocinética que lhes está associada, donde resultam muitas vezes tratamentos suboptimizados ou riscos desnecessários no que respeita a efeitos laterais ou interacções medicamentosas (BIALER, 2002; PERUCCA, 2002).

No início do século XXI, a procura de fármacos ainda mais eficazes na abordagem da epilepsia continua a constituir um desafio para a ciência. Estruturas químicas completamente novas ou antiepilépticos estruturalmente modificados são desenhados em busca dos perfis farmacocinético e farmacodinâmico mais adequados, com vista à melhoria da qualidade de vida destes doentes (BIALER, 2002).

1.4.3. Mecanismos de acção dos fármacos antiepilépticos

O maior conhecimento dos eventos básicos da epilepsia que foi alcançado nos últimos anos sugere que o fenómeno epiléptico envolve diversas alterações neurobiológicas, nomeadamente sobre os canais iónicos sensíveis à voltagem (particularmente canais de sódio e de cálcio), a transmissão inibitória (mediada pelo ácido γ -aminobutírico, GABA) e a transmissão excitatória (mediada pelo glutamato, Glu). Podem, por isso, definir-se três grandes categorias em termos de mecanismo de acção dos fármacos antiepilépticos: modulação dos canais iónicos, potenciação da transmissão inibitória e inibição da transmissão excitatória. Deve, no entanto, atender-se ao facto de muitos dos antiepilépticos possuírem múltiplos mecanismos de acção, levando a que a classificação dos diversos fármacos se faça normalmente em função do principal mecanismo de acção que apresentam. A tabela L.3 agrupa os fármacos antiepilépticos mais utilizados na prática clínica, de acordo com o seu principal mecanismo de acção (PORTER e ROGAWSKI, 1992; LÖSCHER e SCHMIDT, 1994; MACDONALD e KELLY, 1994; MELDRUM, 1996a; WHITE, 1997 e 1999; McCABE, 2000; KWAN, SILLS e BRODIE, 2001):

Tabela L.3 Mecanismos de acção dos principais fármacos antiepilépticos.

Mecanismo de acção	Antiepiléptico clássico	Antiepiléptico nova geração
<i>I. Modulação dos canais iónicos sensíveis à voltagem</i>		
a) Bloqueio dos canais de Na ⁺	PHT, CBZ, VPA	LTG, OXC, ZNS, FBM, TPM
b) Bloqueio dos canais de Ca ⁺⁺	ESM, VPA	LTG, ZNS, FBM
<i>II. Potenciação da inibição neuronal mediada pelo GABA</i>		
a) Estimulação da síntese do GABA	VPA	GBP
b) Aumento da libertação do GABA		GBP
c) Agonismo dos receptores do GABA	PB, BZD, VPA	FBM, TPM
d) Inibição da captação do GABA		TGB
e) Bloqueio do metabolismo do GABA	VPA	VGB, GBP
<i>III. Redução da excitação neuronal mediada pelo Glu</i>		
a) Antagonismo dos receptores do Glu		FBM, TPM

2. LAMOTRIGINA

2.1. História da lamotrigina

Desde os inícios dos anos 60 que se procurava relacionar a acção anticonvulsivante com o antagonismo do ácido fólico, com base nas hipóteses de que a acção anticonvulsivante dos fármacos antiepilépticos estaria relacionada com o aparecimento de distúrbios no metabolismo do folato (REYNOLDS, PREECE e CHANARIN, 1969) e de que o folato actuaria como pró-convulsivante (BAXTER, MILLER e WEBSTER, 1973). De facto, já nos anos 50 se reconheceu a existência de distúrbios no metabolismo do folato durante a administração crónica de fármacos antiepilépticos como a primidona, o fenobarbital ou a fenitoína. Além disso, estudos laboratoriais indicavam verificar-se uma acção convulsivante na actuação do folato, quando era administrado em doses elevadas ou quando era injectado directamente no cérebro de animais de laboratório (MILLER *et al.*, 1986a; MACDONALD e KELLY, 1994; GILMAN, 1995).

Inserindo estas observações num esforço de desenvolvimento racional de novos antiepilépticos, a modificação de compostos antagonistas do ácido fólico com efeitos anticonvulsivantes tornou-se num objectivo comum a vários grupos de investigação. Nos anos 70, a Glaxo Wellcome, após modificações racionais numa sequência de feniltriazinas antagonistas do ácido fólico, sintetizou um derivado feniltriazínico caracterizado por uma acção anticonvulsivante poderosa e por uma fraca actividade antifolato. A esse composto foi atribuído o nome de *lamotrigina*. Estudos de estrutura-actividade posteriormente desenvolvidos demonstraram que as propriedades antiepilépticas da lamotrigina não estavam relacionadas com a fraca actividade antifolato

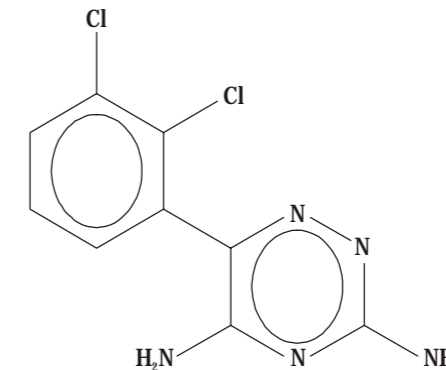
por ela apresentada, mas sim com a estabilização da membrana neuronal pré-sináptica resultante do bloqueio dos canais de sódio sensíveis à voltagem e consequente inibição da libertação de aminoácidos excitatórios, particularmente de glutamato e aspartato (BRODIE, 1992; GOA, ROSS e CHRISP, 1993; MACDONALD e KELLY, 1994).

Esta nova molécula, estruturalmente bastante diferente dos antiépiléticos clássicos, foi respondendo de forma adequada nos ensaios pré-clínicos e clínicos em que foi sendo objecto de estudo até que, ao ser considerada como *um antiépilético de nova geração*, a sua comercialização foi aprovada em Dezembro de 1994, nos Estados Unidos da América, pela *Food and Drug Administration* (GIDAL e GARNETT, 1995). Em Portugal, a Autorização de Introdução no Mercado foi concedida pelo *Instituto da Farmácia e do Medicamento*, no início de 1995, à Glaxo Wellcome (RCM, 1999).

2.2. Descrição do fármaco

2.2.1. Estrutura molecular

Lamotrigina é a denominação genérica da 3,5-diamino-6-(2,3-diclorofenil)-1,2,4-triazina, de fórmula empírica $C_9H_7Cl_2N_5$ e peso molecular 256,096 Da. A sua fórmula estrutural encontra-se representada na Figura I.1.



2.2.2. Propriedades físico-químicas

A lamotrigina apresenta-se sob a forma de um pó quimicamente estável, de cor branca a tender para o creme. É praticamente insolúvel em água (0,17 mg/ml a 25° C); é apenas ligeiramente solúvel no etanol e no ácido clorídrico 0,1 M (4,1 mg/ml a 25° C para ambos); é solúvel na acetona e no metanol aquecido. O coeficiente de partilha óleo/água é de 2,08. É uma base fraca de pKa= 5,7 a 25° C. Na presença de ácidos ou bases fortes é hidrolisada, convertendo-se numa mono ou dihidroxitriazina. Apesar de se revelar estável à temperatura ambiente, a lamotrigina deve ser armazenada em local seco, com temperatura nunca superior a 25° C e ao abrigo da luz (GLAXOWELLCOME, 1998).

Em Portugal, a lamotrigina é comercializada sob o nome de *Lamictal*[®], na forma de comprimidos contendo 25, 50, 100 ou 200 mg de princípio activo ou de comprimidos dispersíveis com 5, 25 ou 100 mg de lamotrigina.

Figura I.1 Fórmula estrutural da lamotrigina.

2.3. Propriedades farmacocinéticas

O perfil cinético de um fármaco antiepiléptico “ideal” deverá incluir determinadas características, a saber: absorção rápida e completa; distribuição fácil e homogénea; ligação pouco extensa e não-saturável às proteínas plasmáticas; cinética de eliminação linear; semivida de eliminação de cerca de 24 horas, por forma a permitir uma única toma diária; não ocorrência do fenómeno de auto-indução no processo de biotransformação enzimática; inexistência de metabolitos activos ou tóxicos; ausência de interacções farmacocinéticas com outros fármacos.

A lamotrigina – um antiepiléptico de nova geração – parece assumir algumas das características referidas (COHEN *et al.*, 1987; BOURGEOIS, 1995).

2.3.1. No ser humano

Absorção

A lamotrigina é absorvida rápida e completamente após administração oral. O efeito de primeira passagem é irrelevante, estimando-se em cerca de 98% a sua biodisponibilidade absoluta. A presença de alimentos não afecta a absorção. O pico da concentração sérica é atingido 1 a 3 horas após a toma do fármaco. A presença de um segundo pico, 4 a 6 horas após a administração oral da lamotrigina, sugere a existência de recirculação entero-hepática. Existe uma relação de linearidade entre a dose administrada e o pico sérico, assim como entre a dose e a área sob a curva estimada, para uma dose única oral entre 30 e 450 mg. Esta proporcionalidade também se estende

a indivíduos com doses não superiores a 700 mg/dia (COHEN *et al.*, 1987; PECK, 1991; GOA, ROSS e CHRISP, 1993; FITTON e GOA, 1995; GILMAN, 1995).

Distribuição

O grau de ligação da lamotrigina às proteínas plasmáticas estima-se em cerca de 55%, quer se faça a determinação *in vitro*, por diálise de equilíbrio, quer se efectue *in vivo*, a partir da razão de concentrações saliva/plasma. Esta percentagem não é perturbada pela presença de concentrações terapêuticas de outros antiepilépticos, como a fenitoína, o fenobarbital ou o ácido valpróico. Por sua vez, a lamotrigina também não afecta a ligação às proteínas plasmáticas por parte desses fármacos. Deste modo, a hipótese de alterações nas concentrações plasmáticas destes antiepilépticos, causadas por alteração da ligação às proteínas, quando os antiepilépticos são usados em co-medicação, fica excluída (COHEN *et al.*, 1987; PARSONS, DICKINS e MORLEY, 1995).

A lamotrigina distribui-se bem por todo o organismo. O volume de distribuição aparente da lamotrigina varia entre 0,9 e 1,3 L/kg, independentemente da dose administrada, do regime de dosagem aplicado e do facto de o indivíduo se apresentar são ou doente (GOA, ROSS e CHRISP, 1993; GILMAN, 1995).

A lamotrigina atravessa a placenta e está presente no leite materno em quantidades que não devem ser negligenciadas, pelo que o feto ou o lactente deve ser cuidadosamente observado de modo a evitar potenciais efeitos adversos (RAMBECK *et al.*, 1997).

Eliminação

A eliminação da lamotrigina segue uma cinética linear de primeira ordem (COHEN *et al.*, 1987; RAMBECK e WOLF, 1993; GILMAN, 1995; ELWES e BINNIE, 1996). O tempo de semivida de eliminação da lamotrigina, quando esta é administrada em dose única oral em voluntários sãos, é de cerca de 24 horas (COHEN *et al.*, 1987). A *clearance* ou depuração total, em condições idênticas, assume valores na ordem dos 0,021-0,035 L/h/kg (COHEN *et al.*, 1987; GOA, ROSS e CHRISP, 1993; GILMAN, 1995).

a) Metabolismo

A lamotrigina é uma base fraca, que, no átomo *N*-2 do seu anel triazínico, é extensivamente atacada pelas uridina-5'-difosfato-glucuroniltransferases. Consequentemente, o seu principal metabolito é o conjugado glucurónico *N*-2, que corresponde a cerca de 70% da dose administrada. O perfil de eliminação deste conjugado é paralelo ao da lamotrigina, pelo que se postula que a velocidade de formação deste metabolito é determinante para a velocidade de depuração do fármaco. A lamotrigina é também transformada, embora em menor extensão (cerca de 10% da dose administrada), no conjugado glucurónico *N*-5. Forma-se ainda o conjugado metílico *N*-2, mas em quantidades muito pequenas (< 1% da dose administrada). Qualquer destes metabolitos revela-se inactivo. Cerca de 10% da dose administrada de lamotrigina é excretada na urina sob forma inalterada (COHEN *et al.*, 1987; DICKINS *et al.*, 1995).

Parece ocorrer uma pequena indução da lamotrigina em relação ao seu próprio metabolismo. Embora alguns autores não reconheçam a existência dessa auto-indução (COHEN *et al.*, 1987; BIALER, 1993), outros há que referem uma redução na semivida da

lamotrigina no início do tratamento, enquanto as suas concentrações séricas não atingem o estado de equilíbrio; por se manifestar apenas no início do tratamento, tal fenómeno não assume, contudo, relevância clínica (RAMBECK e WOLF, 1993; DICKINS *et al.*, 1995; GILMAN, 1995; ELWES e BINNIE, 1996; HACHAD, RAGUENEAU-MAJLESSI e LEVY, 2002).

b) Excreção

A excreção urinária constitui a principal via de eliminação da lamotrigina: cerca de 90% de uma dose única oral é recuperada na urina. A detecção de uma pequena percentagem de lamotrigina nas fezes – cerca de 2% da dose administrada – sugere a ocorrência de excreção biliar, ainda que em quantidades insignificantes (PARSONS, DICKINS e MORLEY, 1995).

2.3.2. No rato

Durante o desenvolvimento da lamotrigina – e à semelhança do que acontece com todos os compostos que potencialmente irão integrar o arsenal terapêutico de determinada patologia – realizaram-se diversos estudos pré-clínicos. A cinética do fármaco, com a caracterização dos parâmetros farmacocinéticos essenciais, foi estudada em diversas espécies de animais de laboratório, ajudando à interpretação de diversos testes farmacológicos e toxicológicos (PARSONS, DICKINS e MORLEY, 1995).

Descrevem-se, em seguida, as principais características dos fenómenos de absorção, distribuição e eliminação da lamotrigina no rato:

Absorção

A lamotrigina apresenta uma boa biodisponibilidade oral. O pico da concentração plasmática é atingido 3 a 5 horas após a administração do fármaco. Existe uma relação de linearidade entre a dose administrada e a concentração plasmática máxima atingida, assim como entre a dose e a área sob a curva calculada, no intervalo de doses compreendido entre 2,5 e 10 mg/kg. Com o aumento da dose de lamotrigina administrada observa-se, no rato, um aumento da extensão da fase de absorção. Este efeito, que consiste num retardamento do esvaziamento gástrico, desencadeia-se por um mecanismo ainda desconhecido mas que se sabe ser específico das espécies roedoras (PARSONS, DICKINS e MORLEY, 1995; YAMASHITA *et al.*, 1997).

Distribuição

O grau de ligação da lamotrigina às proteínas plasmáticas é semelhante ao que se verifica no ser humano, estimando-se o seu valor em 54% (PARSONS, DICKINS e MORLEY, 1995; WALKER *et al.*, 2000).

A lamotrigina distribui-se facilmente por todos os órgãos e tecidos do organismo, atendendo às suas características básicas e lipófilas. A velocidade de eliminação da lamotrigina desses tecidos é comparável à velocidade de eliminação do plasma, com excepção do rim e dos tecidos que contêm melanina. No rato, o volume de distribuição aparente da lamotrigina varia entre 1,5 e 2,1 L/kg (PARSONS, DICKINS e MORLEY, 1995).

Estudos de distribuição no rato macho revelam uma grande afinidade da lamotrigina com os rins, onde aquela se acumula após administração em dose múltipla. Esta acumulação

renal apresenta-se dependente da dose. Estudos com diferentes espécies animais permitem concluir que tal acumulação é específica da espécie e do sexo, isto é, que se verifica única e exclusivamente no rato macho adulto, não sendo por isso relevante para os seres humanos (PARSONS, DICKINS e MORLEY, 1995; WALKER *et al.*, 2000). Admite-se que a lamotrigina provoca no rato macho uma redução da proteólise da α -2U-globulina, que é uma proteína transportadora específica para ligandos lipofílicos que se acumula nos lisossomas secundários das células dos túbulos proximais renais: ou porque, ligando-se à proteína, a torna mais resistente à hidrólise; e/ou porque, acumulando-se nos lisossomas, tem um efeito inibidor directo da função lisossomal. Esta situação só se verifica no rato macho adulto em consequência de um conjunto de três factores: porque um rato macho adulto produz, no fígado, sob um controlo sinérgico da testosterona e dos corticosteróides endógenos, grandes quantidades de α -2U-globulina, que é uma proteína de baixo peso molecular que, sendo facilmente filtrada a nível glomerular; é também facilmente reabsorvida para os túbulos proximais renais; porque a α -2U-globulina é bastante resistente à proteólise; porque, sob efeito dos androgéneos, o rato macho apresenta uma baixa actividade proteolítica nos seus lisossomas. Esta conjugação de factores leva a que a acumulação renal de lamotrigina não ocorra noutras espécies, nomeadamente no ser humano (READ *et al.*, 1988; READ, 1991).

No rato, a lamotrigina também revela uma afinidade particular com a melanina do olho e, em menor extensão, com a da pele pigmentada. Este tipo de afinidade – com os tecidos que contêm melanina – não tem, no entanto, relevância clínica (PARSONS, DICKINS e MORLEY, 1995).

À semelhança do que acontece no ser humano, também no rato a lamotrigina atravessa a placenta e está presente, embora em quantidades muito pequenas (< 1%), no leite materno (PARSONS, DICKINS e MORLEY, 1995).

Eliminação

A cinética de disposição da lamotrigina revela-se linear entre 2,5 e 10 mg/kg. O tempo de semivida de eliminação da lamotrigina, após uma dose oral de 4 mg/kg, assume um valor médio de 12,5 horas no rato macho e de 22 horas no rato fêmea, em consequência da acumulação renal que se observa no rato macho, como descrito anteriormente. A *clearance* ou depuração total respectiva assume um valor médio de 0,097 L/h/kg no rato macho e de 0,054 L/h/kg no rato fêmea (PARSONS, DICKINS e MORLEY, 1995). Yamashita *et al.* (1997) referem um tempo de semivida de eliminação de cerca de 25 horas, quando a lamotrigina é administrada oralmente na dose de 10 mg/kg, valor esse que se assemelha ao referenciado para voluntários sãos após uma toma oral de lamotrigina na dose de 120 mg (COHEN *et al.*, 1987; PARSONS, DICKINS e MORLEY, 1995).

a) Metabolismo

As vias e a extensão do metabolismo da lamotrigina no rato diferem das que ocorrem no ser humano. Após administração oral, verifica-se o seguinte: cerca de 30% da dose administrada encontra-se na urina sob forma inalterada; o conjugado glucurónico *N*-2 que surge na urina corresponde a cerca de 6% da dose administrada de lamotrigina; o conjugado glucurónico *N*-5 não atinge, na urina, mais de 5% da dose administrada; o conjugado óxido *N*-2 nem sempre se detecta; o conjugado metílico *N*-2 não se forma em quantidades apreciáveis. No entanto, aparecem na urina alguns metabolitos não identificados que, no seu conjunto, correspondem a cerca de 20% do total de fármaco administrado (DICKINS *et al.*, 1995).

b) Excreção

A excreção urinária constitui, também no rato, a principal via de eliminação da lamotrigina: cerca de 60% da dose de lamotrigina administrada por via oral é recuperada na urina. Por sua vez, a detecção de lamotrigina nas fezes assume, no rato, valores da ordem dos 30%, o que parece dever-se, em parte, à excreção biliar do fármaco (PARSONS, DICKINS e MORLEY, 1995).

2.4. Propriedades farmacodinâmicas

2.4.1. Mecanismo de acção

Os primeiros estudos que incidiram sobre o mecanismo de acção da lamotrigina basearam-se na semelhança entre o perfil anticonvulsivante da lamotrigina e os perfis apresentados pela fenitoína e pela carbamazepina em estudos farmacológicos realizados em animais. Sabendo-se que a acção terapêutica da fenitoína se relacionava com a estabilização neuronal resultante de uma modulação da libertação de neurotransmissores ao nível pré-sináptico, começou por se estudar o efeito da lamotrigina na modulação pré-sináptica da libertação de aminoácidos endógenos. Os resultados obtidos sugerem que o seu mecanismo de acção envolve o bloqueio dos canais de sódio sensíveis à voltagem com a consequente estabilização das membranas pré-sinápticas e inibição da libertação de neurotransmissores, particularmente de glutamato, o aminoácido excitatório com papel mais determinante no desencadeamento da crise epiléptica (LEACH, MARDEN e MILLER, 1986; LEACH, BAXTER e CRITCHLEY, 1991; TEOH, FOWLER e BOWERY, 1995).

Durante vários anos, este foi considerado o mecanismo de acção mais provável da lamotrigina, semelhante aos mecanismos apresentados pela fenitoína e pela carbamazepina (GOA, ROSS e CHRISP, 1993; LANG, WANG e COOPER, 1993; MACDONALD e KELLY, 1994; FITTON e GOA, 1995; MESSENHEIMER, 1995; CALABRESI *et al.*, 1996; ZONA e AVOLI, 1997).

A continuação dos estudos possibilitou a Xie *et al.* (1995) sugerir a existência de uma interacção preferencial da lamotrigina com os canais de sódio, quando estes se encontram no estado de inactivação lenta. Deste modo, conseguia diferenciar-se os mecanismos de acção da lamotrigina e da fenitoína, sendo que esta parece interagir preferencialmente com os canais de sódio no estado de inactivação rápida (MELDRUM, 1996a). No entanto, Kuo e Lu (1997) vieram pôr em causa esta hipótese, apresentando resultados diferentes que evidenciam que a acção da lamotrigina não resulta de uma ligação selectiva da molécula aos canais de sódio, quando estes se encontram no estado de inactivação lenta, mas sim de uma cinética lenta de ligação da molécula de lamotrigina aos canais de sódio, quando estes se encontram no estado de inactivação rápida, à semelhança do que acontece com a fenitoína.

Entretanto, o próprio mecanismo de acção, na sua essência, começou a ser posto em causa. Estudos de Waldmeier *et al.* (1995), em condições experimentais mais semelhantes às condições fisiológicas do que os estudos de estimulação através da veratrina, demonstraram que a acção de inibição da lamotrigina se faz sentir não só em relação ao Glu (transmissão excitatória) mas também em relação ao GABA (transmissão inibitória) (LEACH, MARDEN e MILLER, 1986; LEACH, BAXTER e CRITCHLEY, 1991; TEOH, FOWLER e BOWERY, 1995). Foi, então, sugerida, como mais plausível, a hipótese de que a acção anticonvulsivante da lamotrigina se deve ao bloqueio dos canais de sódio, e não à inibição da libertação de glutamato dependente desse bloqueio (WALDMEIER *et al.*, 1995).

Estudos mais recentes de Cunningham e Jones (2000) demonstraram, por sua vez, que nem o bloqueio dos canais de sódio nem o bloqueio dos canais de cálcio constitui um pré-requisito para a inibição da libertação de glutamato. Estes autores revelaram ainda, em contraste com os estudos anteriormente referidos, a existência de efeitos opostos da lamotrigina na libertação dos neurotransmissores – inibição da libertação de Glu e aumento da libertação de GABA –, que se afiguram independentes de qualquer efeito nos canais de sódio. Segundo este estudo, a acção anticonvulsivante da lamotrigina, semelhante à da fenitoína, deve-se à combinação destes dois efeitos, conduzindo a uma redução significativa da excitabilidade neuronal e, conseqüentemente, à protecção contra crises parciais e generalizadas.

Quando os espectros de actividade anticonvulsivante da lamotrigina e dos antiépiléticos clássicos fenitoína e carbamazepina se começaram a diferenciar na prática clínica – a lamotrigina é eficaz em alguns casos de epilepsia focal em adultos e em certas epilepsias generalizadas, como as de ausência, em crianças, em situações refractárias à fenitoína e à carbamazepina (MELDRUM, 1996a) –, surgiu a necessidade de tentar explicar a acção terapêutica do fármaco através de outros mecanismos de acção que não apenas o do bloqueio dos canais de sódio sensíveis à voltagem. A este propósito, Lees e Leach (1993) realizaram estudos em culturas neuronais de córtex de rato, chegando à conclusão de que a inibição de correntes de cálcio através de interacções da lamotrigina com canais de cálcio é um outro mecanismo de acção apresentado pela lamotrigina. Mais tarde, foi defendida a existência de uma interacção preferencial da lamotrigina com os canais de cálcio sensíveis à voltagem do tipo N, P e L, canais estes que são responsáveis pelas correntes de cálcio que, nos terminais pré-sinápticos, desencadeiam a libertação de neurotransmissores (CALABRESI *et al.*, 1996; MELDRUM, 1996b; STEFANI *et al.*, 1996; WANG *et al.*, 1996; STEFANI, SPADONI e BERNARDI, 1997a; GRUNZE *et al.*, 1998).

A continuação dos estudos em neurónios isolados de córtex de rato permitiu chegar à conclusão de que a inibição das correntes de cálcio activadas por voltagens elevadas constitui o principal mecanismo de acção da lamotrigina, quando esta é administrada em concentrações baixas. Paralelamente, revelou ser necessária uma concentração bastante mais elevada do fármaco para que a inibição das correntes de sódio ocorresse de um modo significativo. Estes resultados aproximaram a lamotrigina da carbamazepina, ao mesmo tempo que a afastaram da fenitoína, dado que, ao contrário do que acontece com a carbamazepina, o impacto da fenitoína nas correntes de cálcio é insignificante, quando esta é administrada em doses terapêuticas (STEFANI, SPADONI e BERNARDI, 1997b). O antagonismo exercido ao nível dos canais de cálcio pode também explicar, em parte, a acção terapêutica da lamotrigina na estabilização do humor e no tratamento da depressão associada a desordens afectivas bipolares (STEFANI, SPADONI e BERNARDI, 1997b; VON WEGERER *et al.*, 1997; GRUNZE *et al.*, 1998; LANGOSCH *et al.*, 2000).

Atendendo a que muitos dos antiepilépticos que actuam nos canais iónicos não exercem apenas um tipo de bloqueio específico – de que é exemplo a carbamazepina, que revela acções nos canais de sódio, cálcio e potássio –, procurou-se também averiguar uma eventual acção da lamotrigina nas correntes de potássio. Os resultados obtidos por Grunze *et al.* (1998) e, mais recentemente, por Zona *et al.* (2002) sugerem que a lamotrigina, para além da modulação das correntes de sódio e de cálcio, modula de uma forma positiva as correntes de potássio.

Os trabalhos de investigação levados a cabo sobre a acção da lamotrigina no antagonismo dos receptores ionotrópicos do glutamato não revelou a existência de uma qualquer interacção capaz de justificar a sua acção anticonvulsivante, à semelhança do que se passa com a carbamazepina e a fenitoína em concentrações terapêuticas

(MESSENHEIMER, 1995; CALABRESI *et al.*, 1996; PHILLIPS *et al.*, 1997; GRUNZE *et al.*, 1998; CUNNINGHAM e JONES, 2000; LANGOSCH *et al.*, 2000). Contudo, este mecanismo poderá ter alguma influência na eficácia anticonvulsivante da fenitoína no tratamento do estado de mal epiléptico, situação em que este fármaco é utilizado em doses mais elevadas (PHILLIPS *et al.*, 1997).

2.4.2. Avaliação experimental da resposta farmacológica da lamotrigina

A avaliação pré-clínica de fármacos antiepilépticos requer a utilização de modelos animais que sejam preditivos da actividade anticonvulsivante dessas substâncias em relação aos diversos tipos de crise (LÖSCHER e SCHMIDT, 1988). Embora a relação entre os dados obtidos em animais e os que ocorrem nos seres humanos não seja clara, os estudos em animais fornecem pistas para as eventuais aplicações clínicas desses fármacos (GOA, ROSS e CHRISP, 1993). De facto, ao observar-se os perfis clínicos de diversos antiepilépticos clássicos e a actividade que esses fármacos apresentam em determinados modelos animais, é possível estabelecer correlações que, consideradas no seu conjunto, permitem prever as aplicações clínicas mais prováveis dos novos antiepilépticos (MILLER *et al.*, 1986b).

Um modelo experimental de epilepsia, para ser ideal, deve apresentar as seguintes características: ser capaz de desenvolver crises espontâneas recorrentes; apresentar crises semelhantes às que ocorrem na epilepsia humana, quer nas suas manifestações clínicas quer nas alterações electroencefalográficas que lhes estão associadas; apresentar uma frequência de crises elevada, que permita a realização de estudos agudos e/ou crónicos para avaliação da eficácia; possibilitar uma cinética (particularmente na fase de eliminação) dos antiepilépticos semelhante à que ocorre nos seres humanos, de modo a

que os níveis efectivos do fármaco sejam mantidos durante o tratamento crónico; permitir níveis plasmáticos e cerebrais de fármaco semelhantes aos requeridos para o controlo das respectivas crises nos seres humanos (LÖSCHER e SCHMIDT, 1988 e 1994).

Ora, nenhum modelo, até ao presente, conseguiu preencher todos estes requisitos. Os que mais se aproximam do modelo ideal são os chamados “modelos animais genéticos de epilepsia”. Estes modelos podem ser de dois tipos: num primeiro grupo, englobam-se as espécies ou estirpes animais que apresentam epilepsia inata, semelhante à epilepsia idiopática dos seres humanos; num segundo grupo, incorporam-se os animais com epilepsia reflexa, isto é, animais geneticamente predispostos a um determinado tipo de crise facilmente desencadeado por um estímulo sensorial específico. No entanto, também estes modelos apresentam desvantagens, para além de dificuldades logísticas de aquisição. Assim, no primeiro grupo, a frequência das crises espontâneas é demasiado baixa e irregular, enquanto que os modelos do segundo grupo apresentam crises que não se assemelham às dos humanos no que respeita ao seu modo de desencadeamento (apenas 5% do total das epilepsias correspondem às epilepsias que ocorrem nos seres humanos). Por estas razões, e porque o valor preditivo destes modelos na avaliação da eficácia de fármacos antiepilépticos ainda não é claro, a grande utilidade dos modelos genéticos surge apenas no âmbito de estudos acerca dos mecanismos básicos e fundamentais da epilepsia (LÖSCHER e SCHMIDT, 1988; NOEBELS *et al.*, 1997).

A investigação experimental relacionada com fármacos antiepilépticos faz-se, desde os primórdios, em ratos e murganhos com crises convulsivas agudas induzidas através de meios eléctricos ou químicos. Estes modelos, sendo embora úteis na identificação de fármacos com acção anticonvulsivante, não se relacionam directamente com a epilepsia humana em toda a sua complexidade, devendo ser considerados apenas como modelos de

indução de crises convulsivas isoladas e não como modelos experimentais de epilepsia. Na realidade, a falta de uma patologia prévia, a ausência de alterações anatómicas e fisiológicas duradouras e a presença de um foco bem definido afastam estes modelos agudos da verdadeira condição da epilepsia humana. Pelo facto de cada modelo compreender apenas uma parte do complexo fenómeno que é a epilepsia, a potência anticonvulsivante de um dado fármaco não deve ser avaliada através de um teste único, mas antes através de um conjunto diversificado de testes, de modo a evitar a obtenção de falsos positivos ou de falsos negativos. Apesar de todas estas limitações, os modelos de indução de crises convulsivas isoladas asseguram quer a adopção dos critérios de selecção referidos anteriormente para um modelo ideal quer a facilidade de aquisição dos animais e a execução dos testes, permitindo assim a avaliação de fármacos em larga escala, de forma padronizada e consistente (LÖSCHER e SCHMIDT, 1988; MODY e SCHWARTZKROIN, 1997).

O perfil anticonvulsivante da lamotrigina tem sido aprofundado em várias espécies animais através da utilização de diversos testes de avaliação de fármacos antiepilépticos. Os resultados obtidos com este antiepiléptico de nova geração têm vindo a ser comparados, mediante o recurso aos mesmos testes, com os resultados obtidos com os antiepilépticos clássicos. Atendendo ao facto de que o primeiro mecanismo de acção identificado e devidamente estudado da lamotrigina se assemelha aos mecanismos de acção da fenitoína e da carbamazepina – bloqueio dos canais de sódio sensíveis à voltagem, com estabilização da membrana pré-sináptica e a consequente inibição da libertação de neurotransmissores excitatórios, como o glutamato e o aspartato –, compreende-se que tenha vindo a ser dada particular ênfase à comparação da acção anticonvulsivante da lamotrigina com a acção apresentada por estes dois antiepilépticos clássicos. Descrevem-se, em seguida, os resultados obtidos nalguns testes utilizados na avaliação experimental da resposta farmacológica da lamotrigina:

Teste do electrochoque máximo

A lamotrigina revela-se eficaz na abolição das crises tónicas induzidas no teste do electrochoque máximo: após a administração da lamotrigina, os animais (ratos e murganhos) não manifestam a extensão tónica dos membros posteriores quando lhes é aplicado um determinado choque eléctrico. Esta capacidade da lamotrigina de protecção dos animais depende da dose administrada e sugere a existência da eficácia clínica deste fármaco no tratamento de crises convulsivas primariamente generalizadas (MILLER *et al.*, 1986b; DALBY e NIELSEN, 1997).

Estudos realizados por Miller *et al.* (1986b) revelam que a lamotrigina, após administração oral, é eficaz dentro de 15 minutos, atingindo o pico da potência anticonvulsivante 1 hora após a sua administração. Os mesmos estudos revelam também que esse nível de potência se mantém durante pelo menos 8 horas após a toma e que a acção anticonvulsivante ainda se faz sentir de um modo significativo 24 horas após a administração do fármaco, o que sugere uma duração de acção longa.

A potência anticonvulsivante da lamotrigina é avaliada através da determinação da dose capaz de suprimir as crises tónicas em 50% dos animais (ED_{50} – *median effective dose*). Os valores encontrados por diversos autores são apresentados na tabela I.4.

Entre os antiepilépticos avaliados por Miller *et al.* (1986a e 1986b), a lamotrigina revela-se como sendo o mais potente, quer no rato quer no murganho. No entanto, a potência máxima deste fármaco, embora a tempos diferentes, é bastante semelhante à da fenitoína no murganho e à da carbamazepina no rato. A duração da sua acção também se revela superior à dos antiepilépticos clássicos.

Tabela I.4 Potência anticonvulsivante (ED_{50}) da lamotrigina em ratos e murganhos.

Autores	Condições experimentais	ED_{50} (mg/kg)	
		ratos	murganhos
Miller <i>et al.</i> (1986 a e b)	1 h após administração oral	1,9	2,6
	2 h após administração subcutânea	2,4	-
	2 h após administração intraperitoneal	3,6	-
	1 h após administração endovenosa	3,0	-
Rataud <i>et al.</i> (1994)	30 min após administração intraperitoneal	3,1	4,4
Dalby e Nielsen (1997)	2 h após administração intraperitoneal	-	9,2

Teste do pentilenotetrazol

No teste do pentilenotetrazol administrado por infusão endovenosa, a lamotrigina revela-se incapaz, qualquer que seja a dose utilizada, de prolongar o tempo de latência para o início do clónus. Além do mais, em doses elevadas reduz, de um modo significativo, a latência do clónus, o que sugere a existência de uma acção pró-convulsivante (MILLER *et al.*, 1986a). O teste do pentilenotetrazol administrado por via subcutânea em dose baixa também revela a incapacidade da lamotrigina para aumentar o tempo de latência do clónus. Estes resultados são sugestivos da ineficácia clínica da lamotrigina no tratamento de crises mioclónicas (DALBY e NIELSEN, 1997).

Em relação às crises tónicas, a lamotrigina protege os animais da extensão tónica dos membros posteriores induzida pelo prolongamento da infusão do pentilenotetrazol ou pela sua administração subcutânea em dose mais elevada. Essa protecção revela-se dependente da dose e sugere, tal como no teste do electrochoque máximo, a eficácia clínica da lamotrigina no tratamento de crises convulsivas primariamente generalizadas (MILLER *et al.*, 1986b; DALBY e NIELSEN, 1997). O valor de ED_{50} determinado por

Miller *et al.* (1986b) em murganhos 2 horas após a administração oral da lamotrigina é de 7,2 mg/kg. O valor encontrado por Dalby e Nielsen (1997) 2 horas após a administração intraperitoneal da lamotrigina é de 43 $\mu\text{mol/kg}$ (11,0 mg/kg). Este estudo revela também que a lamotrigina, para além de inibir a ocorrência de convulsões tónicas, aumenta o tempo de latência para a ocorrência desse tipo de convulsões.

Quando comparada com a fenitoína e a carbamazepina, a lamotrigina revela um comportamento similar, quer na abolição das crises tónicas (potência semelhante) quer na incapacidade de prolongamento da latência do clónus. A fenitoína, tal como a lamotrigina, apresenta uma acção pró-convulsivante, quando administrada em doses elevadas. Em relação aos outros anti-epilépticos, a lamotrigina revela-se menos potente do que o diazepam na abolição das crises tónicas (MILLER *et al.*, 1986b).

Modelo do “kindling”⁽¹⁾

O modelo do *kindling*, assim designado e caracterizado detalhadamente no final da década de 60 (GODDARD, MCINTYRE e LEECH, 1969), consiste na aplicação repetida de um estímulo eléctrico, inicialmente subconvulsivo, numa determinada região cerebral (normalmente a amígdala), de modo a desencadear, por epileptogénese, uma disfunção cerebral crónica que resulta em intensas crises convulsivas parciais e secundariamente generalizadas.

⁽¹⁾ Usa-se o termo “kindling” em língua inglesa por não existir na língua portuguesa um termo que seja usado consensualmente pela comunidade científica para designar a realidade em causa, ou seja, este modelo experimental de estimulação eléctrica repetitiva.

Neste modelo, a lamotrigina não actua nem por bloqueio nem por redução da velocidade de desenvolvimento do processo (O’DONNELL e MILLER, 1991). Estudos recentes demonstram que, em dose baixa (5 mg/kg), a lamotrigina não tem qualquer efeito no desenvolvimento inicial do processo, e que, em dose mais elevada (15 mg/kg), chega a favorecer esse desenvolvimento, suscitando crises mais longas e de maior intensidade (POSTMA *et al.*, 2000).

A eficácia da lamotrigina revela-se, no entanto, no final do processo. Vários estudos demonstram a capacidade do fármaco de proteger os animais da estimulação, aumentando, de uma forma dependente da dose, o número de respostas nulas, ou seja, o número de animais que não responde a este processo de estimulação, nem sob o aspecto comportamental nem do ponto de vista electroencefalográfico. A actuação da lamotrigina faz-se ainda sentir não só na diminuição do número de respostas positivas ao teste como também na redução da sua duração (MILLER *et al.*, 1986a; O’DONNELL e MILLER, 1991). Diversos estudos demonstram a eficácia da lamotrigina na prevenção das crises com origem em estruturas do sistema límbico, efeito esse com duração superior a 24 horas após a administração intraperitoneal do fármaco (DALBY e NIELSEN, 1997; OTSUKI *et al.*, 1998; EBERT, REISSMÜLLER e LÖSCHER, 2000). Contudo, se o animal em estudo tiver sido exposto à lamotrigina durante o desenvolvimento do processo, os efeitos produzidos no final serão marcadamente menores (POSTMA *et al.*, 2000). Todos estes resultados sugerem o valor clínico da lamotrigina na abordagem da epilepsia caracterizada por crises parciais com ou sem generalização secundária (O’DONNELL e MILLER, 1991; EBERT, REISSMÜLLER e LÖSCHER, 2000).

A análise comparativa da eficácia da lamotrigina, no final do processo de estimulação, com a da fenitoína e a da carbamazepina revela a existência de uma maior semelhança com a carbamazepina em termos de acção e potência do que com a fenitoína, manifestando-se esta menos eficaz. No entanto, quer a carbamazepina quer a fenitoína apresentam reacções adversas significativas nas doses anticonvulsivantes efectivas para este modelo. O ácido valpróico apresenta uma potência semelhante à da lamotrigina (OTSUKI *et al.*, 1998). No que respeita à eficácia avaliada durante o desenvolvimento do processo, os diferentes fármacos comportam-se de maneiras diversas. Assim, enquanto que a lamotrigina, em dose baixa, não tem qualquer efeito no desenvolvimento inicial do processo e, em dose mais elevada, apresenta um efeito pró-convulsivante, já a carbamazepina, que é bastante eficaz no final do processo, não tem qualquer efeito durante o seu desenvolvimento. A fenitoína, por seu lado, não tendo grande eficácia no final do processo, parece ser capaz de prevenir as crises espontâneas que ocorrem após longo tempo de estimulação, apesar das grandes diferenças interindividuais detectadas. O ácido valpróico revela grande eficácia em qualquer dos níveis do processo (POSTMA *et al.*, 2000).

Teste das descargas consecutivas

a) Descargas consecutivas suscitadas por estimulação eléctrica focal

A lamotrigina é capaz de reduzir, de uma forma dependente da dose, a duração das descargas consecutivas suscitadas por estimulação eléctrica focal. Este resultado sugere a eficácia da lamotrigina em crises parciais simples e complexas. Quando comparada com a fenitoína, a lamotrigina revela-se duas vezes mais potente em estudos efectuados no cão, a única espécie na qual a fenitoína se revela eficaz (WHEATLEY e MILLER, 1989).

b) Descargas consecutivas suscitadas por estimulação eléctrica visual

A lamotrigina é capaz de inibir, de uma forma dependente da dose, as descargas consecutivas suscitadas por estimulação visual. Este resultado sugere a eficácia da lamotrigina em crises de ausência. A fenitoína e a carbamazepina revelam-se ineficazes neste teste (LAMB e MILLER, 1985).

Modelo do estado de mal epiléptico

A lamotrigina revela-se ineficaz no modelo de crises convulsivas secundariamente generalizadas do estado de mal epiléptico induzido por aplicação directa de cobalto na região cortical. De modo contrário, a fenitoína, no mesmo modelo, revela-se capaz de controlar as crises e de prevenir o seu início, quando é administrada antes da aplicação do estímulo (WALTON *et al.*, 1996).

Modelos genéticos

a) Teste da estimulação auditiva em ratos e murganhos com predisposição genética

A lamotrigina é capaz de prevenir as crises tónico-clónicas induzidas por estímulo auditivo em ratos geneticamente predispostos a esse tipo de estimulação. Neste modelo, a resposta positiva da lamotrigina, que é em grande medida sobreponível à do teste do electrochoque máximo, sugere a existência de eficácia clínica no tratamento de crises primariamente generalizadas. Quando comparada com a fenitoína, a lamotrigina revela a maior potência (LÖSCHER e SCHMIDT, 1988; SMITH, S.E. *et al.*, 1993).

A lamotrigina é, igualmente, capaz de antagonizar as crises tónico-clónicas induzidas por estímulo auditivo em murganhos da estirpe mutante DBA/2 de um modo dependente da dose. Contudo, este modelo não se revela particularmente sensível a qualquer classe de fármacos antiepilépticos, visto que todos os que são usados na prática clínica são eficazes na protecção destes animais contra as crises clónicas induzidas por estímulo auditivo (LÖSCHER e SCHMIDT, 1988; SARRO *et al.*, 1996; DALBY e NIELSEN, 1997).

b) Murganho mutante letárgico

A lamotrigina reduz significativamente a frequência das crises no murganho mutante letárgico, o qual é considerado como um modelo preditivo de crises de ausência no ser humano. Contrariamente, quer a fenitoína quer a carbamazepina revelam a sua ineficácia neste modelo e chegam mesmo a apresentar-se, em determinadas ocasiões, como facilitadoras do desenvolvimento das crises (HOSFORD e WANG, 1997; WHITE, 1999).

c) Murganho mutante EL

A lamotrigina exerce um efeito anticonvulsivante no murganho da estirpe mutante EL, o qual é considerado um modelo preditivo de crises parciais complexas com generalização secundária no ser humano. Do mesmo modo, também as crises suscitadas por estimulação vestibular, exibidas por este murganho mutante, podem ser inibidas por fármacos como a fenitoína e o fenobarbital (LÖSCHER e SCHMIDT, 1988; DALBY e NIELSEN, 1997).

2.5. Margem terapêutica

A eficácia terapêutica dos antiepilépticos clássicos depende fundamentalmente da capacidade de serem alcançadas concentrações séricas situadas dentro de margens terapêuticas preestabelecidas (GOA, ROSS e CHRISP, 1993). De facto, quer os efeitos terapêuticos quer os efeitos tóxicos deste grupo de fármacos relacionam-se melhor com as concentrações séricas do que com a dose administrada, o que resulta da circunstância de se associar a estes fármacos uma grande variabilidade farmacocinética, a qual é dependente de factores como o regime de dosagem, o estado da doença subjacente, a idade, o peso corporal ou a terapêutica concomitante (MACKICHAN, FERRENDELLI e WILDER, 1988).

Neste contexto, também os ensaios farmacológicos, farmacocinéticos e clínicos que se realizaram durante o desenvolvimento da lamotrigina procuraram identificar níveis séricos deste novo antiepiléptico correspondentes a respostas terapêuticas eficazes. Por comparação com as concentrações plasmáticas eficazes da fenitoína em modelos animais (que são semelhantes às concentrações terapêuticas atingidas nos humanos), foi inicialmente sugerida para a lamotrigina uma margem terapêutica situada entre 1-1,5 e 3 mg/L (PARSONS e MILES, 1984; COHEN *et al.*, 1985). Por sua vez, os primeiros ensaios clínicos realizados apontaram para níveis séricos de lamotrigina entre 1 e 3 ou 1 e 4 mg/L (BINNIE *et al.*, 1986; JAWAD *et al.*, 1986). Contudo, em ensaios posteriores não se conseguiu reencontrar a relação entre estes valores e a eficácia clínica pretendida (JAWAD *et al.*, 1987 e 1989). Além disso, alguns doentes revelaram ser possível atingir níveis séricos superiores a 10 mg/L, com benefício clínico e sem manifestações de toxicidade (BRODIE, 1992; SCHLUMBERGER *et al.*, 1994; KILPATRICK, FORREST e BRODIE, 1996). Outros estudos complementaram estas observações, não evidenciando qualquer relação entre uma maior ocorrência de efeitos adversos e níveis séricos de lamotrigina mais elevados (BETTS *et al.*, 1991).

Perante tal indefinição, e atendendo à grande variabilidade interindividual verificada na obtenção da resposta terapêutica, os clínicos foram procurando ajustar a dosagem da lamotrigina em função da resposta apresentada por cada indivíduo, quer quanto à resposta terapêutica quer quanto à tolerabilidade manifestada (GOA, ROSS e CHRISP, 1993; FITTON e GOA, 1995; GILMAN, 1995).

Mais tarde, perante o facto de não se conseguir estabelecer uma relação bem definida entre os níveis séricos de lamotrigina e as respostas farmacológicas desencadeadas, sejam elas terapêuticas ou tóxicas (KILPATRICK, FORREST e BRODIE, 1996), Morris *et al.* (1998) levantaram a hipótese de tal se dever à adopção, nos ensaios clínicos, de uma margem de concentrações para a lamotrigina demasiado baixa (1-3 mg/L), que se revelou muitas vezes inadequada para a obtenção dos efeitos terapêuticos desejados. Nesse sentido, e com base nos dados entretanto obtidos na experiência clínica – que demonstraram que a obtenção da resposta óptima da lamotrigina exigia, muitas vezes, concentrações séricas mais altas –, estes investigadores defenderam uma margem terapêutica mais elevada e alargada para a lamotrigina, a saber, entre 3 e 14 mg/L. Até ao momento, estes valores ainda não foram refutados pela prática clínica (CHONG e DUPUIS, 2002; FROSCHE *et al.*, 2002; HACHAD, RAGUENEAU-MAJLESSI e LEVY, 2002; PERUCCA, 2002).

2.6. Utilização clínica

2.6.1. Indicações terapêuticas

Como já foi referido, a avaliação pré-clínica é uma etapa essencial no processo de desenvolvimento de um novo fármaco. No caso dos antiepilépticos, o grau de eficácia do composto deve ser avaliado em modelos animais que sejam preditivos da actividade anticonvulsivante dessa substância em relação aos diversos tipos de crise. Infelizmente, não existe um teste laboratorial único e simples que possa ser utilizado para estabelecer a presença ou a ausência da actividade anticonvulsivante ou para prever a utilidade clínica de um determinado composto. No entanto, os diferentes testes, no seu conjunto, fornecem pistas para eventuais aplicações clínicas do fármaco. No final, os ensaios clínicos com o fármaco confirmam (ou não) e caracterizam a sua eficácia na abordagem dos diferentes tipos de crise (WHITE, 1999).

Nalguns aspectos, o perfil pré-clínico da lamotrigina assemelha-se bastante aos perfis apresentados pela fenitoína e pela carbamazepina: qualquer um destes três antiepilépticos se revela activo no teste do electrochoque máximo e no modelo do *kindling* e ineficaz no teste do pentilenotetrazol subcutâneo em dose baixa. No entanto, a lamotrigina apresenta um comportamento diferente no modelo do murganho mutante letárgico: enquanto que a fenitoína e a carbamazepina se revelam ineficazes e, por vezes, manifestam mesmo uma acção promotora das crises, a lamotrigina reduz significativamente a frequência das crises neste modelo genético. Estes resultados suportam os resultados clínicos obtidos numa fase mais avançada. De facto, a avaliação clínica do fármaco revela a sua eficácia terapêutica na abordagem de crises parciais, de crises generalizadas tónico-clónicas e de crises

generalizadas de ausência, tal como foi predito pelos testes de avaliação pré-clínica da actividade farmacológica da lamotrigina (WHITE, 1999).

Os primeiros estudos clínicos realizados em doentes refractários à terapêutica clássica revelaram a eficácia da lamotrigina, como adjuvante da terapia, na abordagem de crises parciais com ou sem generalização secundária (JAWAD *et al.*, 1989; LOISEAU *et al.*, 1990; YUEN, 1994). Doentes com crises de ausência, crises atónicas, crises tónico-clónicas primariamente generalizadas, em estado de mal epiléptico ou com a síndrome de Lennox-Gastaut também responderam positivamente à acção da lamotrigina (RICHEMS e YUEN, 1991; GOA, ROSS e CHRISP, 1993; YUEN, 1994; GILMAN, 1995; McCABE, 2000). Embora mais limitada, a experiência com crianças epiléticas revelou a eficácia da lamotrigina na abordagem de crises de ausência, da síndrome de Lennox-Gastaut e de outras epilepsias generalizadas sintomáticas (RICHEMS e YUEN, 1991; YUEN, 1994). Mais tarde, em ensaios clínicos desenhados especificamente para regimes de monoterapia, a lamotrigina também revelou ter eficácia na abordagem de crises parciais com ou sem generalização secundária e em crises tónico-clónicas primariamente generalizadas. Quando foi comparada com a carbamazepina e com a fenitoína, a lamotrigina revelou, em epilepsias recentemente diagnosticadas, ter eficácia semelhante a estes antiepiléticos clássicos na abordagem deste tipo de crises. No entanto, manifestou gozar de melhor tolerabilidade do que a associada aos referidos fármacos (YUEN, 1994; BRODIE, RICHEMS e YUEN, 1995; GILLIAM *et al.*, 1998; STEINER *et al.*, 1999).

Actualmente, o espectro de eficácia da lamotrigina revela-se bastante vasto, abrangendo os principais tipos de crise, nomeadamente as crises parciais com ou sem generalização secundária, as crises tónico-clónicas primariamente generalizadas, as crises de ausência e as crises atónicas. A sua eficácia nos espasmos infantis e nas crises mioclónicas não se encontra ainda bem definida (PERUCCA, 2002).

Em Portugal, a lamotrigina está aprovada para tratamento das crises parciais e generalizadas, incluindo as crises tónico-clónicas, no âmbito da epilepsia. No adulto pode ser utilizada em terapêutica de associação ou em monoterapia; na criança recomenda-se inicialmente a terapêutica de associação, podendo passar-se ao regime de monoterapia apenas quando a epilepsia estiver controlada (RCM, 1999).

2.6.2. Tolerabilidade

Qualquer tentativa de abordagem do perfil de tolerabilidade associado à lamotrigina encontra-se dificultada pelo facto de, na maioria das vezes, a lamotrigina ser usada em combinação com outros fármacos antiepiléticos. No entanto, dados recolhidos de alguns ensaios clínicos onde a lamotrigina foi usada em monoterapia permitem reconhecer as principais reacções adversas que lhe estão associadas.

Podem considerar-se três grandes grupos de reacções adversas, de acordo com a sua natureza: reacções neurológicas, gastrointestinais e dermatológicas. Mais especificamente, à terapêutica com a lamotrigina podem estar associadas cefaleias, fadiga, tonturas, diplopia, ataxia, visão perturbada, sonolência, insónia, irritabilidade/agressão, tremor, agitação, confusão, náuseas, vómitos e *rash* cutâneo.

De entre os efeitos indesejáveis citados, os de maior relevância são os de natureza dermatológica, de origem idiossincrática, que podem atingir cerca de 10% dos doentes. A maioria dos *rashes*, usualmente descritos como maculopapulares, são ligeiros e autolimitados, desaparecendo com a interrupção da medicação. No entanto, já foram identificadas situações graves, com potencial risco de vida, incluindo a síndrome de Stevens-Johnson e a síndrome de Lyell. As reacções adversas cutâneas ocorrem

geralmente nas primeiras semanas de tratamento, levantando-se a hipótese de existência de uma relação de dependência entre o aparecimento deste efeito e a rapidez com que se processa a subida dos níveis séricos da lamotrigina. Normalmente, este tipo de reacções desaparece rapidamente após a interrupção do tratamento, como já foi referido (BETTS *et al.*, 1991; SMITH, D. *et al.*, 1993; RICHENS, 1994; BRODIE, RICHENS e YUEN, 1995; GILMAN, 1995; GILLIAM *et al.*, 1998; RCM, 1999; STEINER *et al.*, 1999; McCABE, 2000). Uma maior incidência do *rash* parece estar também associada à terapêutica de co-administração da lamotrigina com o ácido valpróico (GILMAN, 1995; GILLIAM *et al.*, 1998). No entanto, outros investigadores constataram, recentemente, que, se a adição da lamotrigina ao regime terapêutico preestabelecido com ácido valpróico se fizer lentamente, a incidência do *rash* será semelhante à que se verifica quando a lamotrigina é adicionada a outros antiepilépticos (FAUGHT *et al.*, 1999).

Não obstante o referido, a lamotrigina, em regime de monoterapia, é melhor tolerada pelos doentes do que alguns antiepilépticos clássicos, nomeadamente a fenitoína e a carbamazepina. Essa melhor tolerabilidade está normalmente associada a uma menor incidência de efeitos sedativos. À lamotrigina também está associada uma menor ocorrência de fadiga e astenia quando comparada com a fenitoína. Este antiepiléptico de nova geração tem ainda a vantagem de não provocar o ganho de peso que está muitas vezes associado à terapêutica com outros antiepilépticos. Em geral, as reacções adversas que podem ocorrer na terapêutica com a lamotrigina são mais facilmente toleradas do que aquelas que se encontram associadas à carbamazepina ou à fenitoína (BRODIE, RICHENS e YUEN, 1995; FITTON e GOA, 1995; STEINER *et al.*, 1999).

2.6.3. Interações medicamentosas

A abordagem clínica da epilepsia é, em grande parte dos casos, dificultada pela existência de interações medicamentosas resultantes da necessidade de recurso a uma terapêutica de associação entre dois ou mais antiepilépticos. Estas interações são, na maioria das vezes, de natureza farmacocinética. Processos de indução ou inibição enzimática, relacionados com o metabolismo hepático, constituem o tipo de interação mais frequente, podendo provocar importantes alterações nas concentrações séricas dos antiepilépticos. Fenómenos relacionados com alterações no grau de ligação dos fármacos às proteínas plasmáticas também podem ocorrer, mas são menos frequentes, dado a sua relevância clínica estar associada à existência de graus bastante elevados na ligação dos fármacos às proteínas plasmáticas (RAMBECK, SPECHT e WOLF, 1996; RIVA *et al.*, 1996).

Sabendo-se que a principal via de eliminação da lamotrigina é a da glucuronidação hepática, também este antiepiléptico – que é muitas vezes usado como adjuvante de terapia com outros antiepilépticos – deve ser estudado na sua capacidade de envolvimento em interações medicamentosas (GOA, ROSS e CHRISP, 1993; RIVA *et al.*, 1996).

2.6.3.1. Efeitos de outros antiepilépticos na farmacocinética da lamotrigina

Atendendo à indução enzimática desencadeada por fármacos como a carbamazepina, a fenitoína, o fenobarbital e a primidona, a extensão da glucuronidação da lamotrigina aumenta quando estes fármacos são administrados concomitantemente. Este efeito requer a síntese de uma maior quantidade de enzimas, pelo que se desenvolve gradualmente após a introdução do fármaco indutor. Uma vez desenvolvido o processo, os valores de *clearance* da lamotrigina passam a situar-se entre 0,044-0,084 L/h/kg, e a

sua semivida é reduzida para valores que se estimam à volta de um valor médio de 15 horas (BINNIE *et al.*, 1986; COHEN *et al.*, 1987; JAWAD *et al.*, 1987; RIVA *et al.*, 1996). Outros antiepilépticos de nova geração, como a oxcarbazepina e a metossuccimida, também se comportam como indutores enzimáticos (MAY, RAMBECK e JÜRGENS, 1999).

Por sua vez, tendo em consideração a inibição enzimática resultante de uma eventual competição entre a lamotrigina e o ácido valpróico para um mesmo local de ligação às enzimas envolvidas na etapa da glucuronidação, o ácido valpróico provoca uma redução na *clearance* total da lamotrigina e um aumento médio na sua semivida de eliminação de 24 para 59 horas (BINNIE *et al.*, 1986; COHEN *et al.*, 1987; YUEN *et al.*, 1992). Esta inibição do metabolismo da lamotrigina traduz-se num aumento rápido dos níveis séricos do fármaco e, conseqüentemente, num aumento do risco de aparecimento das reacções adversas que lhe estão associadas. É neste contexto que se pode explicar uma maior incidência de *rash* cutâneo quando a lamotrigina se associa à terapêutica com o ácido valpróico, confirmando-se a tese da existência de uma forte correlação entre o desenvolvimento do *rash* e uma subida rápida e significativa dos níveis séricos da lamotrigina (GILMAN, 1995; RIVA *et al.*, 1996; GILLIAM *et al.*, 1998).

Em doentes medicados simultaneamente com ácido valpróico e fenobarbital ou carbamazepina, o efeito inibidor do primeiro prevalece sobre o efeito indutor do segundo; no caso da associação se fazer com o ácido valpróico e a fenitoína, ambos os efeitos se anulam e, conseqüentemente, a *clearance* da lamotrigina assume valores idênticos aos estimados para o regime de monoterapia (MAY, RAMBECK e JÜRGENS, 1996).

Estudos realizados com felbamato (GIDAL *et al.*, 1997), levetiracetam (PERUCCA *et al.*, 2000), topiramato (BERRY *et al.*, 2002) e retigabina (este último em fase III dos ensaios clínicos; FERRON *et al.*, 2000) não manifestaram qualquer efeito sobre a

farmacocinética da lamotrigina. A etossuccimida, o clobazam, o clonazepam, a gabapentina, a tiagabina e a vigabatrina também revelaram não influenciar significativamente os níveis séricos da lamotrigina, quando foram administrados concomitantemente (ARMUO *et al.*, 1999).

2.6.3.2. Efeitos da lamotrigina na farmacocinética de outros antiepilépticos

A lamotrigina não parece ter qualquer efeito sobre as enzimas microsomais hepáticas dependentes do citocromo P-450. Conseqüentemente, não deverá afectar o metabolismo dos fármacos extensivamente metabolizados por esta via, que é considerada como uma das mais importantes no processo de metabolismo de fármacos (GOA, ROSS e CHRISP, 1993; RAMBECK e WOLF, 1993).

Em concordância com este facto, diversos estudos revelam que o perfil cinético de outros antiepilépticos, nomeadamente da fenitoína, da carbamazepina, da primidona, do fenobarbital e do ácido valpróico, não é influenciado pela lamotrigina (PARSONS e MILES, 1984; JAWAD *et al.*, 1987 e 1989; LOISEAU *et al.*, 1990; BARTOLI *et al.*, 1997).

2.6.3.3. Interações farmacodinâmicas

A terapêutica de associação entre dois antiepilépticos também pode originar interacções de natureza farmacodinâmica, que podem resultar em situações de maior ou menor tolerabilidade, quando comparadas com os regimes de monoterapia (PERUCCA, 2002).

Embora a administração conjunta da lamotrigina com o ácido valpróico necessite de uma redução na dosagem de cada um dos fármacos, de forma a minimizar as reacções adversas resultantes de uma administração conjunta (REUTENS, DUNCAN e PATSALOS, 1993), a associação entre estes dois antiepilépticos parece resultar numa nova oportunidade terapêutica para doentes que se tenham manifestado refractários à terapêutica com cada um destes fármacos administrados isoladamente. De facto, está descrita para esta associação um efeito sinérgico, de natureza farmacodinâmica, que resulta numa redução significativa da frequência das crises em doentes refractários (PANAYIOTOPOULOS *et al.*, 1993; PISANI *et al.*, 1993; RAMBECK, SPECHT e WOLF, 1996; PISANI *et al.*, 1999; DECERCE *et al.*, 2000; KANNER e FREY, 2000).

A associação entre a lamotrigina e a carbamazepina, por sua vez, origina uma maior frequência de reacções adversas. A hipótese de existência de uma interacção farmacocinética que origina um aumento dos níveis séricos do metabolito activo da carbamazepina é defendida por Warner *et al.* (1992) mas refutada por Besag *et al.* (1998). O aumento da toxicidade relacionada com a administração conjunta da lamotrigina e da carbamazepina é atribuída por Besag *et al.* (1998), com maior probabilidade, a uma eventual interacção farmacodinâmica entre estes dois antiepilépticos. O aumento da toxicidade parece ser mais significativo quando os níveis séricos da carbamazepina são superiores a 8 mg/L e a redução dos efeitos adversos pode ser facilmente conseguida com a redução lenta da dose de carbamazepina.

2.6.3.4. Interacções da lamotrigina com outros fármacos

Contraceptivos orais

Ao contrário de outros antiepilépticos que, devido à sua actividade indutora, aumentam o metabolismo dos contraceptivos orais, provocando a descida dos seus níveis séricos e, por conseguinte, a diminuição da sua eficácia, a lamotrigina não revela qualquer tipo de interacção metabólica com estes fármacos, permitindo a utilização, com eficácia, de preparações contraceptivas, em doses normais, em mulheres medicadas com lamotrigina (HOLDICH *et al.*, 1991; CRAWFORD, 2002).

Paracetamol

Uma investigação levada a cabo em voluntários sãos estudou os efeitos cinéticos de doses múltiplas orais de paracetamol (analgésico e antipirético) numa dose única oral de lamotrigina. Os resultados revelaram uma diminuição de 20% e 15%, respectivamente, nos valores de área sob a curva de níveis plasmáticos e na semivida de eliminação da lamotrigina, o que indica um aumento da *clearance* do antiepiléptico. O estudo referido não permitiu, no entanto, esclarecer o mecanismo que suporta tal interacção. Os mesmos autores concluíram que tais efeitos provavelmente não terão relevância clínica (DEPOT *et al.*, 1990).

Sertralina

Foram referenciados dois casos de doentes que revelaram a existência de uma interacção entre a lamotrigina e a sertralina, um antidepressivo que se associa à terapêutica antiepiléptica para controlo de transtornos psiquiátricos. Segundo os autores do estudo, a interacção – que se manifestou com o aparecimento de sintomas de toxicidade e revelou a duplicação dos níveis séricos da lamotrigina – terá origem metabólica, sendo a inibição da glucuronidação da lamotrigina o seu mecanismo mais provável (KAUFMAN e GERNER, 1998).

Rifampicina

Um ensaio desenhado para o estudo dos efeitos da rifampicina (agente antibacteriano) na farmacocinética e farmacodinâmica da lamotrigina em indivíduos sãos revelou um aumento da *clearance* do antiepiléptico e da quantidade de fármaco excretado como glucuronido, com a consequente diminuição da sua semivida de eliminação e do valor de área sob a curva de níveis plasmáticos ao longo do tempo. A acção da rifampicina, atendendo à sua potente capacidade de indução enzimática, será a responsável pela aceleração do metabolismo da lamotrigina (EBERT *et al.*, 2000).

Cimetidina

O ensaio levado a cabo por Ebert *et al.* (2000) também estudou a influência da cimetidina – um antiulceroso com forte actividade inibidora do sistema microsomal hepático do citocromo P-450 – sobre a lamotrigina. Os resultados não revelaram efeitos significativos na farmacocinética da lamotrigina.

2.6.4. Dosagem e administração

A terapêutica com lamotrigina deverá iniciar-se gradualmente, seguindo um escalonamento lento, de forma a reduzir o risco de desenvolvimento de *rash* cutâneo. No final, a sua descontinuidade deverá fazer-se também de uma forma lenta e gradual, a fim de se evitar o aparecimento de crises por efeito *rebound* (GILMAN, 1995).

Em termos práticos, o esquema terapêutico da lamotrigina dependerá do facto de se pretender instalar um regime de mono ou de politerapia. Neste último caso, os doentes que receberem, concomitantemente, fármacos indutores enzimáticos, necessitarão de doses mais elevadas de lamotrigina, para compensar esse mesmo efeito indutor. De modo contrário, os doentes que associarem a lamotrigina com o ácido valproico irão requerer doses mais baixas de lamotrigina, uma vez que esta não será tão rapidamente metabolizada (BATTINO *et al.*, 1997; ARMUO *et al.*, 1999).

A posologia da lamotrigina também deverá ter em conta a idade do doente. Assim, pelo facto de as crianças apresentarem uma velocidade de eliminação do fármaco superior à dos adultos, as doses diárias para crianças e adolescentes deverão ser superiores, em termos relativos, às recomendadas para os adultos, de modo a contrariar a tendência do aumento da razão concentração/dose com a idade (BATTINO *et al.*, 1997; ARMUO *et al.*, 1999).

Por último, convém recordar que, pelo facto de ainda não se ter conseguido estabelecer uma relação clara entre os níveis séricos de lamotrigina e a resposta terapêutica desejada, o ajuste da dosagem da lamotrigina deverá ser feito, na prática, em função da resposta apresentada por cada indivíduo, quer no que respeita à resposta terapêutica quer no que respeita à tolerabilidade manifestada (GOA, ROSS e CHRISP, 1993; FITTON e GOA, 1995; GILMAN, 1995).

II. OBJECTIVOS

OBJECTIVOS

A dificuldade em estabelecer uma relação bem definida entre os níveis plasmáticos de lamotrigina e a resposta farmacológica desencadeada faz com que, actualmente, seja ainda difícil determinar o valor clínico deste antiepiléptico de nova geração (KILPATRICK, FORREST e BRODIE, 1996; BARTOLI *et al.*, 1997; MORRIS *et al.*, 1998). Sabe-se, no entanto, que a interpretação dos níveis plasmáticos de qualquer antiepiléptico requer que esses níveis reflectam as concentrações atingidas nos locais neuronais de acção, uma vez que, para exercer a sua acção farmacológica, esse fármaco necessita de atravessar a barreira hematoencefálica e de penetrar no sistema nervoso central. Nesta perspectiva, um estudo cinético aprofundado da lamotrigina deverá incluir, para além do estudo das concentrações plasmáticas ao longo do tempo, o estudo das concentrações atingidas no cérebro ao longo desse mesmo período de tempo, e ainda procurar estabelecer uma relação entre os dois tipos de curva traçados. Por razões de ordem ética e logística, tal estudo não é fácil de realizar em seres humanos, pelo que os estudos farmacocinéticos experimentais em animais se revelam imprescindíveis.

O presente trabalho de investigação tem pois, como objecto, a caracterização do perfil neurofarmacocinético da lamotrigina em ratos, visando contribuir para um melhor conhecimento da relação existente entre as concentrações plasmáticas e a resposta farmacológica desencadeada por este antiepiléptico.

Foram objectivos deste trabalho:

- 1. Desenvolver e validar uma técnica analítica de cromatografia líquida de elevada resolução para a determinação quantitativa de lamotrigina em fluidos e tecidos biológicos.**
- 2. Estudar a evolução das concentrações plasmáticas e cerebrais da lamotrigina em função do tempo, utilizando para o efeito animais de experimentação e a formulação do fármaco mais adequada.**
- 3. Avaliar em simultâneo, com base nos dados obtidos através do estudo anterior, os perfis de concentração da lamotrigina no plasma e no cérebro ao longo do tempo, por forma a caracterizar a distribuição da lamotrigina entre a circulação sistémica e o seu local de acção.**
- 4. Caracterizar a distribuição da lamotrigina no cérebro, através da quantificação do fármaco em diversas regiões cerebrais.**

III. MATERIAL E MÉTODOS

1. TÉCNICA ANALÍTICA

Para a determinação dos níveis de lamotrigina no plasma e no cérebro de rato foi desenvolvida e validada, no Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, em colaboração com o Departamento de Farmácia e Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade de Salamanca (Espanha), uma técnica de cromatografia líquida de elevada resolução (CASTEL-BRANCO *et al.*, 2001).

1.1. Generalidades sobre cromatografia

O método cromatográfico é um método físico-químico que permite separar, identificar e quantificar diferentes espécies químicas presentes numa amostra. A separação tem por base um mecanismo de interacção selectiva entre as moléculas do soluto (amostra) e duas fases, uma estacionária e outra móvel. A fase estacionária apresenta uma área superficial grande em relação ao volume, encontrando-se acondicionada no interior da coluna cromatográfica; a fase móvel transporta as espécies a separar, fluindo continuamente através do sistema. As substâncias com maior afinidade para a fase estacionária sofrem uma maior retenção, pelo que são eluídas mais tarde; aquelas que são mais afins à fase móvel são eluídas em primeiro lugar.

A cromatografia líquida de elevada resolução (HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*) surgiu, no final dos anos 60, com Halasz, Horvath, Huber e outros. A introdução de colunas reutilizáveis de pequeno diâmetro (2-5 mm), de enchimentos de coluna de partícula pequena (5-50 μm), de novos materiais, de detectores muito

sensíveis, de instrumentos normalizados e automatizados, e o recurso a altas pressões de entrada e ao controlo do fluxo da fase móvel trouxeram rapidez, sensibilidade e elevada resolução às análises cromatográficas, introduzindo a cromatografia líquida na era da “modernidade” (ALVAREZ-CEDRON RODRIGUEZ, 1997).

Para que a técnica cromatográfica possa ser levada a cabo necessita de vários componentes instrumentais que, no seu conjunto, constituem o cromatógrafo, conforme se encontra esquematizado na figura M.1.

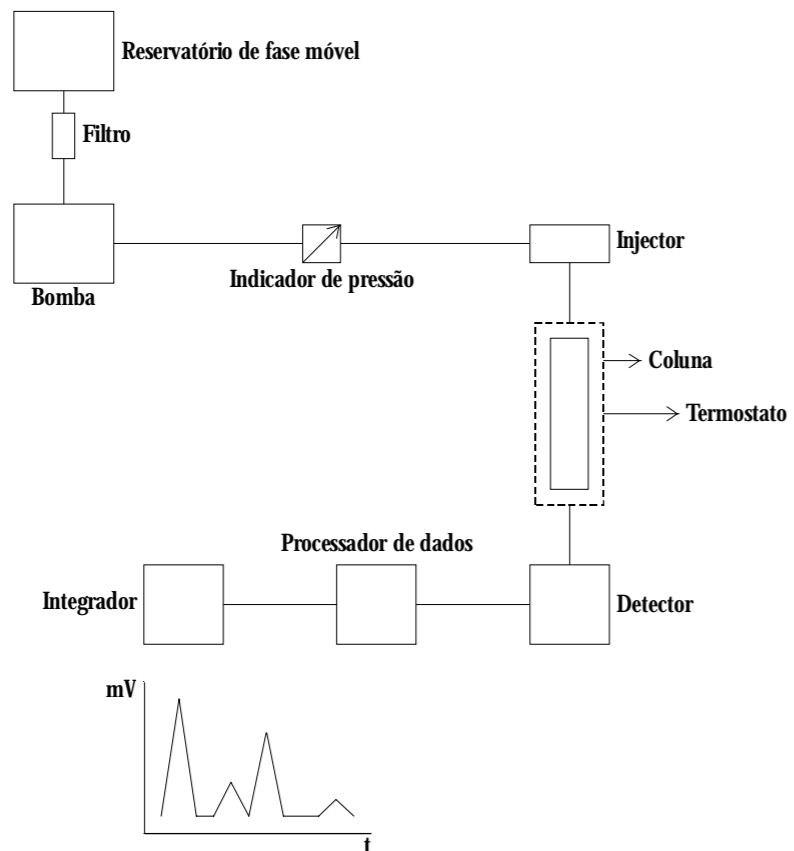


Figura M.1 Esquema dos componentes básicos de um cromatógrafo.

Atendendo ao método utilizado no processo cromatográfico, a cromatografia líquida de elevada resolução classifica-se como sendo uma cromatografia de partilha líquido-líquido, onde a separação dos diferentes componentes da amostra se baseia nas diferenças de solubilidade que estes apresentam nos dois líquidos imiscíveis que constituem as fases estacionária e móvel (ALVAREZ-CEDRON RODRIGUEZ, 1997; CASQUERO DORADO, 1997).

No interior da coluna cromatográfica, encontra-se um enchimento constituído por partículas de sílica-base, de diâmetro situado normalmente entre 5 e 10 μm . Esse enchimento apresenta elevadas porosidade e área superficial. Ao suporte sólido inerte liga-se a fase estacionária, normalmente por meio de ligações covalentes entre os seus grupos funcionais e os grupos hidroxilo livres da sílica. Este tipo de ligação química produz um leito cromatográfico com elevada estabilidade, homogeneidade e reprodutibilidade. É também importante considerar o pH de trabalho, que se deverá situar entre 2 e 8, uma vez que a sílica se dissolve de forma acentuada em meios de pH superior a 8 e a fase ligada se hidroliza em meios de pH inferior a 2.

Quanto à sua natureza, a fase estacionária poderá ser polar ou apolar, denominando-se a cromatografia, respectivamente, de cromatografia de fase normal ou de fase reversa. A natureza da fase móvel depende, por sua vez, do tipo de fase estacionária utilizado. Deste modo, trabalhando-se em fase normal, a fase móvel é apolar, enquanto que, trabalhando-se em fase reversa, a fase móvel é polar. Neste último caso, os primeiros compostos a serem eluídos são os mais polares, pois sofrem menor retenção. Na figura M.2, esquematizam-se os dois tipos de cromatografia resultantes das diferentes polaridades que as fases líquidas envolvidas no processo podem assumir.

Actualmente, o tipo de cromatografia mais comum apresenta a fase estacionária ligada, em fase reversa, ao suporte sólido inerte. Em cerca da 90% das análises de medicamentos por HPLC, é utilizada a fase reversa e, em 99% desses casos, a fase reversa utilizada é a C₁₈, cujo principal grupo funcional é o grupo octadecilsilano (SiC₁₈H₃₇). A sua quase universalidade baseia-se no facto de todas as moléculas orgânicas possuírem regiões hidrofóbicas que, de uma forma ou de outra, são capazes de interaccionar com a fase estacionária apolar. As grandes vantagens deste tipo de cromatografia são as seguintes: a estabilidade da fase estacionária na coluna; o curto tempo de retenção; a elevada velocidade de amostragem; a não ocorrência de reacções irreversíveis e a não deterioração da coluna; para além da relativa simplicidade e menores custos de todo o sistema cromatográfico, dado que, neste caso, o eluente é constituído, na sua maior parte, por água (CHUST, 1990; CASQUERO DORADO, 1997; GONZALEZ LOPEZ, 1997).

(a)

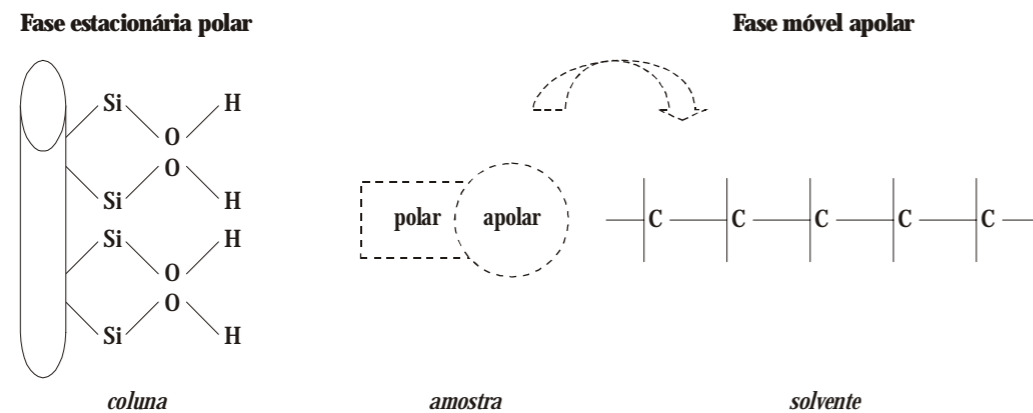


Figura M.2 HPLC em fase normal (a).

1.2. Tratamento das amostras biológicas

A análise de fármacos por HPLC requer, normalmente, trabalho com amostras biológicas. Ora, este tipo de amostras não pode ser injectado directamente no cromatógrafo: por um lado, porque se apresentam com proteínas que, uma vez injectadas na coluna, precipitariam, aumentando a pressão e fazendo desmoronar a fase estacionária; por outro lado, porque, na maioria dos casos, se torna imprescindível concentrar a amostra, o que tem de ser feito antes da sua injeção. Estas são razões só por si suficientes para justificar um tratamento prévio das amostras biológicas que são analisadas por HPLC.

(b)

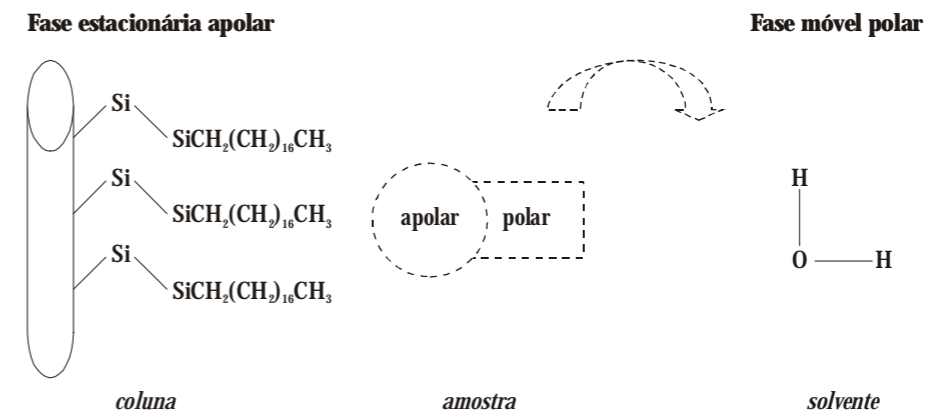


Figura M.2 HPLC em fase reversa (b).

Esse tratamento a que a amostra biológica deve ser sujeita pode ser muito variado, dependendo tanto da matriz biológica em causa como do fármaco a analisar, e pode ir de uma simples precipitação de proteínas até uma combinação de várias técnicas de diluição, extracção ou derivatização (ZARZUELO CASTAÑEDA, 1997).

Dependendo da complexidade do tratamento, será necessário, ou não, o uso de um padrão interno para a quantificação do fármaco, sendo aquele tão mais necessário quanto mais complexo for o tratamento requerido. Este composto, utilizado como um verdadeiro marcador interno, deverá ter uma grande equivalência estrutural com a substância em estudo, de tal modo que tudo o que afecte o acondicionamento dessa substância venha a afectar, num mesmo modo e em idêntico grau, o padrão interno. Na prática, o recurso à utilização de um padrão interno desde o início do processo de acondicionamento da amostra é bastante frequente, dado que só ele permite evitar que a variabilidade inerente ao tratamento da amostra venha a afectar significativamente os resultados. A sua utilização permite também compensar eventuais erros produzidos por pequenas alterações no sistema cromatográfico que afectem, de igual modo, todos os picos (MEHTA, 1989; COLINO GANDARILLAS e GONZALEZ LOPEZ, 1997; ZARZUELO CASTAÑEDA, 1997).

Para o tratamento das amostras de plasma e homogeneizado de cérebro de rato, assim como dos padrões de calibração das matrizes respectivas, desenvolvemos, a partir dos métodos apresentados por Fraser *et al.* (1995) e por Sallustio e Morris (1997), um processo de extracção líquido-líquido, com acetato de etilo, em meio básico. As amostras de homogeneizado de cérebro foram submetidas, previamente, a um processo de desproteinização com ácido tricloroacético, devido à maior complexidade desta matriz biológica. A figura M.3 representa um esquema dos processos envolvidos.

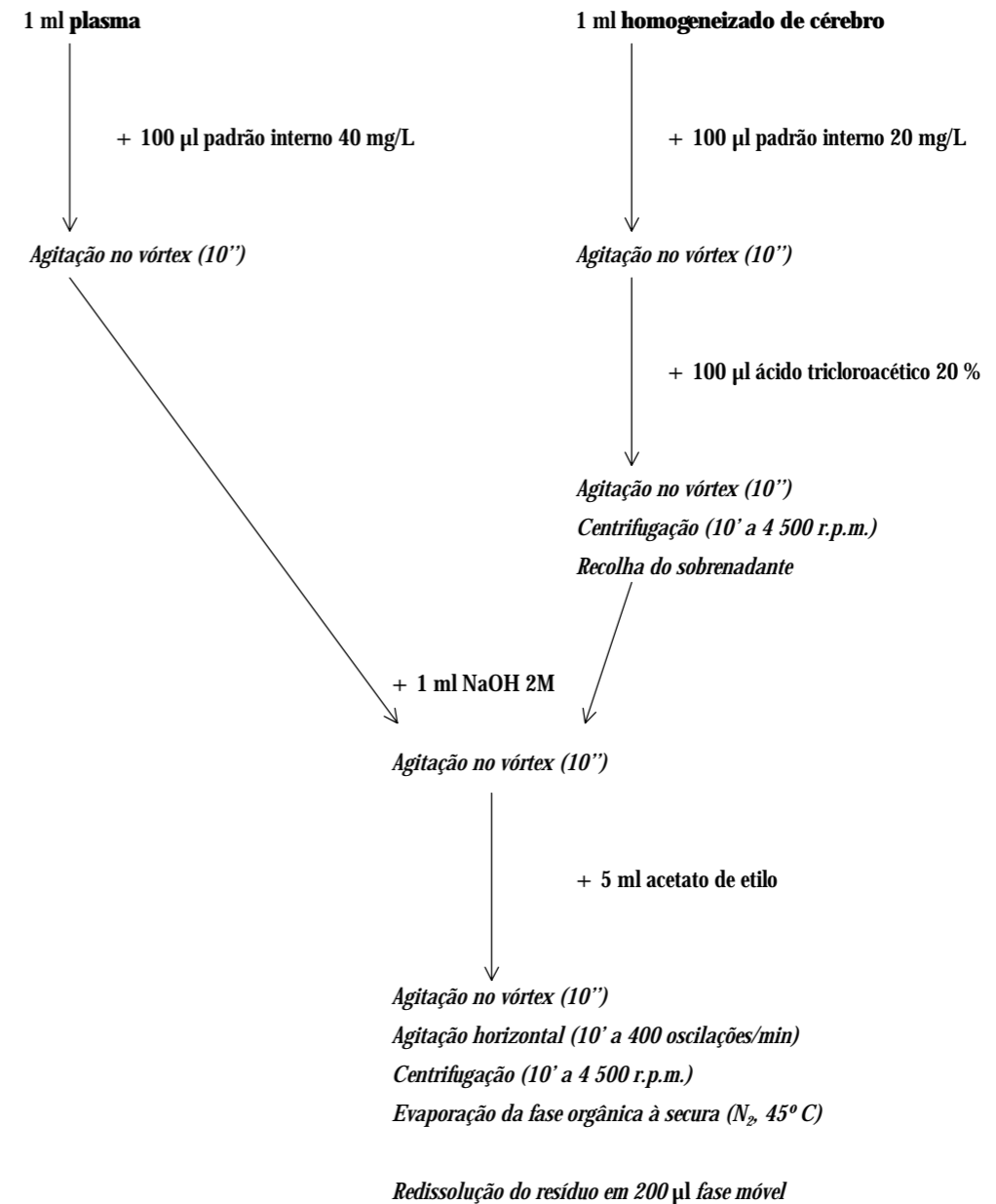


Figura M.3 Esquema de tratamento de amostras biológicas com lamotrigina.

Plasma

O tratamento do plasma inicia-se com 1 ml de amostra acondicionado num tubo cilíndrico, ao qual se adicionam 100 µl de uma solução metanólica de padrão interno 40 mg/L. Após uma ligeira agitação, segue-se a adição de 1 ml de uma solução aquosa de hidróxido de sódio 2 M para alcalinização do meio, a fim de se assegurar que quer a lamotrigina quer o seu análogo estrutural se encontram na forma molecular, a única capaz de passar para a fase orgânica. Procede-se, de seguida, à adição de 5 ml de acetato de etilo, o reagente que vai promover a extracção propriamente dita. Seguidamente, os tubos são tapados e colocados num agitador horizontal, a 400 oscilações/min, durante 10 minutos. Depois, são colocados na centrífuga, a 15° C, e submetidos a 4500 rotações/min, durante mais 10 minutos. A fase orgânica é, então, transferida para um tubo cónico e evaporada à securo, sob corrente de azoto, num bloco de aquecimento a 45° C. O resíduo seco que se obtém é, mais tarde (imediatamente antes da análise cromatográfica), redissolvido em 200 µl de fase móvel.

Homogeneizado de cérebro

O tratamento do homogeneizado de cérebro inicia-se com 1 ml de amostra acondicionada num tubo cónico, ao qual se adicionam 100 µl de uma solução metanólica de padrão interno 20 mg/L. Após agitação, segue-se a adição de 100 µl de uma solução aquosa de ácido tricloroacético a 20% para desnaturação das proteínas. Após realização desta mistura, os tubos são colocados na centrífuga, a 15° C, e submetidos a 4500 rotações/min, durante 10 minutos. O sobrenadante obtido é, então, recolhido para um tubo cilíndrico e sujeito ao tratamento com hidróxido de sódio e acetato de etilo conforme descrito para o plasma.

1.3. Condições cromatográficas

Para a execução da técnica de HPLC com vista à quantificação de lamotrigina em amostras biológicas, utilizámos um sistema cromatográfico composto por: um cromatógrafo BAS-480, equipado com uma bomba PM-80; um injector manual Rheodyne, com bucle de 50 µl; um detector de ultravioleta-visível BAS UV-116 UV-Vis; um sistema de processamento e de integração de dados BAS DA-5 Chromatography Control e Report (Bioanalytical Systems, West Lafayette, IN, USA).

A separação cromatográfica foi levada a cabo numa coluna de fase reversa com 15 cm de comprimento por 4 mm de diâmetro interno e enchimento LiChrospher® 100 RP-18 de 5 µm de tamanho de partícula (LiChrospher 100 RP-18 (5 µm) LiChroCART 125-4; Merck). A separação ocorreu durante 10 minutos, à temperatura ambiente.

A fase móvel consistiu numa mistura de 35,0% de metanol, 64,7% de uma solução aquosa de dihidrogenofosfato de potássio 0,1 M e 0,3% de trietilamina. A trietilamina tem por função assumir uma interacção preferencial com os grupos silanol residuais da fase estacionária, que são expostos gradualmente à medida que ocorre o envelhecimento da coluna, impedindo que a lamotrigina aí fique retida e originando, conseqüentemente, uma estabilização do tempo de retenção e da forma dos picos do analito.

A fase móvel, após ter sido preparada com água destilada e desionizada, filtrada através de uma membrana com diâmetro de poro de 0,45 µm e desgaseificada num banho de ultra-sons, antes de cada utilização, foi eluída através do sistema, de forma isocrática, a um fluxo de 1,0 ml/min.

A detecção realizou-se com um detector de ultravioleta-visível pré-seleccionado a 306 nm e com unidades de absorvância (AUFS – *Absorbance Units Full Scale*) de 0,2, para a quantificação da lamotrigina no plasma, e de 0,05, para a determinação da lamotrigina no homogeneizado de cérebro.

As condições cromatográficas utilizadas encontram-se resumidas na tabela M.1.

Tabela M.1 Condições cromatográficas da técnica de HPLC desenvolvida para a quantificação de lamotrigina em plasma e em homogeneizado de cérebro de rato.

<i>Coluna</i>	LiChrospher® 100, fase reversa RP-18, 5 µm, 125x4 mm
<i>Fase móvel</i>	metanol : H ₂ PO ₄ 0,1 M : trietilamina (35,0 : 64,7 : 0,3)
<i>Fluxo</i>	1,0 ml/min
<i>Detecção</i>	306 nm
<i>Volume de injeção</i>	50 µl
<i>Tempo de análise</i>	10 minutos
<i>Temperatura</i>	ambiente

1.4. Validação da técnica analítica

A técnica de HPLC apresentada, antes de começar a ser utilizada na prática laboratorial, foi submetida a um processo de *validação*. Este processo consiste na realização de um determinado conjunto de ensaios e na comparação sistemática dos dados obtidos com critérios de aceitação preestabelecidos, de acordo com os requisitos desejados para a técnica, tendo por objectivo assegurar que tal técnica é adequada àquilo que se pretende, ou seja, que é capaz de fornecer dados fidedignos, com bom nível de segurança e consistência. Note-se que é universalmente aceite que uma técnica analítica desenvolvida para a quantificação de um determinado analito, numa determinada matriz, deve ser caracterizada e validada perfeitamente para que os

resultados possam ser considerados fidedignos e interpretados satisfatoriamente (SHAH *et al.*, 1991; JENKE, 1996a).

Os seguintes parâmetros – denominados *parâmetros de fiabilidade*, por demonstrarem a capacidade de uma técnica analítica em manter, ao longo do tempo, os critérios fundamentais da validação – são considerados essenciais para assegurar um elevado grau de confiança e segurança na técnica analítica e na qualidade dos resultados (CALPENA CAMPANY *et al.*, 1990; JENKE, 1996b), motivo esse por que foram incluídos no nosso protocolo de validação:

1. *Especificidade e selectividade*
2. *Linearidade*
3. *Precisão*
4. *Exactidão*
5. *Eficácia da extracção*
6. *Sensibilidade, limite de detecção e limite de quantificação*
7. *Estabilidade*

Perante o facto de, em relação aos critérios de aceitação dos diversos parâmetros, não existirem orientações oficiais claras organizadas em protocolos de validação bem definidos, o protocolo de validação e os critérios de aceitação adoptados no presente

trabalho tiveram a sua principal inspiração nas recomendações provenientes da conferência sobre *validação de métodos analíticos em estudos de biodisponibilidade, bioequivalência e farmacocinética*, que se realizou em Washington, em Dezembro de 1990 (SHAH *et al.*, 1991, 1992a e 1992b).

A validação da técnica de HPLC fez-se de uma forma independente para cada matriz biológica – plasma e homogeneizado de cérebro de rato –, de modo a assegurar que a técnica é adequada à determinação de lamotrigina em qualquer uma delas. Na validação da técnica analítica em plasma utilizou-se plasma humano, gentilmente cedido pelo banco de sangue do Instituto Português de Oncologia de Coimbra, dada a disponibilidade muito limitada de plasma de rato a nível laboratorial. Na validação em cérebro de rato, utilizou-se homogeneizado de cérebro proveniente de cérebros de ratos não sujeitos previamente a qualquer tipo de medicação.

O sinal cromatográfico, depois de integrado, foi lido sob a forma de área do pico (área da curva compreendida entre as margens do pico e a linha de base). Devido à utilização do método do padrão interno, a resposta cromatográfica final foi considerada na forma da razão entre a área do pico da lamotrigina e a área do pico do padrão interno (A_{LTG} / A_{PI}) (MEHTA, 1989; COLINO GANDARILLAS e GONZALEZ LOPEZ, 1997).

1. Especificidade e selectividade

A *especificidade* de uma técnica define-se como sendo a capacidade dessa técnica de detectar o analito sem interferências de nenhum outro composto presente na amostra (CALPENA CAMPANY *et al.*, 1990).

A *selectividade* é, por sua vez, a capacidade da técnica de detectar, simultânea ou separadamente, substâncias químicas diferentes presentes numa mesma amostra (CALPENA CAMPANY *et al.*, 1990).

O estudo da especificidade da técnica foi realizado mediante a comparação entre soluções-teste de lamotrigina, com e sem padrão interno, e seis fontes independentes da mesma matriz biológica – os chamados brancos de plasma e brancos de homogeneizado de cérebro –, sob condições idênticas às de análise das amostras (SHAH *et al.*, 1991).

O estudo da selectividade realizou-se mediante a comparação entre soluções-teste de lamotrigina, com e sem padrão interno, e soluções de outros fármacos que, eventualmente, podem ser usados em co-medicação com a lamotrigina, a saber: ácido valpróico, carbamazepina, clobazam, clonazepam, fenitoína, fenobarbital, gabapentina, midazolam, primidona, vigabatrina e paracetamol.

A inexistência de picos aos tempos de retenção específicos da lamotrigina e do seu padrão interno comprova a especificidade (em relação à própria matriz biológica) e a selectividade (em relação a compostos exógenos) da técnica (WIELING *et al.*, 1996).

2. Linearidade

A técnica foi estudada no que respeita à sua capacidade de obtenção de resultados linearmente proporcionais à concentração do analito na matriz, dentro de um intervalo de concentrações predefinido (CALPENA CAMPANY *et al.*, 1990; JENKE, 1996b).

Atendendo a que a margem terapêutica sugerida para a lamotrigina se situa, actualmente, entre 3 e 14 mg/L (MORRIS *et al.*, 1998), a técnica para a quantificação de lamotrigina em plasma foi estudada entre 0,1 e 15,0 mg/L. Deste modo, ao englobar a gama completa das concentrações esperadas, quer na investigação experimental quer na prática clínica, a técnica ficou otimizada para poder ser utilizada em qualquer uma destas situações. O intervalo de concentrações estudado para a quantificação de lamotrigina no homogeneizado de cérebro de rato situou-se entre 0,1 e 5,0 mg/L.

A relação entre a concentração de lamotrigina no plasma e a resposta cromatográfica foi estabelecida através da obtenção de uma curva de calibração definida com seis padrões de calibração: 0,1 , 0,5 , 2,5 , 5,0 , 10,0 e 15,0 mg/L. A curva de calibração para o homogeneizado de cérebro, com um intervalo de concentrações mais estreito, foi definida com apenas cinco padrões: 0,1 , 0,5 , 1,0 , 3,0 e 5,0 mg/L. Em qualquer dos casos, os padrões de calibração foram preparados a partir de uma solução-mãe de lamotrigina de 100 mg/L em metanol e de soluções de trabalho resultantes de diluições apropriadas em plasma ou homogeneizado de cérebro isentos de fármaco (denominados de *brancos*), conforme esquematizado na figura M.4.

As soluções de trabalho de padrão interno utilizadas na técnica do plasma (40 mg/L) e do homogeneizado de cérebro (20 mg/L) foram preparadas diluindo-se uma alíquota proveniente de uma solução-mãe metanólica de padrão interno 100 mg/L num volume apropriado de metanol.

(a)

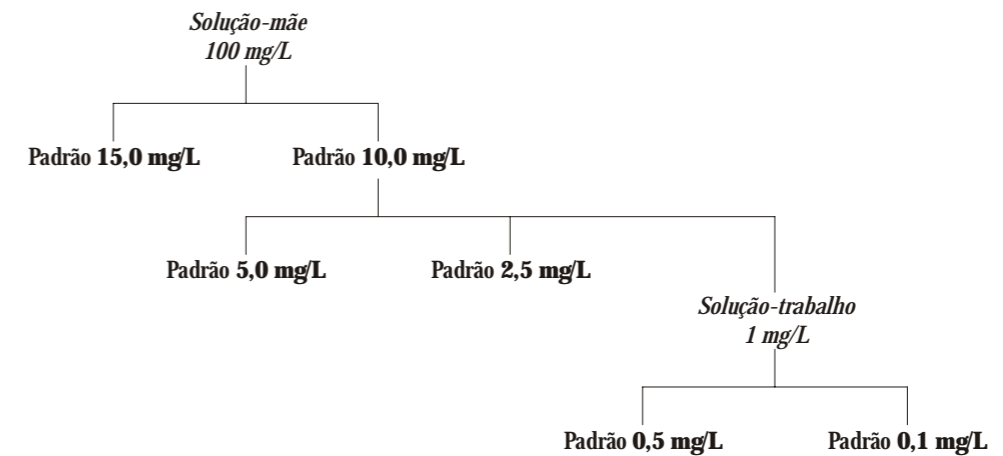


Figura M.4 Esquema de preparação dos padrões de calibração em plasma (a).

(b)

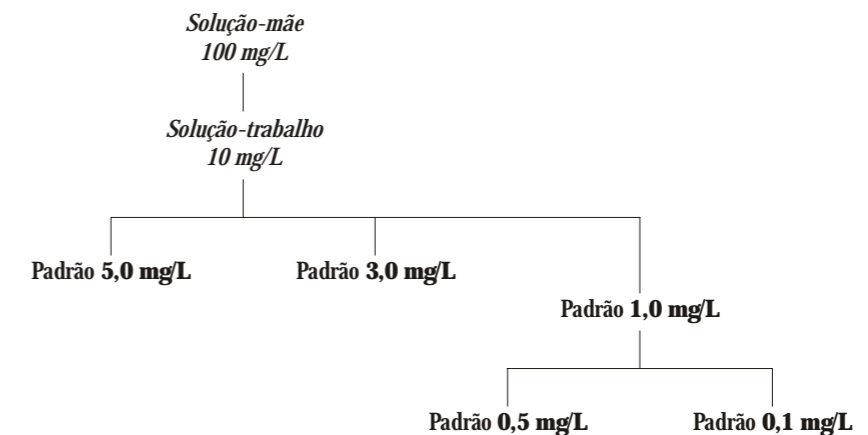


Figura M.4 Esquema de preparação dos padrões de calibração em homogeneizado de cérebro (b).

Para nos assegurarmos da eficácia da técnica na prática laboratorial, o estudo de alguns parâmetros foi realizado não só ao longo de um dia – ensaio intradia – como também durante vários dias – ensaio interdia. Assim, a avaliação da linearidade intradia decorreu ao longo de um dia, com cinco determinações de cada nível de concentração, e o estudo interdia realizou-se com os resultados obtidos ao longo de cinco dias. Devido à maior disponibilidade de plasma para a realização dos ensaios, em comparação com a disponibilidade de homogeneizado de cérebro, o estudo interdia no plasma incorporou valores de cinco dias em que cada valor diário foi a média de três determinações realizadas nesse dia.

Sabendo que a qualidade dos dados está intimamente dependente da qualidade da curva de calibração utilizada na sua geração, demos particular ênfase ao estudo deste primeiro parâmetro de fiabilidade (linearidade). Assim, e depois de verificarmos que a extensão da gama de concentrações considerada em ambas as matrizes – em qualquer dos casos superior a uma ordem de magnitude – não permitia verificar a assunção da homoscedasticidade (igualdade de variâncias em todas as concentrações), recorremos à utilização da regressão linear ponderada para a obtenção da recta de calibração mais adequada. O procedimento, que se passa a descrever de forma sucinta, envolveu três etapas fundamentais (ALMEIDA, CASTEL-BRANCO e FALCÃO, 2002):

a) Teste da homoscedasticidade – através da observação da distribuição dos resíduos em redor do eixo das concentrações e da aplicação do teste do *F* estatístico, esta etapa permite concluir acerca da ocorrência ou não de uma situação de igualdade de variâncias (homoscedasticidade).

b) Escolha do factor de ponderação – perante uma situação de heteroscedasticidade, esta etapa permite escolher, através do cálculo da percentagem de erro relativo para

cada factor de ponderação considerado ($1/x^2$, $1/x$, $1/x^{1/2}$, $1/y^2$, $1/y$ e $1/y^{1/2}$), o factor que mais se aproxima do peso teórico do inverso da variância ($1/\sigma^2$). A escolha tem por base quer a observação da distribuição dos erros em redor do eixo das concentrações quer a comparação das somas dos seus valores absolutos.

c) Cálculo dos parâmetros da recta ponderada – através de fórmulas específicas, é possível, nesta etapa, calcular o valor do declive e da ordenada na origem da recta ponderada que melhor se ajusta aos dados experimentais.

A qualidade do ajuste foi avaliada por diversos processos. Uma primeira abordagem foi feita através do valor do coeficiente de correlação (*r*), que é reconhecido como um bom indicador de linearidade quando se apresenta próximo da unidade, normalmente com um valor superior a 0,98 (CALPENA CAMPANY *et al.*, 1990; JENKE, 1996b). No entanto, porque alguns autores demonstraram que este coeficiente é um indicador pobre da correcção do ajuste dos dados por um determinado modelo de regressão (KARNES e MARCH, 1991), recorreu-se a outros processos para a avaliação da qualidade do ajuste. Assim, utilizaram-se os valores da percentagem de erro relativo, que foram calculados aquando da escolha do factor de ponderação, para avaliar a eficácia do factor de ponderação escolhido: uma distribuição em forma de banda horizontal estreita em redor do eixo das concentrações e uma soma de baixo valor são indicativos de um correcto ajuste dos dados (JOHNSON *et al.*, 1988). Uma outra forma de confirmar a qualidade do ajuste foi a verificação da não existência de mais de dois pontos, não consecutivos, que se desviassem da recta mais do que 15% em relação aos seus valores teóricos, podendo esse desvio atingir os 20% apenas para o limite de quantificação (SHAH *et al.*, 1991; GUIDANCE, 2001).

3. Precisão

A precisão de uma técnica analítica define-se como sendo o grau de concordância entre os valores de uma série repetida de ensaios analíticos efectuados sobre uma amostra homogênea. Este parâmetro constitui uma verdadeira medida da dispersão dos valores analíticos em redor da sua média (CALPENA CAMPANY *et al.*, 1990; JENKE, 1996b).

Para a avaliação da precisão da técnica analítica, consideraram-se os mesmos valores de resposta utilizados na elaboração das rectas de calibração para o estudo da linearidade. Assim, apesar das recomendações internacionais indicarem um mínimo de três níveis de concentração, que devem ser representativos da gama completa da recta de calibração, para a avaliação deste parâmetro (SHAH *et al.*, 1991), a precisão foi estudada em seis níveis de concentração, na técnica que utiliza como matriz o plasma, e em cinco níveis, na técnica que utiliza o homogeneizado de cérebro. Para o estudo da repetibilidade da técnica – precisão apresentada pela técnica, quando efectuada nas mesmas condições, numa série repetida de ensaios – utilizaram-se os resultados das cinco determinações de cada padrão de calibração efectuadas no mesmo dia. Para o estudo da precisão interdia, utilizaram-se os resultados obtidos ao longo dos cinco dias de validação.

A precisão foi avaliada através do coeficiente de variação (CV) apresentado pelas respostas obtidas para um mesmo nível de concentração:

$$CV(\%) = (\text{desvio-padrão} / \text{média}) \cdot 100$$

As recomendações internacionais para a validação de técnicas analíticas em matrizes biológicas referem um valor máximo de 15% para o coeficiente de variação em qualquer dos níveis de concentração considerados, com excepção do limite de quantificação, que pode atingir um valor de 20% (SHAH *et al.*, 1991).

4. Exactidão

A exactidão de uma técnica analítica define-se como sendo a capacidade dessa técnica de dar resultados o mais próximo possíveis do valor verdadeiro ou de referência (CALPENA CAMPANY *et al.*, 1990; JENKE, 1996b).

Para a avaliação da exactidão da técnica analítica, consideraram-se os mesmos valores de concentração utilizados no estudo da linearidade. À semelhança do que se passa com a precisão, também neste caso as recomendações internacionais indicam um mínimo de três níveis de concentração, que devem ser representativos da gama completa da recta de calibração, para a avaliação deste parâmetro (SHAH *et al.*, 1991). No entanto, também aqui, o estudo fez-se em seis níveis de concentração, no caso do plasma, e em cinco níveis, no caso do homogeneizado de cérebro. Na avaliação da exactidão intradia, utilizaram-se os resultados das cinco determinações de cada padrão de calibração efectuadas no mesmo dia. Para o estudo da exactidão interdia, utilizaram-se os resultados obtidos ao longo dos cinco dias de validação.

A exactidão foi avaliada através do cálculo do *bias* ou viés, expresso por:

$$\text{Bias}(\%) = (C \text{ média} - C \text{ teórica}) / C \text{ teórica} \cdot 100$$

e foi comprovada através da realização de um teste *t* de *Student* emparelhado.

As recomendações internacionais para a validação de técnicas analíticas em matrizes biológicas referem um valor máximo de desvio entre a concentração média e a respectiva concentração teórica de 15% para cada nível de concentração considerado, com excepção do limite de quantificação, em que o desvio pode atingir um valor de 20% (SHAH *et al.*, 1991). A exactidão da técnica é comprovada pela existência de diferenças não

significativas entre as concentrações experimentais e as concentrações teóricas em cada nível de concentração (CALPENA CAMPBANY *et al.*, 1990).

5. Eficácia da extracção

A análise de amostras biológicas necessita, geralmente, de um acondicionamento prévio da amostra. Ora, porque essa preparação, mais ou menos complexa, é sempre causa de erro e de diminuição do rendimento da técnica, torna-se imprescindível medir, num processo de validação, a eficácia da técnica de preparação da amostra. No nosso caso, trata-se de medir a eficácia da extracção. Este parâmetro também é conhecido por *recuperação*, por ser uma medida do rendimento da técnica (MEHTA, 1989).

O estudo da eficácia da extracção, ou recuperação absoluta, consiste na comparação dos valores obtidos na análise dos padrões do analito, preparados na matriz biológica, com os valores obtidos na análise das respectivas soluções-padrão, preparadas em fase móvel. A resposta cromatográfica destas soluções é considerada como o 100% de recuperação. Este estudo também se estende à recuperação do padrão interno isoladamente (MEHTA, 1989; WIELING *et al.*, 1996).

Para a avaliação da eficácia da extracção da presente técnica realizaram-se estudos comparativos entre três níveis de concentração preparados na matriz biológica – 2,5, 5,0 e 15,0 mg/L em plasma e 1,0, 3,0 e 5,0 mg/L em homogeneizado de cérebro – e três padrões das concentrações correspondentes, que foram preparados em fase móvel. Cada padrão foi analisado cinco vezes e a comparação foi feita no mesmo dia. As soluções-padrão preparadas em fase móvel foram injectadas directamente no cromatógrafo, a partir de 1 ml de solução adicionada de 100 µl de uma solução de

padrão interno (40 mg/L no estudo do plasma e 20 mg/L no estudo do homogeneizado de cérebro). Para ser possível a comparação das respostas cromatográficas, os resíduos secos obtidos na extracção foram redissolvidos em 1100 µl de fase móvel.

A avaliação da eficácia da extracção fez-se através da seguinte expressão:

$$\text{Recuperação (\%)} = \text{resposta matriz biológica} / \text{resposta solução} \cdot 100$$

Os critérios de aceitação para este parâmetro referem que o seu valor médio deve ser superior a 75% e reprodutível; no entanto, são admissíveis valores superiores a 60%, desde que a sua reprodutibilidade seja considerável (MEHTA, 1989; GUIDANCE, 2001).

6. Sensibilidade, limite de detecção e limite de quantificação

A *sensibilidade* de um método relaciona-se com a variação mínima que é preciso impor à grandeza a medir (concentração) para se obter uma variação significativa do resultado da medição (resposta). A sensibilidade é, por conseguinte, definida pelo declive da recta de calibração, podendo por isso ser medida em qualquer ponto da recta (MEHTA, 1989; CALPENA CAMPBANY *et al.*, 1990).

O *limite de detecção* é definido como sendo a quantidade mais baixa de analito, presente numa amostra, que pode ser detectada mas não necessariamente quantificada (CALPENA CAMPBANY *et al.*, 1990; SHAH *et al.*, 1991; JENKE, 1996b).

O *limite de quantificação* define-se como sendo a quantidade mais baixa de analito, presente numa amostra, que pode ser determinada com precisão e exactidão aceitáveis, acima do ruído da linha de base (CALPENA CAMPBANY *et al.*, 1990; SHAH *et al.*, 1991; JENKE, 1996b).

O limite de detecção foi determinado, no presente protocolo, por via instrumental, através de diluições sucessivas do padrão mais baixo da recta de calibração. Colocando a tónica na variabilidade da resposta cromatográfica, foi considerada como limite de detecção aquela concentração para a qual o triplo do desvio-padrão das respostas cromatográficas foi superior à média dessas mesmas respostas, por a partir desse valor se considerar que o sinal não pode mais ser distinguido do ruído da linha de base (LANG e BOLTON, 1991; JENKE, 1996b).

O limite de quantificação foi considerado como sendo a menor concentração incluída na recta de calibração. Por exigências da própria técnica, o menor padrão deve apresentar um coeficiente de variação e um *bias* máximos de 20% para ser aceite na recta. Por outro lado, abaixo desse padrão não se quantifica, normalmente, o analito. Estas exigências estão de acordo com a definição de limite de quantificação referida anteriormente (SHAH *et al.*, 1991).

7. Estabilidade

A estabilidade de um fármaco numa matriz biológica é função das condições de armazenamento, das propriedades químicas da substância, das características da matriz e do próprio sistema onde a amostra se encontra acondicionada (GUIDANCE, 2001). As orientações internacionais recomendam, entre outros, o estudo da estabilidade do analito na matriz durante o período de armazenamento da amostra (SHAH *et al.*, 1991).

Os padrões de lamotrigina para o estudo da estabilidade – 2,5 mg/L e 10,0 mg/L em plasma e 3,0 mg/L em homogeneizado de cérebro – foram preparados nas matrizes biológicas respectivas, analisados cinco vezes nesse mesmo dia (dia zero) e divididos em

aliquotas, algumas delas para armazenamento no frigorífico (4° C) e as restantes para armazenamento no congelador (-25° C). A avaliação foi feita através de cinco determinações de cada padrão em dias predefinidos. Tendo em consideração a aplicabilidade da técnica do plasma à prática clínica e, simultaneamente, a maior quantidade desta matriz biológica disponível para a preparação dos padrões, o estudo da estabilidade da lamotrigina no plasma foi realizado, no frigorífico, ao longo de onze dias e, no congelador, durante mês e meio. O protocolo experimental e a menor disponibilidade de homogeneizado de cérebro de rato para a preparação de padrões levou a que o estudo da estabilidade da lamotrigina nesta matriz biológica se processasse apenas durante sete dias no frigorífico e num período de quatorze dias no congelador. Em qualquer das situações, a estabilidade foi avaliada através do cálculo da razão entre as respostas cromatográficas da amostra armazenada e as respostas obtidas no dia zero, que foram consideradas como referência. O intervalo de confiança a 90%, relativamente a essas mesmas razões, foi também determinado (HOOPER, 1995).

Os critérios de aceitação adoptados no presente estudo reconhecem uma situação de estabilidade quando as razões calculadas se situam entre 90% e 110% e quando os respectivos intervalos de confiança a 90% se encontram entre 80% e 120% (HOOPER, 1995).

2. DESENHO EXPERIMENTAL

Para a concretização dos objectivos propostos neste trabalho que se referem à caracterização neurofarmacocinética da lamotrigina, procedeu-se ao estudo da cinética plasmática e cerebral da lamotrigina em ratos, após administração intraperitoneal (i.p.) do fármaco em dose única.

Animais

Utilizámos nas experiências ratos Wistar adultos, machos, com peso compreendido entre 250 e 320 gramas. Os animais foram alojados em armários-biotério com ciclos de luz-obscuridade de 12 horas, temperatura de 22-23° C, e sistemas de humidade e ventilação adequados. Não foi condicionado o acesso dos animais à água e aos alimentos durante o período de alojamento (PORTARIA 1005/92).

Administração do fármaco

A administração da lamotrigina foi sempre realizada em dose única por via intraperitoneal.

Anestesia

Cerca de 10 minutos antes do tempo fixado para a colheita das amostras, os animais foram anestesiados com uma solução de cetamina (7,7 mg/kg) e clorpromazina (2,3 mg/kg), administrada por via intramuscular.

Recolha das amostras

A obtenção das amostras de plasma e cérebro ocorreu a tempos predeterminados, contados a partir do momento da administração da lamotrigina. Cada animal foi utilizado apenas para uma colheita.

O sangue (cerca de 4-5 ml) foi recolhido por punção cardíaca aberta para um tubo previamente acondicionado com o anticoagulante citrato. Seguidamente, foi submetido a centrifugação (4500 rotações/min, a 15° C) para separação do plasma.

Logo após a recolha do sangue, o animal foi decapitado e o cérebro foi imediatamente removido. Depois de devidamente pesado, o cérebro foi homogeneizado com 5 ml de tampão fosfato (pH= 7,4) por cada grama de tecido cerebral. A homogeneização ocorreu em banho de gelo com o homogeneizador preseleccionado para 300 rotações/min. Nas experiências em que o cérebro foi subdividido em diversas regiões, o procedimento de homogeneização realizou-se de forma semelhante.

As amostras de plasma e de homogeneizado de cérebro, divididas em alíquotas, foram congeladas de imediato a -25° C, tendo assim permanecido até ao momento da quantificação da lamotrigina.

Análise das amostras

Em cada amostra de plasma e homogeneizado de cérebro de rato foi feita a quantificação da lamotrigina pela técnica de HPLC descrita.

As amostras de plasma e de homogeneizado de cérebro foram analisadas em dias separados, para evitar contaminações do sistema e otimizar o tempo de trabalho. Em cada dia foi preparada uma recta de calibração, através da qual foi possível determinar as concentrações de lamotrigina nas amostras por interpolação das respostas cromatográficas obtidas nesse dia.

As rectas de calibração foram aceites ou rejeitadas de acordo com vários parâmetros. Assim, foram analisadas no seu coeficiente de correlação, no desvio dos valores experimentais em relação aos valores nominais, e no desvio dos valores experimentais em relação aos valores da recta obtida no ensaio interdia da validação. As rectas que apresentaram coeficientes de correlação inferiores a 0,98, ou desvios superiores a 15% ou 20% (limite de quantificação), ou ainda que se desviaram da recta da validação em mais de 20% foram rejeitadas, tendo-se preparado outra recta para a quantificação da lamotrigina nesse dia.

2.1. Selecção da formulação mais adequada para a administração da lamotrigina

Atendendo à influência que a formulação administrada pode ter na biodisponibilidade do fármaco, realizámos ensaios preliminares com três formulações diferentes de lamotrigina, a fim de procedermos à selecção da formulação mais adequada à prossecução dos estudos cinéticos (CASTEL-BRANCO *et al.*, 2002a):

1. *Lamotrigina suspensa em metilcelulose a 0,25% (em água destilada);*
2. *Lamotrigina dissolvida em propilenoglicol a 50% (em água destilada);*
3. *Isotionato de lamotrigina dissolvido em água destilada.*

Os animais foram divididos em três grupos de 30 ratos cada. A cada grupo foi administrada, pela manhã, uma formulação diferente. A administração do fármaco foi feita, em qualquer das situações, por via intraperitoneal, na dose de 10 mg/kg.

A recolha de amostras de plasma e de cérebro ocorreu aos seguintes tempos de amostragem: 15 e 30 minutos, 2, 12, 24 e 48 horas após a administração do fármaco. Foram utilizados, a cada tempo de amostragem, subgrupos de 5 animais.

2.2. Caracterização da cinética plasmática e cerebral da lamotrigina

Após a escolha da formulação mais adequada para a administração da lamotrigina aos ratos, procedemos à caracterização da cinética do fármaco no plasma e no cérebro dos animais.

Os ratos foram divididos em três grupos de 45 animais cada. A cada grupo foi administrada, pela manhã, lamotrigina na dose de 5, 10 ou 20 mg/kg, por via intraperitoneal.

A recolha de amostras de plasma e de cérebro ocorreu aos seguintes tempos de amostragem: 7,5, 15 e 30 minutos, 2, 12, 24, 48, 72 e 120 horas após a administração do fármaco. Foram utilizados subgrupos de 5 animais a cada tempo de amostragem.

2.3. Caracterização da distribuição cerebral da lamotrigina

Sabendo que a acção terapêutica dos antiepilépticos pode ser parcialmente avaliada pelo seu perfil de distribuição cerebral (MONACO e SECHI, 1991), procedemos ainda à caracterização da distribuição da lamotrigina no cérebro dos ratos, através da quantificação do fármaco em diversas regiões cerebrais (CASTEL-BRANCO *et al.*, 2002b).

A um grupo de 30 ratos foi administrada lamotrigina, pela manhã, por via intraperitoneal, na dose de 10 mg/kg.

O procedimento de recolha de amostras foi idêntico ao referido anteriormente, ocorrendo aos seguintes tempos de amostragem: 12, 24 e 48 horas após a administração do fármaco. Foram utilizados, a cada tempo de amostragem, subgrupos de 10 animais.

Após a remoção do cérebro, este foi imediatamente colocado numa placa sobre gelo e subdividido em cinco regiões: córtex frontal, córtex restante, cerebelo, estriado e hipocampo. Devido ao facto de algumas destas fracções serem de pequena dimensão e não atingirem a quantidade mínima necessária para a execução da técnica analítica, procedeu-se à junção das fracções respectivas de cada subgrupo de 10 ratos utilizado a cada tempo de amostragem. Deste modo obtiveram-se, a cada tempo de amostragem, cinco grandes regiões cerebrais, tendo cada uma sido posteriormente analisada como se de uma única amostra se tratasse.

Substâncias-padrão

<i>Lamotrigina</i> <i>BW430C78</i>	3,5-diamino-6-(2,3-diclorofenil)-1,2,4-triazina $C_9H_7Cl_2N_5$	<i>Wellcome</i> <i>Research</i> <i>Laboratories</i> <i>(U. K.)</i>
<i>Isotonato de</i> <i>lamotrigina</i>	2-hidroxietanosulfonato de 3,5-diamino-6-(2,3-diclorofenil)-1,2,4-triazina $C_9H_7Cl_2N_5C_2H_6O_4S$	
<i>Padrão interno</i> <i>BW725C78</i>	3,5-diamino-6-(2-metoxifenil)-1,2,4-triazina $C_{10}H_{11}N_5O$	

Fármacos

<i>Cetamina</i>	Hidrocloreto de 2-(<i>o</i> -clorofenil)-2-(metilamino)-ciclohexanona $C_{13}H_{16}ClNO$	<i>Laboratórios Pfizer</i> ®
<i>Clorpromazina</i>	2-cloro-10-(3-dimetilaminopropil)-fenotiazina $C_{17}H_{19}ClN_2S$	<i>Laboratórios Vitória</i> ®

Reagentes

Acetato de etilo	C ₄ H ₈ O ₂	<i>pro analysis</i>	Merck®
Ácido tricloroacético	C ₂ HCl ₃ O ₂	<i>pro analysis</i>	Merck®
Água destilada e desionizada	H ₂ O	preparada no laboratório	
Cloreto de sódio	NaCl	<i>pro analysis</i>	Merck®
Dihidrogenofosfato de potássio	KH ₂ PO ₄	<i>pro analysis</i>	Merck®
Dihidrogenofosfato de sódio dihidratado	NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	puro	Merck®
Hidrogenofosfato de sódio dihidratado	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	<i>pro analysis</i>	Merck®
Hidróxido de sódio	NaOH	<i>pro analysis</i>	Merck®
Metanol	CH ₃ OH	<i>pro analysis</i>	Merck®
Metanol grau gradiente	CH ₃ OH	para cromatografia	Merck®
Metilcelulose	CH ₃ O(C ₆ H ₁₀ O ₅) _n		Merck®
Propilenoglicol	C ₃ H ₈ O ₂		Merck®
Trietilamina	C ₆ H ₁₅ N	para síntese, <i>pro analysis</i>	Merck®

Matrizes biológicas

Plasma humano	gentilmente cedido pelo banco de sangue do Instituto Português de Oncologia de Coimbra
Plasma de rato	obtido em tubo com citrato a partir de sangue de rato
Homogeneizado de cérebro de rato	5 ml tampão fosfato pH 7,4 / g (cérebro)

3. ANÁLISE FARMACOCINÉTICA

3.1. Análise cinética da lamotrigina no plasma e no cérebro

Tendo por objectivo último a caracterização neurofarmacocinética da lamotrigina em ratos, procurámos, numa primeira fase, estudar o comportamento cinético do fármaco na circulação sistémica, local onde chega em primeiro lugar após ser administrado ao animal e a partir do qual consegue aceder ao sistema nervoso central, desencadeando a consequente resposta farmacológica. Num segundo momento, procedemos ao estudo do comportamento cinético do fármaco no cérebro.

3.1.1. Estudo da relação entre a dose administrada e os níveis de lamotrigina obtidos

A avaliação do efeito da dose nos níveis plasmáticos e cerebrais de lamotrigina – medidos após administração intraperitoneal do fármaco, em dose única de 5, 10 e 20 mg/kg – foi realizada mediante vários processos, que se passam a enunciar:

1. Determinação do tipo e do grau de dependência entre dose e níveis obtidos, através de uma análise de regressão, com o cálculo do respectivo coeficiente de determinação (r^2), entre (PECK, 1991; GARCÍA SÁNCHEZ, 1997; YAMASHITA *et al.*, 1997; DOHENY *et al.*, 1999):

1.1. dose administrada e área sob a curva de concentrações em função do tempo;

1.2. dose administrada e concentração média máxima;

1.3. dose administrada e concentração média a cada tempo de amostragem;

1.4. os perfis de concentrações médias em função do tempo, após a fase inicial de incorporação do fármaco.

2. Medida da dispersão, através do cálculo do coeficiente de variação, dos valores de área sob a curva normalizados pela dose (GARCÍA SÁNCHEZ, 1997; WALKER *et al.*, 2000).

3. Análise de variância, para um grau de significância de 0,05, das concentrações normalizadas pela dose, a cada tempo de amostragem (GARCÍA SÁNCHEZ, 1997).

3.1.2. Análise compartimental

Após a administração extravasal de um dado fármaco, a curva de concentrações plasmáticas em função do tempo pode ser descrita pela seguinte equação poliexponencial:

$$C_t = \sum_{i=1}^n A_i \cdot e^{\lambda_i \cdot t} \quad \text{(equação 1)}$$

em que C_t representa a concentração do fármaco ao tempo t (variável dependente), t representa o tempo (variável independente), A_i e λ_i são, respectivamente, o coeficiente e o expoente do termo exponencial i , e n corresponde ao número de exponenciais consideradas.

Quando a curva de concentrações plasmáticas em função do tempo corresponde à diferença entre uma exponencial descendente e uma exponencial ascendente, a equação passa a escrever-se da seguinte forma:

$$C_t = A_1 \cdot e^{-\lambda_1 \cdot t} - A_2 \cdot e^{-\lambda_2 \cdot t} \quad \text{(equação 2)}$$

onde A_1 é a ordenada na origem correspondente à exponencial descendente, λ_1 é a constante de velocidade do termo descendente, A_2 é a ordenada na origem correspondente à exponencial ascendente, e λ_2 é a constante de velocidade do termo ascendente.

Atendendo ao facto de que, após administração intraperitoneal, a absorção através do peritoneu do rato se faz de forma bastante rápida, não é considerada a existência de um período de latência, pelo que A_1 e A_2 são valores coincidentes, transformando a equação anterior na seguinte:

$$C_t = A_1 \cdot (e^{\lambda_1 \cdot t} - e^{-\lambda_2 \cdot t}) \quad \text{(equação 3)}$$

A abordagem matemática apresentada corresponde ao modelo cinético monocompartimental extravasal aberto, onde o organismo é visto como um compartimento único, no qual o fármaco, após a sua administração, se distribui de forma homogénea, sendo eliminado de acordo com uma cinética de primeira ordem, conforme esquematizado na figura M.5.

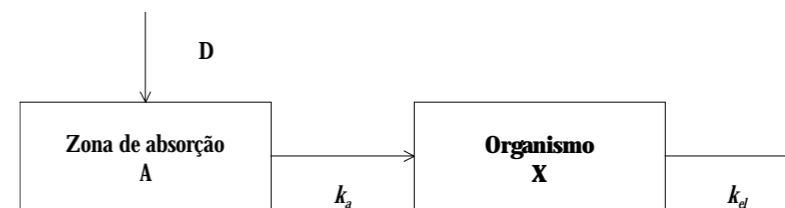


Figura M.5. Modelo cinético monocompartimental extravasal.

Segundo este modelo, a variação da quantidade de fármaco no organismo em função do tempo (dX/dt) resulta do ganho instantâneo de fármaco por absorção e da sua perda instantânea por eliminação, que se expressa pela equação diferencial:

$$dX/dt = k_a \cdot A - k_{el} \cdot X \quad \text{(equação 4)}$$

em que A e X representam, respectivamente, as quantidades de fármaco no compartimento externo e no organismo, e k_a e k_{el} representam, respectivamente, as constantes aparentes de velocidade de absorção e de eliminação do fármaco. A mesma equação pode ser expressa em termos de concentração:

$$dC/dt = k_a/V_d \cdot A - k_{el} \cdot X \quad \text{(equação 5)}$$

onde V_d representa o volume de distribuição do fármaco.

A integração desta equação origina a expressão matemática que permite estimar o valor da concentração do fármaco no organismo a qualquer tempo considerado:

$$C_t = F \cdot D / V_d \cdot k_a / (k_a - k_{el}) \cdot (e^{-k_{el} \cdot t} - e^{-k_a \cdot t}) \quad \text{(equação 6)}$$

em que F representa a biodisponibilidade, em magnitude, da formulação utilizada, e D a dose administrada.

Esta função matemática, simplificada, torna-se equivalente à equação 3 anteriormente referida:

$$C_t = C^0 \cdot (e^{-k_{el} \cdot t} - e^{-k_a \cdot t}) \quad \text{(equação 7)}$$

onde C^0 é a ordenada na origem das duas exponenciais consideradas.

Para uma análise cinética compartimental, os níveis plasmáticos foram ajustados a uma equação exponencial, utilizando-se um programa de regressão não-linear (MULTI[®]) (YAMAOKA *et al.*, 1981). Os dados médios obtidos nos animais, ao longo de 120 horas após administração de cada dose, foram ajustados a uma equação biexponencial e a uma equação triexponencial. A selecção do melhor modelo foi feita com base no critério de Akaike (AIC – *Akaike's information criterion*), segundo o qual a equação com menor valor de AIC é considerada como a melhor representação dos gráficos de concentração em função do tempo (YAMAOKA, NAKAGAWA e UNO, 1978a; YAMAOKA *et al.*, 1981). Para a avaliação da qualidade do ajuste recorreu-se à análise gráfica dos resultados obtidos e à utilização de critérios estatísticos, como sejam o erro de estimação dos parâmetros e a análise da soma ponderada dos quadrados. Nesta análise, utilizou-se o factor de ponderação $1/C^2$, atendendo ao facto de o erro residual da técnica analítica apresentar um coeficiente de variação constante.

Assim, a partir do coeficiente (A_i) e dos expoentes (λ_1 e λ_2) estimados, e utilizando as equações próprias deste modelo, calcularam-se os seguintes parâmetros farmacocinéticos (DOMÉNECH BERROZPE, MARTÍNEZ LANA O e PLÁ DELFINA, 1997):

$t_{1/2el}$	= tempo de semivida de eliminação	= $\ln 2 / k_{el}$
$t_{1/2a}$	= tempo de semivida de absorção	= $\ln 2 / k_a$
AUC	= área sob a curva de concentrações em função do tempo	= $C^0 \cdot (1 / k_{el} - 1 / k_a)$
$t_{máx}$	= tempo a que se alcança a concentração máxima	= $1 / (k_a - k_{el}) \cdot \ln (k_a / k_{el})$
$C_{máx}$	= concentração máxima	= $C^0 \cdot (e^{-k_{el} \cdot t_{máx}} - e^{-k_a \cdot t_{máx}})$

V_d	= volume de distribuição	= $dose / C^0$
CL	= <i>clearance</i> (depuração)	= $dose / AUC$
TMR	= tempo médio de residência	= $1/k_o + 1/k_d$

Também os valores das concentrações cerebrais medidas foram submetidos a uma análise exponencial, tendo sido ajustados, tal como os níveis plasmáticos, com equações biexponenciais. A análise compartimental propriamente dita envolveu o ajuste simultâneo dos níveis plasmáticos e cerebrais, como se refere mais adiante.

3.1.3. Análise não-compartimental

A análise cinética não-compartimental consiste num determinado tratamento dos dados experimentais que permite estimar os parâmetros farmacocinéticos sem necessidade de os ajustar a um modelo determinístico.

A caracterização do comportamento cinético do fármaco faz-se, nesta análise independente do modelo, recorrendo à aplicação da teoria dos momentos estatísticos, segundo uma filosofia estocástica (YAMAOKA, NAKAGAWA e UNO, 1978b; VENG-PEDERSEN, 1991; DOMENECH BERROZPE e LAUROBA VILADROSA, 1997). Tal abordagem assume, por um lado, que o movimento individual das moléculas do fármaco através do organismo é aleatório, pelo que os tempos de residência das moléculas de fármaco no sistema biológico podem expressar-se através de uma curva de distribuição normal, com uma determinada média e a respectiva variância. Por outro lado, este tratamento farmacocinético assume que a

disposição do fármaco é um processo cinético de primeira ordem, independentemente do modelo farmacocinético que se poderia ajustar numa análise compartimental.

Em farmacocinética podem considerar-se três momentos estatísticos fundamentais: a área sob a curva de concentrações em função do tempo (momento de ordem zero), o tempo médio de residência (momento de ordem um) e a variância do tempo de residência (momento de ordem dois). Os momentos de ordem superior não implicam informação adicional e aumentam consideravelmente a complexidade matemática do sistema (YAMAOKA, NAKAGAWA e UNO, 1978b).

Na prática, a caracterização da distribuição do fármaco no equilíbrio é feita através da determinação do valor de área sob a curva e do tempo médio de residência, que se definem como sendo:

$$AUC = \int_0^{\infty} C \cdot dt \quad \text{(equação 8)}$$

$$TMR = \int_0^{\infty} t \cdot C \cdot dt / \int_0^{\infty} C \cdot dt = AUMC / AUC \quad \text{(equação 9)}$$

em que AUC é o valor da área sob a curva de concentrações em função do tempo, $AUMC$ é o valor da área sob a curva que se obtém ao relacionar, em papel milimétrico, $C.t$ com t , o que equivale a uma curva pseudonormal representativa de uma distribuição de frequência, e TMR é o tempo que, em média, uma molécula de fármaco permanece no organismo durante a sua passagem através dele sem se alterar.

Os momentos estatísticos constituem um método independente do modelo para a estimação de diversos parâmetros farmacocinéticos, entre os quais se destacam o tempo médio de residência, o volume de distribuição e a *clearance* no equilíbrio. A semivida de eliminação resulta, por sua vez, da suposição de que a curva de concentrações na fase

terminal corresponde a um processo monoexponencial. Os valores máximos de tempo e concentração considerados na análise não-compartimental são valores experimentais, correspondendo à amostra que apresenta o nível de fármaco mais elevado.

Com vista à caracterização da passagem da lamotrigina através do organismo, realizou-se, a partir dos dados plasmáticos obtidos, uma análise cinética não-compartimental, ou independente do modelo, utilizando o programa WINNONLIN[®] (WINNONLIN VERSION 1.1, 1996), donde resultou a estimação dos parâmetros farmacocinéticos respectivos (DOMÉNECH BERROZPE, MARTÍNEZ LANAO e PLÁ DELFINA, 1997). À semelhança do estudo realizado com os dados plasmáticos, também os valores das concentrações cerebrais foram submetidos a uma análise cinética não-compartimental.

3.2. Análise cinética da distribuição da lamotrigina entre o plasma e o cérebro

A distribuição é o processo mediante o qual o fármaco, uma vez incorporado na circulação sistémica, acede aos diferentes órgãos e fluidos corporais (MARTÍNEZ LANAO, 1987). Para fármacos antiepilépticos, como é o caso da lamotrigina, o processo de transferência do fármaco entre o plasma e o cérebro reveste-se de particular importância, já que a sua presença no cérebro é essencial para que se desencadeie a acção farmacológica. Assim, para além da caracterização isolada das cinéticas da lamotrigina no plasma e no cérebro, anteriormente referidas, procedemos à caracterização da cinética de distribuição da lamotrigina entre a circulação sistémica e o sistema nervoso central.

3.2.1. Estudo da relação entre níveis plasmáticos e níveis cerebrais correspondentes

Numa primeira abordagem, procurámos caracterizar a relação entre as concentrações de lamotrigina no plasma e os níveis atingidos no cérebro aos mesmos tempos de amostragem. Este estudo foi realizado por dois processos diferentes:

1. Determinação do tipo e do grau de dependência entre níveis plasmáticos e níveis cerebrais, através de uma análise de regressão, com o cálculo do respectivo coeficiente de determinação (r^2). A análise de regressão foi realizada entre os perfis de concentrações médias plasmáticas e cerebrais obtidos em função do tempo para cada uma das doses administradas (ADUSUMALLI *et al.*, 1993);
2. Cálculo das razões entre os valores medidos das concentrações cerebral e plasmática correspondentes, para cada dose administrada, com avaliação da sua dependência com a dose e com o tempo por análise de variância (ADUSUMALLI *et al.*, 1993; DOHENY *et al.*, 1999).

3.2.2. Análise compartimental

A filosofia de análise compartimental aplicada a este estudo de distribuição da lamotrigina entre o plasma e o cérebro consiste em considerar o cérebro como um elemento do compartimento periférico, ou seja, como um subcompartimento que procede a trocas de fármaco directamente com o compartimento central mediante constantes de primeira ordem (NOE e KUMOR, 1983). O esquema deste modelo compartimental, que considera o subcompartimento cerebral, encontra-se representado na figura M.6.

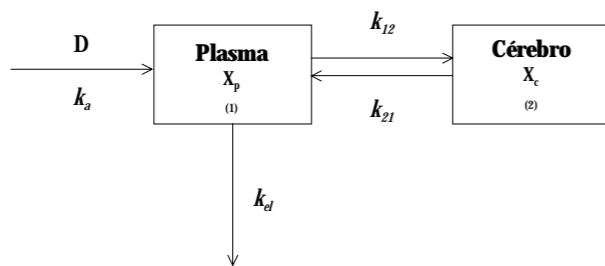


Figura M.6 Modelo cinético compartimental extravasal que considera o subcompartimento cerebral.

De acordo com este modelo, a variação da quantidade de fármaco no cérebro em função do tempo pode expressar-se pela seguinte equação diferencial:

$$dX_c/dt = k_{12} \cdot X_p - k_{21} \cdot X_c \quad \text{(equação 10)}$$

em que X_p e X_c representam, respectivamente, as quantidades de fármaco livre no plasma e no cérebro, e k_{12} e k_{21} representam as microconstantes de transferência de primeira ordem de fármaco livre entre os dois compartimentos.

A mesma equação pode ser expressa em termos de concentração:

$$dC_c/dt = k_{12} \cdot (V_p/V_c) \cdot C_p - k_{21} \cdot C_c \quad \text{(equação 11)}$$

em que V_p e V_c representam, respectivamente, os volumes de distribuição dos compartimentos plasmático e cerebral.

Considera-se, por sua vez, como já foi referido, que a concentração plasmática se pode expressar mediante a seguinte equação poliexponencial:

$$C_t = \sum_{i=1}^n A_i \cdot e^{-\lambda_i \cdot t} \quad \text{(equação 1)}$$

em que C_t representa a concentração plasmática do fármaco ao tempo t , A_i e λ_i são, respectivamente, o coeficiente e o expoente do termo exponencial i , e n corresponde ao número de exponenciais consideradas.

A combinação da equação 11 com a equação 1, mediante o uso das transformadas de Laplace, permite obter a seguinte equação integrada:

$$C_t = V_p/V_c \cdot \sum_{i=1}^n k_{12}/(k_{21} - \lambda_i) \cdot A_i \cdot (e^{-\lambda_i \cdot t} - e^{-k_{21} \cdot t}) \quad \text{(equação 12)}$$

De acordo com este modelo, e em situação de equilíbrio, pode escrever-se que:

$$V_p/V_c \cdot k_{12}/k_{21} = R \quad \text{(equação 13)}$$

onde R representa o coeficiente de partilha cérebro/plasma.

Procedeu-se, deste modo, através da utilização de um programa de regressão não-linear (MULTI[®]), à caracterização da distribuição da lamotrigina entre o plasma e o cérebro, estimando as microconstantes de transferência do fármaco no tecido considerado através do ajuste, em simultâneo, dos dados obtidos nestes dois tecidos a um sistema de duas equações assim definido:

$$C_p = A_1 \cdot (e^{-\lambda_1 \cdot t} - e^{-\lambda_2 \cdot t}) \quad \text{(equação 3)}$$

$$C_c = V_p/V_c \cdot k_{12} \cdot ((A_1 \cdot e^{-\lambda_1 \cdot t}/(k_{21} - \lambda_1)) - (A_1 \cdot e^{-\lambda_2 \cdot t}/(k_{21} - \lambda_2)) - ((A_1/(k_{21} - \lambda_1)) - (A_1/(k_{21} - \lambda_2))) \cdot e^{-k_{21} \cdot t}) \quad \text{(equação 14)}$$

em que C_p e C_c representam, respectivamente, as concentrações plasmática e cerebral ao tempo t , A_1 é a ordenada na origem das exponenciais da curva plasmática, λ_1 e λ_2 representam, respectivamente, as constantes de velocidade dos termos descendente e ascendente da curva plasmática, k_{12} representa a microconstante de transferência de

primeira ordem do compartimento plasmático para o compartimento tecidual, k_{21} representa a microconstante de transferência no sentido inverso, e V_p e V_c representam, respectivamente, os volumes de distribuição dos compartimentos plasmático e cerebral. Para a avaliação da qualidade do ajuste recorreu-se, de modo idêntico ao utilizado na análise dos dados plasmáticos, à utilização de critérios estatísticos, como sejam o erro de estimação dos parâmetros e a análise da soma ponderada dos quadrados (com o factor de ponderação $1/C^2$).

Assim, a partir das estimadas finais de A_1 , λ_1 , λ_2 , k_{12} e k_{21} , e utilizando as equações próprias deste modelo, calcularam-se os parâmetros farmacocinéticos correspondentes ao modelo monocompartimental da curva de níveis plasmáticos, tal como foi anteriormente referido, e os seguintes parâmetros farmacocinéticos, correspondentes ao modelo compartimental de distribuição do fármaco no cérebro (DOMÉNECH BERROZPE, MARTÍNEZ LANA O e PLÁ DELFINA, 1997; FRAILE LAFUENTE, 2001):

CL/V	= clearance de distribuição normalizada com o volume cerebral	= $V_p / V_c \cdot k_{12}$
R	= coeficiente de partilha cérebro/plasma	= $V_p / V_c \cdot k_{12} / k_{21}$
K	= microconstante de transferência do cérebro para o plasma	= k_{21}
TMT	= tempo médio de trânsito na primeira passagem pelo cérebro	= $1 / k_{21}$

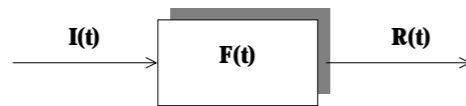
3.2.3. Análise não-compartimental

Tendo como objectivo a caracterização da distribuição tecidual de um dado fármaco, é também possível, muitas vezes, realizar uma análise cinética independente do modelo recorrendo a métodos de convolução/deconvolução.

Convolução/Deconvolução

A convolução e a deconvolução constituem métodos independentes do modelo de análise farmacocinética baseados na teoria dos sistemas lineares (CUTLER, 1978c; VENG-PEDERSEN, 1984). Para que se possam aplicar, é necessário que se cumpram duas condições: que a resposta produzida, quando se estimula o sistema, seja proporcional ao estímulo (linearidade do sistema); e que a resposta obtida, através da estimulação repetida do sistema, seja a soma das respostas parciais a cada estímulo (princípio da sobreposição).

Na análise farmacocinética de qualquer sistema linear, podem considerar-se três etapas: um primeiro momento de incorporação do fármaco no sistema, uma segunda fase de transferência do fármaco através do sistema, e um terceiro momento de resposta do sistema ao estímulo aplicado. Estas três etapas podem traduzir-se em três funções, conforme se esquematiza na figura M.7. Note-se que a função unitária de disposição também se pode denominar de função de transferência, de função de transporte, de função de resposta do sistema a um *input* unitário, sendo ainda conhecida por resposta característica.



I(t) = função de incorporação do fármaco no sistema
F(t) = função unitária de disposição (FUD)
R(t) = função de resposta do sistema

Figura M.7 Sistema farmacocinético linear.

A convolução é o método que, através do conhecimento das funções de incorporação e de transferência, permite determinar a função de resposta do sistema, segundo a seguinte equação:

$$R(t) = I(t) * F(t) \quad \text{(equação 15)}$$

em que * é o sinal da operação de convolução.

A deconvolução, sendo a operação inversa da convolução, permite caracterizar a função de incorporação ou a resposta característica do sistema, quando se conhecem as restantes funções:

$$I(t) = R(t) // F(t) \text{ ou } F(t) = R(t) // I(t) \quad \text{(equação 16)}$$

em que // é o sinal da operação de deconvolução.

O procedimento de convolução e de deconvolução algébricas mais usado baseia-se na utilização das transformadas de Laplace. Por este processo, a integral de convolução

$$R(t) = \int_0^t I(t) \cdot F(t-\tau) \cdot d\tau \quad \text{(equação 17)}$$

converte-se num produto algébrico das transformadas de Laplace das funções de incorporação e de transferência

$$R(s) = I(s) \cdot F(s) \quad \text{(equação 18)}$$

enquanto a deconvolução se converte num quociente entre a transformada da função de resposta e a transformada da função de transferência ou de incorporação

$$I(s) = R(s) / F(s) \text{ ou } F(s) = R(s) / I(s) \quad \text{(equação 19)}$$

Métodos de convolução e de deconvolução

Em farmacocinética experimental, utilizam-se normalmente métodos de convolução e de deconvolução numéricos, já que se parte de dados obtidos experimentalmente. Se esses dados experimentais são utilizados directamente, os métodos de convolução e de deconvolução denominam-se de *directos*; se esses dados são previamente ajustados a funções, normalmente poliexponenciais, e a convolução ou a deconvolução se aplicam sobre as funções ou os parâmetros das funções determinadas, denominam-se de *analíticos*.

Em estudos cinéticos, a resposta do sistema é, geralmente, determinada por via experimental. Consequentemente, aplicam-se com maior frequência métodos de deconvolução numérica, que procuram conhecer a função de incorporação ou a resposta característica do sistema.

Quando é aplicada a dados de distribuição tecidual de fármacos, a deconvolução numérica permite caracterizar a função unitária de disposição do fármaco no tecido ou no compartimento considerados. Contudo, em estudos de distribuição tecidual de fármacos, o

erro experimental é, geralmente, elevado, dada a grande dificuldade que muitas vezes existe na obtenção e manipulação das amostras, bem como na determinação analítica das mesmas. Um maior erro residual dos dados submetidos a deconvolução pode, por sua vez, comprometer os resultados, dada a grande sensibilidade dos métodos de deconvolução a este fenómeno. Compreende-se, pois, que sejam ainda escassos os trabalhos publicados sobre estudos experimentais de distribuição tecidual de fármacos que utilizam a convolução/deconvolução para caracterizar o comportamento tecidual do fármaco (KAROL, VENG-PEDERSEN e BRASHEAR, 1983; VEROTTA *et al.*, 1989; SZABO *et al.*, 1993; EBLING, WADA e STANSKI, 1994).

Existem diferentes métodos de deconvolução para caracterizar a função unitária de disposição no tecido considerado:

1. Deconvolução numérica directa entre os dados de concentração tecidual e plasmática (CUTLER, 1978a, 1978b e 1978c; VAUGHAN e DENNIS, 1978; MARTÍNEZ LANAO *et al.*, 1992; MADDEN *et al.*, 1996);
2. Deconvolução numérica analítica entre os parâmetros das funções matemáticas que definem as curvas de níveis teciduais e plasmáticos (VENG-PEDERSEN, 1980a, 1980b, 1980c e 1980d);
3. Deconvolução numérica indirecta mediante aproximação semiparamétrica e convolução combinadas com regressão não-linear (KAROL, VENG-PEDERSEN e BRASHEAR, 1983; VEROTTA *et al.*, 1989; YANO *et al.*, 1989).

A deconvolução numérica directa tem como principais inconvenientes uma grande sensibilidade aos erros experimentais dos dados e a necessidade de tempos de amostragem coincidentes para as funções de resposta e de disposição. Este método só se revela útil para dados com erro experimental mínimo.

A deconvolução numérica analítica, ao trabalhar com funções matemáticas e não directamente com os dados experimentais, elimina o problema dos erros, uma vez que estes são previamente considerados durante a análise de regressão. No entanto, só se revela eficaz se as funções estimadas tiverem bom carácter preditivo das concentrações em função do tempo, o que normalmente é difícil de se conseguir com os dados teciduais. Além disso, torna-se mais complexa, por exigir a utilização de programas informáticos específicos.

A deconvolução numérica indirecta mediante aproximação semiparamétrica e convolução combinadas com regressão não-linear revela-se o método de análise mais robusto na análise farmacocinética de dados de distribuição tecidual (FRAILE LAFUENTE, 2001). Por esse motivo, foi o método escolhido para a análise da distribuição cerebral da lamotrigina em ratos, pelo que se passa a descrever com mais pormenor.

Deconvolução numérica indirecta mediante aproximação semiparamétrica e convolução combinadas com regressão não-linear

A deconvolução numérica indirecta, que deriva da aproximação proposta por Cutler (1978a, 1978b e 1978c), associa os procedimentos de convolução/deconvolução à regressão não-linear ponderada, procurando, deste modo, minimizar o erro residual dos dados experimentais.

Neste método, a função incógnita – que, num processo de caracterização da distribuição tecidual de um dado fármaco, é a resposta característica ou função unitária de disposição – é definida por uma função matemática, normalmente uma exponencial. Os parâmetros desta função são obtidos por regressão não-linear a partir da comparação,

segundo o método dos mínimos quadrados ponderados, entre a resposta do sistema, gerada por convolução entre a função incógnita e a função de incorporação, e os dados teciduais experimentais.

Este método semiparamétrico, ao permitir combinar a eficácia da regressão não-linear ponderada no tratamento do erro residual com a inversão numérica da transformada de Laplace, simplifica a operação de convolução, ao convertê-la numa simples multiplicação entre funções transformadas, e permite estimar a resposta característica do sistema, utilizando directamente os dados de concentração tecidual. Este facto tem particular relevância, uma vez que os dados teciduais costumam ter um erro residual significativamente superior ao dos dados plasmáticos, o que dificulta a estimação, com precisão adequada, dos parâmetros correspondentes à curva poliexponencial do tecido. Pelo contrário, os dados plasmáticos são facilmente ajustáveis por métodos de regressão não-linear, comportando-se a poliexponencial daí resultante como função de incorporação do fármaco no sistema.

Base teórica da deconvolução

Considerando, tal como na análise compartimental, que a transferência de um fármaco do plasma para um tecido se faz por difusão passiva e que unicamente se transfere o fármaco que se encontra na forma livre, a velocidade de incorporação do fármaco no tecido em situação de não-equilíbrio é proporcional à diferença de concentrações de fármaco livre no plasma e no tecido, de acordo com a equação (KAROL, VENG-PEDERSEN e BRASHEAR, 1983):

$$dX_T/dt = k \cdot (f_p \cdot C_p - f_T \cdot C_T) \quad \text{(equação 20)}$$

em que X_T é a quantidade total de fármaco no tecido ao tempo t , C_p e C_T são, respectivamente, as concentrações plasmática e tecidual, f_p e f_T correspondem às fracções livres de fármaco, respectivamente, no plasma e no tecido, e k é uma constante de proporcionalidade.

A equação anterior pode ser convertida na seguinte, em termos de concentrações:

$$dC_T/dt = k/V_T \cdot (f_p \cdot C_p - f_T \cdot C_T) \quad \text{(equação 21)}$$

em que V_T representa o volume tecidual.

Reagrupando:

$$dC_T/dt = k \cdot f_T/V_T \cdot (f_p/f_T \cdot C_p - C_T) \quad \text{(equação 22)}$$

e simplificando:

$$dC_T/dt = K \cdot (F \cdot C_p - C_T) \quad \text{(equação 23)}$$

com $K = k \cdot f_T/V_T$ e $F = f_p/f_T$.

Considerando o sistema linear e invariante no tempo, através da aplicação das transformadas de Laplace, obtém-se:

$$sC_T(s) - C_T(0) = K \cdot [F \cdot C_p(s) - C_T(s)] \quad \text{(equação 24)}$$

em que s é o operador de Laplace.

Aplicando a propriedade convolutiva da transformada de Laplace, a expressão anterior reduz-se a:

$$C_T(s) = F \cdot K / (s + K) \cdot C_p(s) \quad \text{(equação 25)}$$

A antitransformada de Laplace desta expressão gera a integral de convolução, em que este sistema adopta a seguinte expressão:

$$C_T = \int_0^t F \cdot K \cdot e^{-k \cdot t} \cdot C_p(t) \cdot d\tau \quad (\text{equação 26})$$

que é equivalente às expressões:

$$C_T = F \cdot K \cdot e^{-k \cdot t} * C_p \quad (\text{equação 27})$$

$$C_T // C_p = F \cdot K \cdot e^{-k \cdot t} \quad (\text{equação 28})$$

Deste modo, a curva de níveis teciduais (C_T) de um fármaco cuja farmacocinética obedece a um comportamento linear pode considerar-se como sendo a convolução entre a função de incorporação do fármaco no tecido considerado, dada pela curva plasmática (C_p), e a resposta característica ou função unitária de disposição do fármaco dentro do tecido ($FK \cdot e^{-k \cdot t}$).

De um ponto de vista fisiológico, considerando um tecido sem capacidade de eliminação e uma distribuição limitada pelo fluxo sanguíneo, o balanço de massa pode expressar-se do seguinte modo (CHEN e GROSS, 1979):

$$dX_T/dt = Q \cdot C_p - Q \cdot C_T/R \quad (\text{equação 29})$$

em que Q representa o fluxo sanguíneo regional e R o coeficiente de partilha em situação de equilíbrio.

Por comparação entre a equação 29 e a equação 20, vem que:

$$Q = k \cdot f_p \quad (\text{equação 30})$$

e que:

$$Q/R = k \cdot f_T \Leftrightarrow Q = k \cdot R \cdot f_T \quad (\text{equação 31})$$

Daqui resulta que o coeficiente de partilha (R), em situação de equilíbrio, se pode definir como sendo o quociente entre a fracção livre do fármaco, respectivamente, no plasma e no tecido:

$$R = f_p / f_T \quad (\text{equação 32})$$

Em consequência, a equação 29 pode ser reescrita como:

$$C_T = Q / V_T \cdot e^{-(Q/V_T/R) \cdot t} * C_p \quad (\text{equação 33})$$

De um ponto de vista compartimental, considerando um tecido sem capacidade de eliminação e uma distribuição do tipo mamilar, o fluxo (Q) pode aproximar-se à *clearance* de distribuição (CL), obtendo-se a seguinte expressão:

$$C_T = CL / V_T \cdot e^{-(CL/V_T/R) \cdot t} * C_p \quad (\text{equação 34})$$

A deconvolução realiza-se entre concentrações teciduais e concentrações plasmáticas, e a função unitária de disposição, que se refere ao trânsito do fármaco numa primeira passagem pelo tecido, vem normalizada pela *clearance* de distribuição, segundo a equação:

$$FUD = C_T // C_p = CL / V_T \cdot e^{-(CL/V_T/R) \cdot t} \quad (\text{equação 35})$$

De acordo com esta expressão, utilizando dados de concentração de fármaco no tecido em situação de não-equilíbrio, torna-se possível otimizar dois parâmetros fundamentais de distribuição: a *clearance* de distribuição normalizada pelo volume tecidual (CL/V_T) e o coeficiente de partilha tecido/plasma em situação de equilíbrio (R).

Tendo como objectivo a caracterização da distribuição da lamotrigina do plasma para o cérebro, realizámos também uma análise cinética não-compartimental, ou seja, independente do modelo, mediante aproximação semiparamétrica e convolução combinadas com regressão não-linear (deconvolução numérica indirecta), através do programa MULTI(FILT)[®] (YANO *et al.*, 1989). Introduzindo a biexponencial da curva plasmática determinada previamente por regressão não-linear e utilizando um factor de ponderação equivalente ao inverso do quadrado da concentração cerebral da lamotrigina determinada experimentalmente, optimizaram-se os parâmetros da função unitária de disposição, CL/V_T e R . A partir deles, calcularam-se os restantes parâmetros farmacocinéticos de caracterização do processo de distribuição plasma-cérebro.

IV. RESULTADOS

1. TÉCNICA ANALÍTICA

Apresentam-se, em seguida, os resultados dos ensaios realizados durante a validação da técnica de HPLC para a quantificação de lamotrigina em plasma e cérebro de rato.

A figura R.1 representa dois cromatogramas de padrões de lamotrigina, que foram preparados em plasma humano e em homogeneizado de cérebro de rato, nas concentrações de 2,5 e 3,0 mg/L, respectivamente. O padrão interno foi adicionado ao plasma na concentração de 4,0 mg/L e ao homogeneizado de cérebro na concentração de 2,0 mg/L.

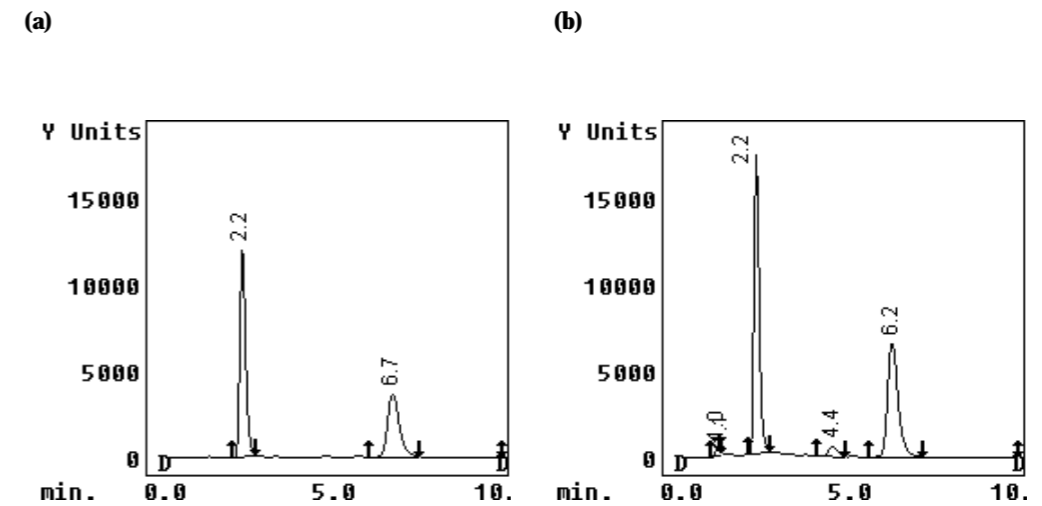


Figura R.1 Cromatogramas típicos de lamotrigina: padrão de lamotrigina 2,5 mg/L preparado em plasma humano (6,7 min), com adição de padrão interno 4,0 mg/L (2,2 min) (a); padrão de lamotrigina 3,0 mg/L preparado em homogeneizado de cérebro de rato (6,2 min), com adição de padrão interno 2,0 mg/L (2,2 min) (b). AUFS = 0,2 (a) e 0,05 (b).

As tabelas **R.1** e **R.2** apresentam os valores das respostas cromatográficas obtidas nos ensaios intradia e interdia da validação da técnica de HPLC para a quantificação de lamotrigina em plasma e em homogeneizado de cérebro de rato.

As tabelas **R.3** e **R.4** apresentam os valores das respostas cromatográficas obtidas no estudo da eficácia da extracção da lamotrigina e do seu padrão interno a partir do plasma e do homogeneizado de cérebro de rato.

As tabelas **R.5** e **R.6** apresentam os valores das respostas cromatográficas obtidas no estudo da estabilidade da lamotrigina em plasma e em homogeneizado de cérebro de rato, após um determinado período de armazenamento em frigorífico ou congelador.

Tabela R.1 Valores das respostas cromatográficas obtidas nos ensaios intradia (a) e interdia (b) da validação da técnica para quantificação de lamotrigina em plasma.

(a)

Padrão de calibração (mg/L)	A _{LTG} ^a	A _{PI} ^b	Resposta cromatográfica
			A _{LTG} / A _{PI}
0,1	75381	3373583	0,0223
0,1	62834	2744443	0,0229
0,1	68050	2863618	0,0238
0,1	73212	3190782	0,0229
0,1	75930	3144582	0,0241

0,5	257216	2014039	0,1277
0,5	405062	3171034	0,1277
0,5	288208	2030940	0,1419
0,5	241389	1784224	0,1353
0,5	170464	1336876	0,1275
2,5	1821207	2519066	0,7230
2,5	1313376	1854051	0,7084
2,5	1455983	1988923	0,7320
2,5	1571247	2257804	0,6959
2,5	1891859	2639658	0,7167
5,0	2920147	1953823	1,4946
5,0	3625661	2558610	1,4170
5,0	3470936	2411890	1,4391
5,0	3255545	2293479	1,4195
5,0	3348493	2296357	1,4582
10,0	7548655	2788875	2,7067
10,0	7461482	2621568	2,8462
10,0	8558588	2994875	2,8577
10,0	7417735	2879871	2,5757
10,0	6983170	2374008	2,9415
15,0	12209191	3244845	3,7626
15,0	12953689	2911392	4,4493
15,0	11682576	2903904	4,0231
15,0	10940196	2852877	3,8348
15,0	11147470	2672128	4,1718

^a Área do pico da lamotrigina; ^b Área do pico do padrão interno.

(b)			
Padrão de calibração (mg/L)	Resposta cromatográfica ^c		
	A_{LTC}^a	A_{PI}^b	A_{LTC} / A_{PI}
0,1	76928	2399880	0,0323
	97666	2668165	
	94602	3272495	
0,1	89701	2704743	0,0337
	85227	2654030	
	74081	2024207	
0,1	105093	3347661	0,0350
	125749	3505118	
	139921	3752784	
0,1	115724	3209952	0,0379
	109996	2912360	
	129095	3230057	
0,1	58142	1836197	0,0260
	60350	2399621	
	76100	3257299	
0,5	421024	3229169	0,1336
	331715	2647402	
	444571	3083294	
0,5	254206	1880190	0,1421
	281786	2022747	
	392761	2634382	
0,5	332013	2444101	0,1394
	414958	3019208	
	434190	3012113	
0,5	441066	2923119	0,1458
	447133	3061401	
	406599	2893414	
0,5	300793	2014308	0,1411
	195650	1228519	
	343203	2709330	

2,5	1812780	2851399	0,6488
	2308825	3421793	
	2211443	3487779	
2,5	649335	981341	0,6952
	1610016	2392910	
	1921468	2639312	
2,5	1655379	2493508	0,6443
	1251134	1998542	
	1817380	2840211	
2,5	2192046	3347988	0,6985
	2622930	3828212	
	2324928	3046144	
2,5	2123772	3028319	0,7017
	2424642	3367359	
	1924364	2828827	
5,0	4489861	3460377	1,2707
	4708020	3644544	
	3523142	2906430	
5,0	3441715	2432987	1,4470
	3444874	2399447	
	3901117	2622714	
5,0	3924952	3356437	1,1626
	3210225	2814729	
	3609265	3070957	
5,0	5097883	3459848	1,3484
	4167389	3145260	
	4144233	3339468	
5,0	4329000	3083790	1,4911
	4752687	3077800	
	4553928	2983321	

10,0	7306450	3087896	2,4399
	8422444	3368648	
	6554134	2676291	
10,0	8874158	3038340	2,9012
	7492820	2603891	
	9417016	3245235	
10,0	9314430	3770601	2,4576
	9747977	3813758	
	9094360	3872435	
10,0	9850396	3588457	2,6777
	8086428	3064234	
	9391502	3553361	
10,0	9185578	3615290	2,6687
	6548833	2457328	
	8731030	3095009	
15,0	10005954	2870386	3,7198
	14999168	3921274	
	13096280	3451333	
15,0	10296069	2538189	3,9474
	14067189	3549309	
	7153664	1896651	
15,0	13077411	3702707	3,6123
	12751411	3606604	
	11915767	3139680	
15,0	13838963	3700009	3,8181
	14332541	3758808	
	14566986	3734816	
15,0	12740379	3199056	3,9557
	13114795	3365227	
	13620978	3415316	

^a Área do pico da lamotrigina; ^b Área do pico do padrão interno; ^c Média.

Tabela R.2 Valores das respostas cromatográficas obtidas nos ensaios intradia (a) e interdia (b) da validação da técnica para quantificação de lamotrigina em homogeneizado de cérebro de rato.

Padrão de calibração (mg/L)	Resposta cromatográfica		
	A_{LTC}^a	A_{PI}^b	A_{LTC} / A_{PI}
0,1	211654	6252522	0,0339
0,1	142414	4378894	0,0325
0,1	149470	3980564	0,0375
0,1	142217	3768584	0,0377
0,1	133371	5489934	0,0243
0,5	613727	4059940	0,1512
0,5	896378	6081764	0,1474
0,5	524935	3772793	0,1391
0,5	675236	5385440	0,1254
0,5	778472	6002820	0,1297
1,0	1326261	5187072	0,2557
1,0	1469542	5377444	0,2733
1,0	1356204	5357164	0,2532
1,0	1275141	5132746	0,2484
1,0	1119083	4088623	0,2737
3,0	4146672	5037027	0,8232
3,0	3847668	4975496	0,7733
3,0	3528853	4597898	0,7675
3,0	3626884	4404380	0,8235
3,0	3948426	5242933	0,7531
5,0	6739029	4809248	1,4013
5,0	6789541	5042344	1,3465
5,0	6424272	3886041	1,6532
5,0	6863060	5138679	1,3356
5,0	7037153	5055676	1,3919

^a Área do pico da lamotrigina; ^b Área do pico do padrão interno.

(b)

Padrão de calibração (mg/L)	Resposta cromatográfica		
	A _{LTC} ^a	A _{PI} ^b	A _{LTC} / A _{PI}
0,1	288590	9016526	0,0323
0,1	87929	4108933	0,0214
0,1	146003	4235907	0,0345
0,1	178812	7274736	0,0246
0,1	142414	4378894	0,0325
0,5	818916	5941778	0,1453
0,5	810659	6107389	0,1327
0,5	584481	3884238	0,1505
0,5	692773	5067780	0,1367
0,5	524935	3772793	0,1391
1,0	1722321	6777806	0,2523
1,0	1256403	4759717	0,2640
1,0	871256	3608715	0,2414
1,0	1439269	5311661	0,2710
1,0	1356204	5357164	0,2532
3,0	4992098	6729892	0,7459
3,0	4027160	5169252	0,7791
3,0	3001137	3837591	0,7820
3,0	4123271	5188017	0,7948
3,0	3847668	4975496	0,7733
5,0	8497102	6861184	1,2458
5,0	7906920	5592360	1,4139
5,0	5177180	3903734	1,3262
5,0	7835288	5716611	1,3706
5,0	6789541	5042344	1,3465

^a Área do pico da lamotrigina; ^b Área do pico do padrão interno.

Tabela R.3 Valores das respostas cromatográficas obtidas no estudo da eficácia da extração, a partir do plasma, da lamotrigina na presença do padrão interno (a) e do padrão interno isolado (b).

(a)

Padrão de calibração (mg/L)	A _{LTC} ^a	A _{PI} ^b	Resposta	A _{LTC} ^a	A _{PI} ^b	Resposta
	A _{LTC} / A _{PI}			A _{LTC} / A _{PI}		
	Solução			Plasma		
2,5	487170	903976	0,5389	310496	515962	0,6018
2,5	479116	901271	0,5316	556833	876812	0,6351
2,5	484994	923972	0,5249	994614	1630441	0,6100
2,5	482212	943318	0,5112	622865	947910	0,6571
2,5	486248	976089	0,4982	316044	515329	0,6133
5,0	985613	991696	0,9939	656454	528429	1,2423
5,0	1010710	780688	1,2946	828558	577239	1,4354
5,0	993826	1014002	0,9801	1668453	1325664	1,2586
5,0	997971	1003762	0,9942	1329571	968290	1,3731
5,0	990648	999247	0,9914	2206068	1736425	1,2705
15,0	3084990	918100	3,3602	3441455	887163	3,8792
15,0	3080196	1003946	3,0681	3198224	787959	4,0589
15,0	3143989	881094	3,5683	2702150	715070	3,7789
15,0	3109928	1074379	2,8946	5887805	1372368	4,2903
15,0	3148866	842428	3,7378	4145739	995738	4,1635

^a Área do pico da lamotrigina; ^b Área do pico do padrão interno.

(b)

Padrão interno (mg/L)	A _{PI} ^b	
	Solução	Plasma
4,0	1051863	810041
4,0	1058494	1033790
4,0	928453	782471
4,0	1052331	1011389
4,0	1027408	777230

^b Área do pico do padrão interno.

Tabela R.4 Valores das respostas cromatográficas obtidas no estudo da eficácia da extracção, a partir do homogeneizado de cérebro de rato, da lamotrigina na presença do padrão interno (a) e do padrão interno isolado (b).

(a)

Padrão de calibração (mg/L)	A_{LTC}^a	A_{PI}^b	Resposta	A_{LTC}^a	A_{PI}^b	Resposta
	Solução			Homogeneizado de cérebro		
			A_{LTC} / A_{PI}			A_{LTC} / A_{PI}
1,0	198619	871378	0,2279	758860	2184892	0,3473
1,0	204200	862774	0,2367	733905	2145950	0,3420
1,0	221743	836611	0,2650	718713	2135866	0,3365
1,0	201152	804854	0,2499	759366	2181032	0,3482
1,0	226470	758233	0,2987	748768	2155626	0,3474
3,0	1616710	2060593	0,7846	3069271	3939141	0,7792
3,0	1387570	1819791	0,7625	3063917	3967771	0,7722
3,0	1384074	1974816	0,7009	3042393	3954199	0,7694
3,0	1296345	1630840	0,7979	3050021	3910269	0,7800
3,0	3607590	4528862	0,7966	3124632	3944645	0,7921
5,0	1458691	907133	1,6080	4117860	2151868	1,9136
5,0	1242666	799575	1,5542	3939199	2105191	1,8712
5,0	611351	307877	1,9857	3941162	2117976	1,8608
5,0	1516936	907480	1,6716	3965487	2130901	1,8609
5,0	1018917	676713	1,5057	4022247	2122931	1,8947

^a Área do pico da lamotrigina; ^b Área do pico do padrão interno.

(b)

Padrão interno (mg/L)	A_{PI}^b	
	Solução	Homogeneizado de cérebro
2,0	1669639	1387137
2,0	1664132	1357053
2,0	1738882	1301254
2,0	1738601	1219456
2,0	1742530	1160847

^b Área do pico do padrão interno.

Tabela R.5 Valores das respostas cromatográficas obtidas no estudo da estabilidade dos padrões de lamotrigina 2,5 mg/L e 10,0 mg/L no plasma, quando armazenados no frigorífico (a) ou no congelador (b).

(a)

Padrão	Dia	A_{LTC}^a	A_{PI}^b	Resposta cromatográfica A_{LTC} / A_{PI}
		2,5 mg/L		
2,5 mg/L	0	1759604	1804973	0,9749
		1249611	1333307	0,9372
		1400561	1778374	0,7876
		1384654	1622583	0,8534
		1417443	1649606	0,8593
2,5 mg/L	1	2279503	2774155	0,8217
		1816243	2263144	0,8025
		1798404	2257234	0,7967
		1995104	2192019	0,9102
		1839952	2289508	0,8036
2,5 mg/L	2	1826246	2300132	0,7940
		1317218	1208164	1,0903
		1701718	2125666	0,8006
		1854390	2178717	0,8511
		1634149	2053016	0,7960
2,5 mg/L	3	1483106	1423894	1,0416
		1496279	2006839	0,7456
		1771020	1894982	0,9346
		1453705	1622909	0,8957
		1443660	1604130	0,9000
2,5 mg/L	4	2204059	2993670	0,7362
		1701351	2044444	0,8322
		1860922	2097123	0,8874
		1726755	2194067	0,7870
		1992492	2380451	0,8370

	2300710	2795469	0,8230
	1991199	2487137	0,8006
7	1613891	1864156	0,8657
	2109260	2645198	0,7974
	2052198	2358099	0,8703
	1751465	2157340	0,8119
	1521550	1864308	0,8161
8	1530283	1921280	0,7965
	1774238	2139883	0,8291
	1977126	2309182	0,8562
	1497509	1752697	0,8544
	1685259	2057893	0,8189
11	1940615	2292318	0,8466
	1475019	1850014	0,7973
	1215091	1542570	0,7877
10,0 mg/L			
	5947368	1777054	3,3468
	8035896	2224450	3,6125
0	8526789	2399528	3,5535
	8654403	2267742	3,8163
	7321873	1937874	3,7783
	8251341	2574451	3,2051
	8551956	2656749	3,2190
1	7371360	2039513	3,6143
	6264618	1930144	3,2457
	9472139	3069902	3,0855
	9360920	3077015	3,0422
	8228484	2691802	3,0569
2	8714272	2773011	3,1425
	7600507	1853411	4,1008
	8491515	2168111	3,9165

	8708469	2624538	3,3181
	8498996	2096849	4,0532
3	8629394	2589035	3,3331
	7523853	2163438	3,4777
	9027427	2549241	3,5412
	8529867	2741193	3,1117
	9012117	2896785	3,1111
4	7901368	2270444	3,4801
	10403695	3053838	3,4068
	7993003	2335651	3,4222
	8584186	2243196	3,8268
	8698095	2622993	3,3161
7	8190528	2490720	3,2884
	8627935	2717953	3,1744
	9053359	2721669	3,3264
	8507731	2637727	3,2254
	7784822	2422304	3,2138
8	5857559	1759412	3,3293
	6271666	1970404	3,1829
	9265934	2757755	3,3600
	4738940	1459897	3,2461
	3776572	992862	3,8037
11	4682785	1398100	3,3494
	5545633	1692770	3,2761
	4338604	1428424	3,0373

^a Área do pico da lamotrigina; ^b Área do pico do padrão interno.

(b)

Padrão	Dia	A _{LTG} ^a	A _{PI} ^b	Resposta cromatográfica A _{LTG} / A _{PI}
2,5 mg/L	0	1759604	1804973	0,9749
		1249611	1333307	0,9372
		1400561	1778374	0,7876
		1384654	1622583	0,8534
		1417443	1649606	0,8593
	11	1865562	2224258	0,8387
		1481004	1871016	0,7916
		1434110	1777313	0,8069
		1467788	1711939	0,8574
		1709750	1965740	0,8698
	46	1573834	1907242	0,8252
		1925955	2115238	0,9105
		1325721	1695928	0,7817
		1668214	1915152	0,8711
		1232566	1303613	0,9455
10,0 mg/L	0	5947368	1777054	3,3468
		8035896	2224450	3,6125
		8526789	2399528	3,5535
		8654403	2267742	3,8163
		7321873	1937874	3,7783
	11	5696574	1787163	3,1875
		7075076	2142869	3,3017
		6840062	2124320	3,2199
		9368706	2904652	3,2254
		7892976	2477584	3,1858
	46	6246148	1786000	3,4973
		5854963	1710930	3,4221
		7928477	2593507	3,0570
		7547764	2075716	3,6362
		8704924	2754903	3,1598

^a Área do pico da lamotrigina; ^b Área do pico do padrão interno.

Tabela R.6 Valores das respostas cromatográficas obtidas no estudo da estabilidade do padrão de lamotrigina 3,0 mg/L no homogeneizado de cérebro, quando armazenado no frigorífico (a) ou no congelador (b).

(a)

Padrão	Dia	A _{LTG} ^a	A _{PI} ^b	Resposta cromatográfica A _{LTG} / A _{PI}
3,0 mg/L	0	6781832	6753078	1,0043
		3632611	3664984	0,9912
		3989284	3800205	1,0498
		4802431	4680248	1,0261
		5304889	5417074	0,9793
	1	8154849	5860307	1,3915
		7027197	4903780	1,4330
		7144720	5805975	1,2306
		7583267	5273093	1,4381
		6314605	4905746	1,2872
	2	5911705	6535940	0,9045
		5830990	5854726	0,9959
		5474687	6008677	0,9111
		5177028	5748564	0,9006
		5634603	6335205	0,8894
3	6567060	7471954	0,8789	
	4594342	5157472	0,8908	
	4850910	5309105	0,9137	
	5261265	5714405	0,9207	
	5237646	5584263	0,9379	
7	4761992	5281385	0,9017	
	4818158	6280275	0,7672	
	4987186	6433822	0,7752	
	4791615	5888156	0,8138	
	7483676	10064259	0,7436	

^a Área do pico da lamotrigina; ^b Área do pico do padrão interno.

(b)

Dia	A _{LTG} ^a	A _{PI} ^b	Resposta cromatográfica A _{LTG} / A _{PI}
0	6781832	6753078	1,0043
	3632611	3664984	0,9912
	3989284	3800205	1,0498
	4802431	4680248	1,0261
	5304889	5417074	0,9793
7	5089338	5516532	0,9226
	7109620	7954923	0,8937
	5831477	5990574	0,9734
	5349258	5878870	0,9099
	5352776	5834926	0,9174
14	6066970	6636152	0,9142
	4812948	4507723	1,0677
	5697026	6140105	0,9278
	5244836	5130830	1,0222
	5905295	6659848	0,8867

^a Área do pico da lamotrigina; ^b Área do pico do padrão interno.

1. Especificidade e selectividade

Os tempos de retenção médios específicos da lamotrigina e do seu padrão interno foram de 6,9 e 2,3 minutos, respectivamente.

A figura R.2, que representa cromatogramas de brancos de plasma humano, de plasma de rato e de homogeneizado de cérebro de rato, demonstra a *especificidade* da técnica.

A análise cromatográfica de soluções de outros fármacos que podem ser usados em co-administração com a lamotrigina demonstrou a *selectividade* da técnica.

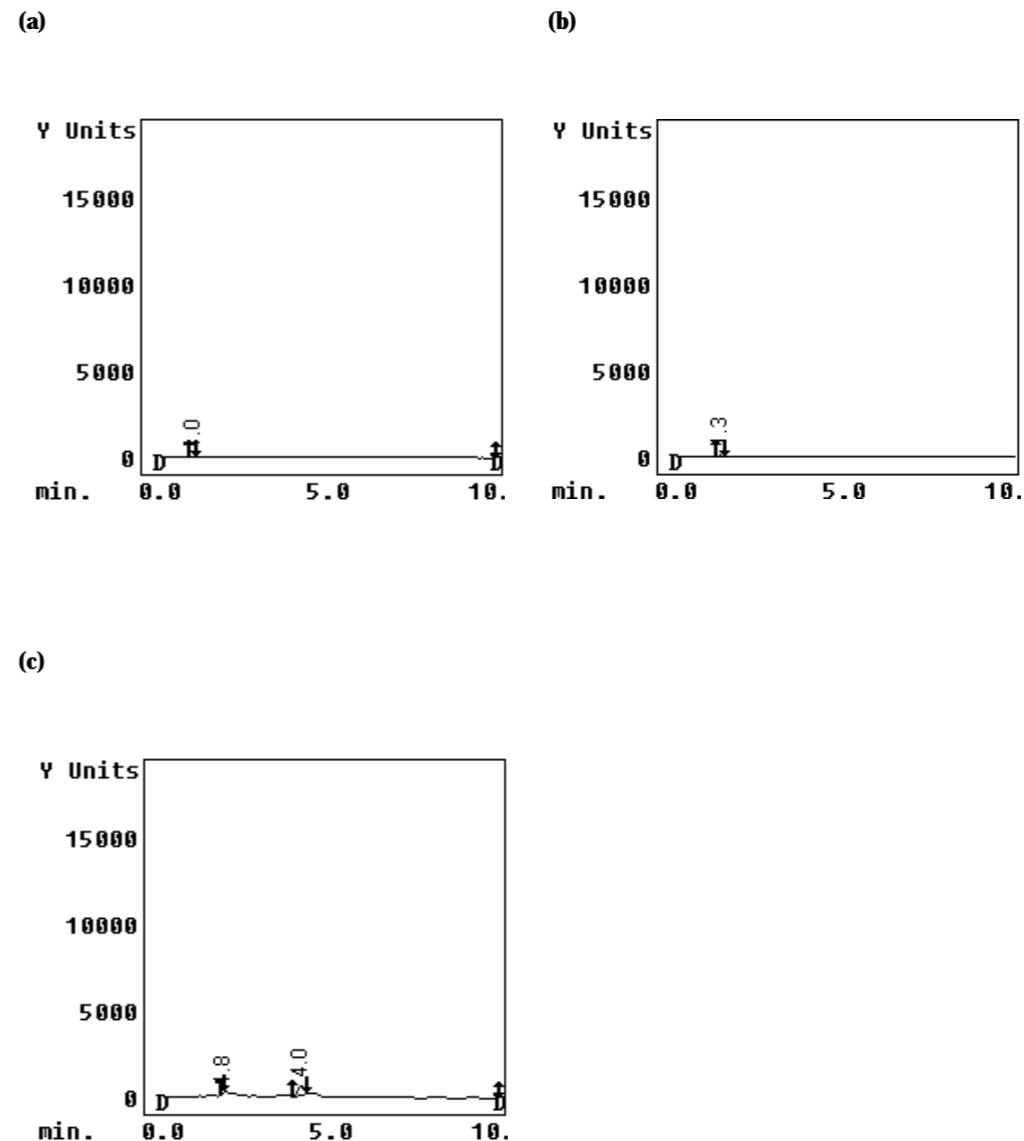


Figura R.2 Cromatogramas de brancos de plasma humano (a), de plasma de rato (b) e de homogeneizado de cérebro de rato (c). AUFS = 0,2 (a e b) e 0,05 (c).

2. Linearidade

A linearidade da técnica foi comprovada entre 0,1 e 15,0 mg/L para o plasma, e entre 0,1 e 5,0 mg/L para o homogeneizado de cérebro.

Em qualquer dos casos, a calibração foi feita segundo o método da regressão linear ponderada, utilizando-se como factor de ponderação $w_i = 1/x_i^2$. As rectas de calibração obtidas encontram-se representadas na tabela R.7.

A qualidade do ajuste foi avaliada pelo valor do coeficiente de correlação determinado (tabela R.7), pela distribuição da percentagem de erro relativo em função da concentração (figuras R.3 e R.4), e pelo número de pontos que se desviaram em mais de 15% (20% para o padrão mais baixo) da recta definida. Nesta última abordagem, o plasma apresentou, no ensaio intradia, todos os pontos dentro da margem considerada, e, no ensaio interdia, apresentou apenas um ponto com desvio superior a 20% em relação à concentração teórica de 0,1 mg/L. Por sua vez, o homogeneizado de cérebro apresentou: no ensaio intradia, um ponto com desvio superior a 20% em relação à concentração teórica de 0,1 mg/L e um ponto com desvio superior a 15% da concentração teórica de 5,0 mg/L; no ensaio interdia, apenas um ponto com desvio superior a 20% em relação ao padrão de calibração mais baixo.

Tabela R.7 Rectas de calibração da lamotrigina em plasma e em homogeneizado de cérebro.

Plasma (0,1-15,0 mg/L)		Homogeneizado de cérebro (0,1-5,0 mg/L)	
Intradia	Interdia	Intradia	Interdia
$y = 0,280x - 0,005$	$y = 0,264x + 0,007$	$y = 0,266x + 0,006$	$y = 0,263x + 0,003$
$r = 0,999^a$	$r = 0,995^a$	$r = 0,991^a$	$r = 0,993^a$

^a Coeficiente de correlação.

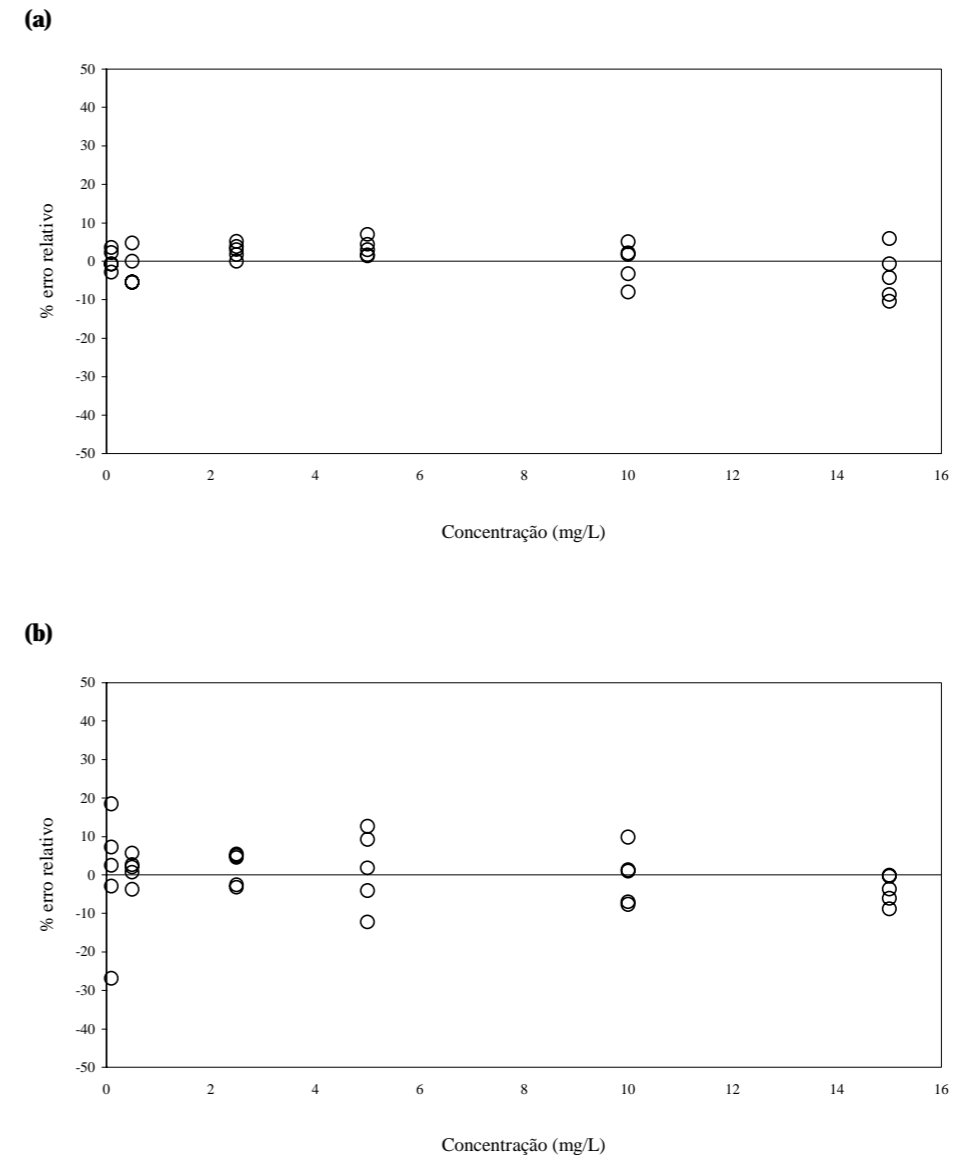


Figura R.3 Distribuição da percentagem de erro relativo em redor do eixo das concentrações, no ensaio intradia (a) e no ensaio interdia (b) do plasma.
 $\% \text{ erro relativo} = (C_{\text{medida}} - C_{\text{teórica}}) / C_{\text{teórica}} \cdot 100$

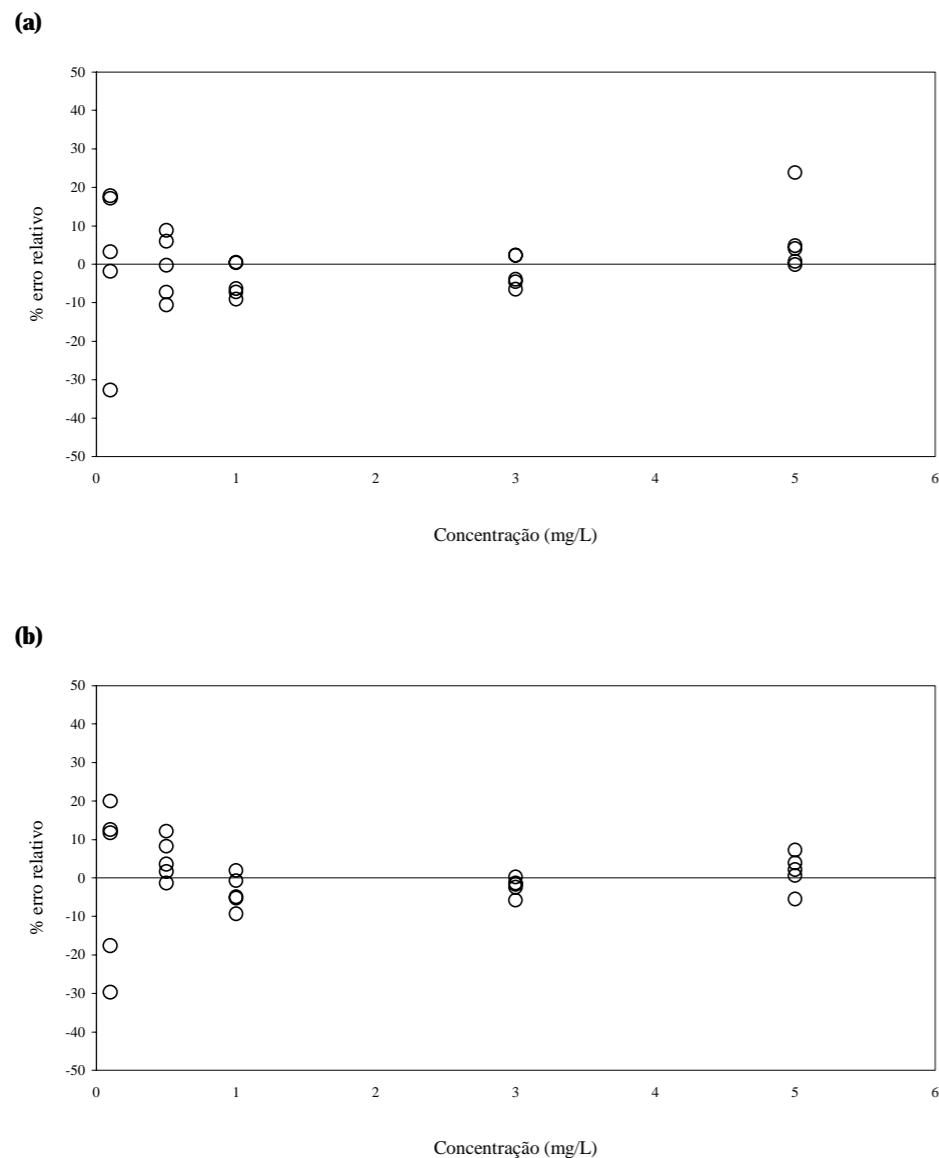


Figura R.4 Distribuição da percentagem de erro relativo em redor do eixo das concentrações, no ensaio intradia (a) e no ensaio interdia (b) do homogeneizado de cérebro.
 $\% \text{ erro relativo} = (C_{\text{medida}} - C_{\text{teórica}}) / C_{\text{teórica}} \cdot 100$

3. Precisão

Os resultados do estudo da precisão intra e interdia da técnica analítica para a quantificação da lamotrigina em plasma e em cérebro de rato encontram-se representados na tabela R.8.

4. Exactidão

Os resultados do estudo da exactidão intra e interdia da técnica analítica para a quantificação da lamotrigina em plasma e em cérebro apresentam-se na tabela R.9.

A análise estatística efectuada através da realização de um teste *t* de *Student* emparelhado revelou, em qualquer um dos ensaios efectuados, diferenças estatisticamente não significativas entre as concentrações experimentais e as concentrações teóricas ($p > 0,05$).

5. Eficácia da extracção

A tabela R.10 apresenta os resultados obtidos no estudo da eficácia da extracção a partir do plasma e do homogeneizado de cérebro de rato, quando a lamotrigina se encontra na presença do padrão interno. A recuperação absoluta do padrão interno isolado foi de $86,14 \pm 9,264\%$ no plasma (4,0 mg/L, média \pm desvio-padrão, $n=5$) e de $75,24 \pm 7,102\%$ no homogeneizado de cérebro (2,0 mg/L, média \pm desvio-padrão, $n=5$).

Tabela R.8 Estudo da precisão em plasma (a) e em homogeneizado de cérebro (b).

(a)

C _{teórica} ^a	Ensaio			
	Intradia		Interdia	
	Resposta cromatográfica ^b	CV ^c	Resposta cromatográfica ^b	CV ^c
0,1	0,023 ± 0,001	3,12	0,033 ± 0,004	13,45
0,5	0,132 ± 0,006	4,88	0,140 ± 0,004	3,18
2,5	0,715 ± 0,014	1,93	0,678 ± 0,029	4,22
5,0	1,446 ± 0,032	2,21	1,344 ± 0,133	9,88
10,0	2,786 ± 0,144	5,19	2,629 ± 0,189	7,20
15,0	4,048 ± 0,276	6,81	3,811 ± 0,148	3,88
Média	-	4,02	-	6,97

^a mg/L; ^b Área_{LTC} / Área_{PP}, média±desvio-padrão, n = 5; ^c Coeficiente de variação, %.

(b)

C _{teórica} ^a	Ensaio			
	Intradia		Interdia	
	Resposta cromatográfica ^b	CV ^c	Resposta cromatográfica ^b	CV ^c
0,1	0,033 ± 0,005	16,48	0,029 ± 0,006	19,66
0,5	0,139 ± 0,011	7,99	0,141 ± 0,007	5,00
1,0	0,261 ± 0,012	4,54	0,256 ± 0,011	4,45
3,0	0,788 ± 0,033	4,19	0,775 ± 0,018	2,33
5,0	1,426 ± 0,130	9,14	1,341 ± 0,062	4,64
Média	-	8,47	-	7,22

^a mg/L; ^b Área_{LTC} / Área_{PP}, média±desvio-padrão, n = 5; ^c Coeficiente de variação, %.**Tabela R.9** Estudo da exactidão em plasma (a) e em homogeneizado de cérebro (b).

(a)

C _{teórica} ^a	Ensaio			
	Intradia		Interdia	
	C _{medida} ^b	Bias ^c	C _{medida} ^b	Bias ^c
0,1	0,10 ± 0,003	+ 0,28	0,10 ± 0,017	- 0,33
0,5	0,49 ± 0,023	- 2,33	0,51 ± 0,017	+ 1,44
2,5	2,57 ± 0,049	+ 2,73	2,55 ± 0,108	+ 1,82
5,0	5,17 ± 0,114	+ 3,46	5,07 ± 0,504	+ 1,46
10,0	9,95 ± 0,515	- 0,48	9,95 ± 0,718	- 0,52
15,0	14,46 ± 0,983	- 3,63	14,43 ± 0,561	- 3,79

^a mg/L; ^b mg/L, média±desvio-padrão, n = 5; ^c Bias, %.

(b)

C _{teórica} ^a	Ensaio			
	Intradia		Interdia	
	C _{medida} ^b	Bias ^c	C _{medida} ^b	Bias ^c
0,1	0,10 ± 0,021	+ 0,68	0,10 ± 0,022	- 0,63
0,5	0,50 ± 0,042	- 0,68	0,52 ± 0,027	+ 4,83
1,0	0,96 ± 0,044	- 4,38	0,96 ± 0,043	- 3,70
3,0	2,94 ± 0,124	- 2,08	2,93 ± 0,069	- 2,21
5,0	5,33 ± 0,490	+ 6,67	5,08 ± 0,236	+ 1,65

^a mg/L; ^b mg/L, média±desvio-padrão, n = 5; ^c Bias, %.

Tabela R.10 Eficácia da extracção da lamotrigina na presença de padrão interno a partir do plasma (a) e do homogeneizado de cérebro (b).

(a)

$C_{teórica}^a$	Recuperação	CV ^d
2,5	83,67 ± 4,493^b	5,37
5,0	79,70 ± 6,510^b	8,17
15,0	82,78 ± 11,017^b	13,31
Média	82,05 ± 7,459^c	9,09

^a mg/L; ^{b,c} %, média±desvio-padrão, $n = 5$ (^b) e $n = 15$ (^c); ^d Coeficiente de variação, %.

(b)

$C_{teórica}^a$	Recuperação	CV ^d
1,0	74,27 ± 8,125^b	10,94
3,0	98,60 ± 4,347^b	4,41
5,0	88,62 ± 10,776^b	12,16
Média	87,16 ± 12,816^c	14,70

^a mg/L; ^{b,c} %, média±desvio-padrão, $n = 5$ (^b) e $n = 15$ (^c); ^d Coeficiente de variação, %.

6. Sensibilidade, limite de detecção e limite de quantificação

O *limite de detecção* da técnica para quantificação de lamotrigina em plasma e em homogeneizado de cérebro de rato foi determinado instrumentalmente. O padrão mais baixo da recta de calibração – 0,1 mg/L – foi diluído a metade e a um décimo para a técnica do plasma; a diluição foi feita também a um quarto para a técnica do cérebro, uma vez que a diluição a um décimo não permitiu a detecção de nenhum pico ao tempo de retenção específico da lamotrigina. Foi, de seguida, avaliada a variabilidade das respostas cromatográficas. Os resultados encontram-se na tabela R.11.

Para ambas as matrizes foi considerado como *limite de quantificação* o padrão de 0,1 mg/L, por ser o padrão mais baixo da recta de calibração e por apresentar valores de precisão e exactidão dentro dos limites recomendados.

Tabela R.11 Limite de detecção da técnica no plasma (a) e no homogeneizado de cérebro (b).

(a)

$C_{teórica}^a$	Resposta cromatográfica ^b	Média	3 * Desvio-padrão
0,050	0,0103	0,0105	0,0083
	0,0102		
	0,0064		
	0,0116		
0,010	0,0141	0,0067	0,0131
	0,0117		
	0,0108		
	0,0054		
	0,0036		
	0,0019		

^a mg/L; ^b Área_{LTG} / Área_{PR}

(b)

$C_{teórica}^a$	Resposta cromatográfica ^b	Média	3 * Desvio-padrão
0,050	0,0066	0,0082	0,0066
	0,0083		
	0,0071		
	0,0070		
	0,0120		
0,025	0,0296	0,0261	0,0344
	0,0145		
	0,0409		
	0,0145		
	0,0311		
0,010	-	-	-
	-		
	-		
	-		
	-		

^a mg/L; ^b Área_{LTC} / Área_{pr}

7. Estabilidade

Os resultados do estudo de estabilidade da lamotrigina nas matrizes biológicas estudadas, quando foram armazenadas no frigorífico ou no congelador, encontram-se representados nas tabelas **R.12** e **R.13**.

Tabela R.12 Estabilidade da lamotrigina em plasma, no frigorífico e no congelador, em padrões de 2,5 mg/L (a) e de 10,0 mg/L (b).

(a)

2,5 mg/L	Frigorífico (4° C)			Congelador (-25° C)		
	Resposta cromatográfica ^a	Razão ^b	IC ₉₀ ^c	Resposta cromatográfica ^a	Razão ^b	IC ₉₀ ^c
Dia 0	0,882±0,074	-	-	0,882±0,074	-	-
Dia 1	0,827±0,047	94,3	85,1 - 103,5	-	-	-
Dia 2	0,866±0,127	98,4	86,2 - 110,6	-	-	-
Dia 3	0,904±0,106	103,0	89,4 - 116,6	-	-	-
Dia 4	0,816±0,057	93,3	80,4 - 106,2	-	-	-
Dia 7	0,831±0,035	94,9	84,6 - 105,2	-	-	-
Dia 8	0,822±0,022	93,7	86,1 - 101,3	-	-	-
Dia 11	0,821±0,029	93,5	85,7 - 101,3	0,833±0,033	94,9	86,4 - 103,4
Dia 46	-	-	-	0,867±0,065	98,6	89,8 - 107,4

^a Área_{LTC} / Área_{pr}, média±desvio-padrão, $n = 5$; ^b Resposta dia X / Resposta dia 0; ^c Intervalo de confiança a 90%.

(b)

10,0 mg/L	Frigorífico (4° C)			Congelador (-25° C)		
	Resposta cromatográfica ^a	Razão ^b	IC ₉₀ ^c	Resposta cromatográfica ^a	Razão ^b	IC ₉₀ ^c
Dia 0	3,621±0,189	-	-	3,621±0,189	-	-
Dia 1	3,274±0,200	90,7	83,0 - 98,4	-	-	-
Dia 2	3,452±0,514	95,0	85,5 - 104,5	-	-	-
Dia 3	3,545±0,300	98,0	89,9 - 106,1	-	-	-
Dia 4	3,306±0,180	91,4	87,2 - 95,6	-	-	-
Dia 7	3,386±0,253	94,0	82,6 - 105,4	-	-	-
Dia 8	3,262±0,078	90,3	85,5 - 95,1	-	-	-
Dia 11	3,343±0,283	92,6	83,4 - 101,8	3,224±0,047	89,2	84,7 - 93,7
Dia 46	-	-	-	3,354±0,240	92,8	84,9 - 100,7

^a Área_{LTC} / Área_{pr}, média±desvio-padrão, $n = 5$; ^b Resposta dia X / Resposta dia 0; ^c Intervalo de confiança a 90%.

Tabela R.13 Estabilidade da lamotrigina em homogeneizado de cérebro, no frigorífico e no congelador, num padrão de 3,0 mg/L.

3,0 mg/L	Frigorífico (4° C)			Congelador (-25° C)		
	Resposta cromatográfica ^a	Razão ^b	IC ₉₀ ^c	Resposta cromatográfica ^a	Razão ^b	IC ₉₀ ^c
Dia 0	1,010±0,028	-	-	1,010±0,028	-	-
Dia 1	1,356±0,093	134,4	124,2 - 144,6	-	-	-
Dia 2	0,920±0,043	91,2	86,0 - 96,4	-	-	-
Dia 3	0,908±0,024	90,0	86,7 - 93,3	-	-	-
Dia 7	0,800±0,062	79,3	73,4 - 85,2	0,923±0,030	91,4	89,5 - 93,3
Dia 14	-	-	-	0,964±0,077	95,5	87,8 - 103,2

^a Área_{LTC} / Área_{pp}, média±desvio-padrão, n = 5; ^b Resposta dia X / Resposta dia 0; ^c Intervalo de confiança a 90%.

2. DESENHO EXPERIMENTAL

2.1 Seleção da formulação mais adequada para a administração da lamotrigina

Os valores das concentrações plasmáticas de lamotrigina obtidos, durante um período de 48 horas após a administração i.p. do fármaco aos animais, na dose única de 10 mg/kg, sob a forma de suspensão, solução lipofílica e solução aquosa, são apresentados na tabela R.14. A figura R.5 representa as respectivas curvas de níveis plasmáticos ao longo do tempo.

Tabela R.14 Concentrações plasmáticas de lamotrigina obtidas após a administração i.p. do fármaco, em dose única de 10 mg/kg, sob a forma de suspensão (a), solução lipofílica (b) e solução aquosa (c).

(a)

Tempo (h)	Rato					M ^a	DP ^b	CV ^c
	1	2	3	4	5			
0,25	0,59	0,86	1,16	0,65	1,14	0,88*	0,266	30,25
0,5	1,76	1,75	1,54	1,74	1,81	1,72	0,104	06,06
2	3,82	4,23	3,19	5,71	4,03	4,20	0,932	22,21
12	2,54	3,63	5,52	4,01	3,87	3,91	1,068	27,28
24	4,49	2,55	1,93	2,54	5,51	3,40	1,522	44,70
48	1,45	2,27	1,23	1,23	1,30	1,50	0,442	29,54
<i>AUC₀₋₄₈^d</i>	<i>148,08</i>							

^a Média, mg/L; ^b Desvio-padrão; ^c Coeficiente de variação, %; ^d Área sob a curva, mg.h/L;

* Diferença estatisticamente significativa (p < 0,05) entre os valores obtidos com as diferentes formulações a determinado tempo de amostragem (ANOVA).

(b)

Tempo (h)	Rato					M ^a	DP ^b	CV ^c
	1	2	3	4	5			
0,25	4,68	1,24	1,14	4,98	1,09	2,63*	2,015	76,75
0,5	2,48	1,73	1,35	2,63	4,05	2,45	1,039	42,46
2	4,32	3,78	3,98	4,98	4,81	4,37	0,517	11,82
12	3,60	2,74	3,35	3,56	2,63	3,18	0,460	14,48
24	2,55	2,72	1,90	3,60	2,97	2,75	0,619	22,54
48	1,20	1,26	1,41	1,43	1,76	1,41	0,218	15,41
<i>AUC₀₋₄₈^d</i>			129,33					

^a Média, mg/L; ^b Desvio-padrão; ^c Coeficiente de variação, %; ^d Área sob a curva, mg.h/L;

* Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os valores obtidos com as diferentes formulações a determinado tempo de amostragem (ANOVA).

(c)

Tempo (h)	Rato					M ^a	DP ^b	CV ^c
	1	2	3	4	5			
0,25	6,04	5,07	5,12	5,49	6,75	5,69*	0,706	12,40
0,5	4,26	4,00	4,80	5,08	6,80	4,99*	1,099	22,04
2	3,97	4,70	3,95	5,60	5,94	4,83	0,916	18,96
12	3,57	3,13	3,78	3,95	2,76	3,44	0,488	14,18
24	2,63	2,50	2,08	2,11	3,48	2,56	0,567	22,16
48	1,43	1,68	0,81	0,98	1,73	1,33	0,414	31,22
<i>AUC₀₋₄₈^d</i>			133,44					

^a Média, mg/L; ^b Desvio-padrão; ^c Coeficiente de variação, %; ^d Área sob a curva, mg.h/L;

* Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os valores obtidos com as diferentes formulações a determinado tempo de amostragem (ANOVA).

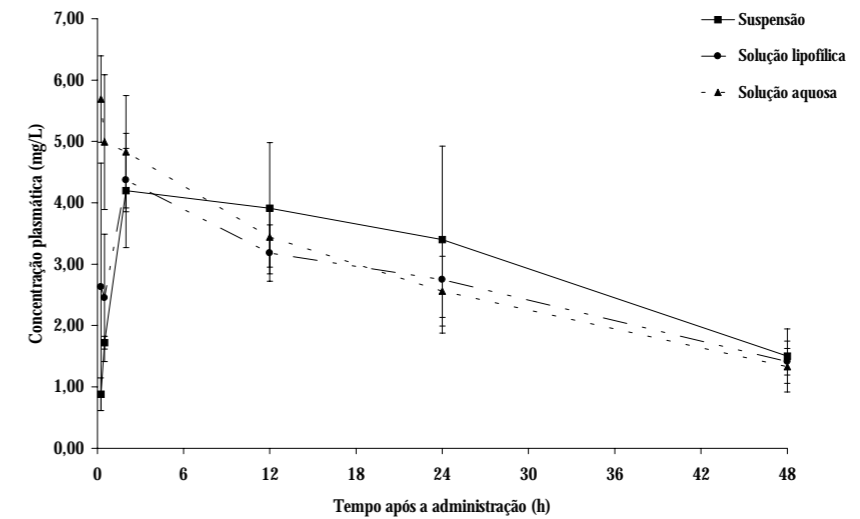


Figura R.5 Curvas plasmáticas de lamotrigina obtidas após a administração i.p. do fármaco, em dose única de 10 mg/kg, sob a forma de suspensão, solução lipofílica e solução aquosa (média ± desvio-padrão).

A tabela **R.15** apresenta os valores das concentrações cerebrais de lamotrigina correspondentes aos níveis plasmáticos da tabela **R.14**. A figura **R.6** representa as correspondentes curvas de níveis cerebrais ao longo do tempo.

Tabela R.15 Concentrações cerebrais de lamotrigina obtidas após a administração i.p. do fármaco, em dose única de 10 mg/kg, sob a forma de suspensão (a), solução lipofílica (b) e solução aquosa (c).

(a)

Tempo (h)	Rato					M ^a	DP ^b	CV ^c
	1	2	3	4	5			
0,25	0,24	0,39	0,30	0,31	0,41	0,33*	0,070	21,10
0,5	0,43	0,41	0,46	0,51	0,77	0,52	0,147	28,47
2	1,20	2,32	1,09	2,06	1,43	1,62	0,542	33,48
12	1,21	1,46	1,31	1,48	1,68	1,43*	0,179	12,56
24	1,05	0,90	0,63	1,16	2,26	1,20	0,625	52,08
48	0,50	1,09	0,48	0,36	0,10	0,51	0,363	71,80
<i>AUC₀₋₄₈^d</i>			53,30					

^a Média, mg/L de homogeneizado; ^b Desvio-padrão; ^c Coeficiente de variação, %; ^d Área sob a curva, mg.h/L;
* Diferença estatisticamente significativa (p < 0,05) entre os valores obtidos com as diferentes formulações a determinado tempo de amostragem (ANOVA).

(b)

Tempo (h)	Rato					M ^a	DP ^b	CV ^c
	1	2	3	4	5			
0,25	1,42	0,49	0,26	1,24	0,20	0,72	0,569	78,82
0,5	0,63	0,59	0,44	0,82	1,43	0,78	0,387	49,46
2	1,55	2,14	1,43	1,74	1,62	1,70	0,272	16,06
12	1,25	0,88	1,07	1,37	1,04	1,12*	0,191	17,02
24	0,86	0,83	1,02	0,99	1,14	0,97	0,126	13,01
48	0,41	0,56	0,75	0,50	0,62	0,57	0,128	22,53
<i>AUC₀₋₄₈^d</i>			47,26					

^a Média, mg/L de homogeneizado; ^b Desvio-padrão; ^c Coeficiente de variação, %; ^d Área sob a curva, mg.h/L;
* Diferença estatisticamente significativa (p < 0,05) entre os valores obtidos com as diferentes formulações a determinado tempo de amostragem (ANOVA).

(c)

Tempo (h)	Rato					M ^a	DP ^b	CV ^c
	1	2	3	4	5			
0,25	0,82	1,01	1,10	1,28	1,19	1,08*	0,177	16,37
0,5	1,59	1,47	1,33	1,86	1,93	1,64*	0,255	15,58
2	1,38	1,55	1,48	2,02	1,92	1,67	0,283	16,93
12	1,27	1,19	0,96	1,52	1,13	1,21	0,205	16,93
24	0,74	0,70	0,63	0,72	0,97	0,75	0,129	17,12
48	0,61	0,64	0,43	0,70	0,53	0,58	0,105	18,00
<i>AUC₀₋₄₈^d</i>			45,08					

^a Média, mg/L de homogeneizado; ^b Desvio-padrão; ^c Coeficiente de variação, %; ^d Área sob a curva, mg.h/L;
* Diferença estatisticamente significativa (p < 0,05) entre os valores obtidos com as diferentes formulações a determinado tempo de amostragem (ANOVA).

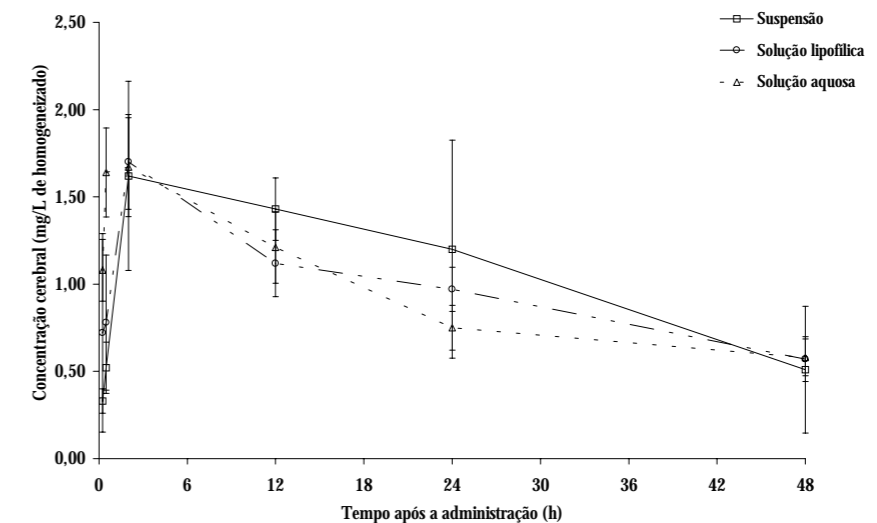


Figura R.6 Curvas cerebrais de lamotrigina obtidas após a administração i.p. do fármaco, em dose única de 10 mg/kg, sob a forma de suspensão, solução lipofílica e solução aquosa (média ± desvio-padrão).

2.2. Caracterização da cinética plasmática e cerebral da lamotrigina

A tabela R.16 apresenta os valores das concentrações plasmáticas de lamotrigina obtidas durante um período de 120 horas após a administração i.p. do fármaco aos animais em dose única de 5, 10 e 20 mg/kg. A figura R.7 representa as respectivas curvas de níveis plasmáticos em função do tempo.

Tabela R.16 Concentrações plasmáticas de lamotrigina obtidas após a administração i.p. do fármaco em dose única de 5 mg/kg (a), 10 mg/kg (b) e 20 mg/kg (c).

(a)

Tempo (h)	Rato					M ^a	DP ^b
	1	2	3	4	5		
0,125	1,41	1,37	1,17	0,75	1,06	1,15	0,267
0,25	2,81	2,21	2,72	1,88	1,95	2,31	0,431
0,5	2,48	2,45	2,47	2,60	2,31	2,46	0,103
2	2,98	2,19	2,06	1,78	2,02	2,21	0,457
12	1,87	1,90	1,69	1,58	1,75	1,76	0,131
24	1,24	1,15	1,17	1,26	1,32	1,23	0,069
48	0,56	0,51	0,33	0,42	0,42	0,45	0,089
72	0,35	0,24	0,40	0,17	0,27	0,29	0,091
120	0,27	- *	0,12	- *	0,18	0,19	0,075

* Concentrações plasmáticas < 0,1 mg/L (limite de quantificação); ^a Média, mg/L; ^b Desvio-padrão.

(b)

Tempo (h)	Rato					M ^a	DP ^b
	1	2	3	4	5		
0,125	2,83	3,05	3,02	3,49	2,49	2,98	0,364
0,25	4,67	5,07	5,12	5,49	6,75	5,42	0,798
0,5	4,26	4,00	4,80	5,08	6,80	4,99	1,099
2	3,97	4,70	3,95	5,60	5,94	4,83	0,916
12	3,57	3,13	3,78	3,95	2,76	3,44	0,488
24	3,39	2,88	3,04	2,11	3,48	2,98	0,545
48	1,43	1,68	0,81	0,98	1,53	1,29	0,373
72	0,88	1,32	1,11	0,86	0,97	1,03	0,191
120	0,45	0,31	0,11	0,20	0,18	0,25	0,133

^a Média, mg/L; ^b Desvio-padrão.

(c)

Tempo (h)	Rato					M ^a	DP ^b
	1	2	3	4	5		
0,125	2,18	2,43	2,34	1,88	2,58	2,28	0,267
0,25	8,51	6,12	9,12	6,32	7,29	7,47	1,321
0,5	9,01	8,00	7,89	8,12	7,05	8,01	0,698
2	8,71	10,30	7,91	8,56	7,98	8,69	0,965
12	5,56	6,53	6,74	6,64	6,47	6,39	0,474
24	5,20	6,25	4,85	4,89	5,35	5,31	0,567
48	2,63	2,49	3,01	2,47	3,05	2,73	0,281
72	1,68	1,58	1,37	1,69	1,60	1,58	0,129
120	0,89	1,35	0,80	0,47	1,17	0,94	0,341

^a Média, mg/L; ^b Desvio-padrão.

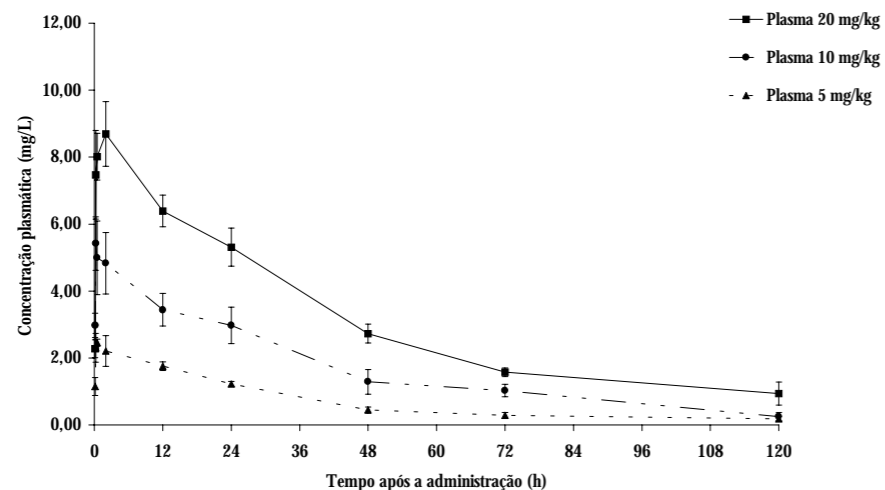


Figura R.7 Curvas plasmáticas de lamotrigina obtidas após a administração i.p. do fármaco em dose única de 5, 10 e 20 mg/kg (média ± desvio-padrão).

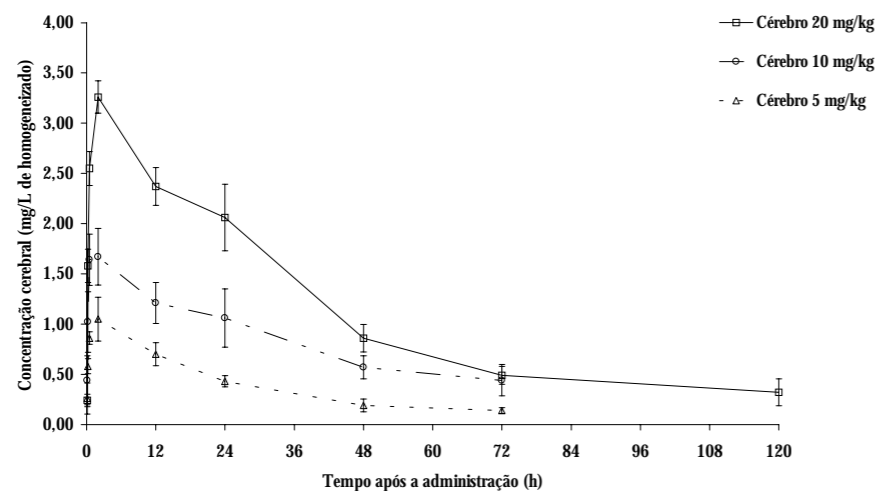


Figura R.8 Curvas cerebrais de lamotrigina obtidas após a administração i.p. do fármaco em dose única de 5, 10 e 20 mg/kg (média ± desvio-padrão).

A tabela **R.17** apresenta os valores das concentrações cerebrais de lamotrigina obtidas durante um período de 120 horas após a administração i.p. do fármaco aos animais em dose única de 5, 10 e 20 mg/kg. A figura **R.8** representa as respectivas curvas de níveis cerebrais em função do tempo.

Tabela R.17 Concentrações cerebrais de lamotrigina obtidas após a administração i.p. do fármaco em dose única de 5 mg/kg (a), 10 mg/kg (b) e 20 mg/kg (c).

(a)

Tempo (h)	Rato					M ^a	DP ^b
	1	2	3	4	5		
0,125	0,23	0,16	0,16	0,53	0,23	0,26	0,154
0,25	0,65	0,48	0,57	0,66	0,56	0,58	0,074
0,5	0,81	0,79	0,88	0,89	0,94	0,86	0,061
2	1,07	0,92	0,97	1,41	0,86	1,05	0,218
12	0,88	0,70	0,65	0,57	0,68	0,70	0,114
24	0,36	0,51	0,41	0,43	0,46	0,43	0,056
48	0,16	0,16	0,17	0,15	0,30	0,19	0,063
72	0,15	0,12	0,16	0,18	0,11	0,14	0,029
120	- *	- *	- *	- *	- *	-	-

* Concentrações cerebrais < 0,1 mg/L (limite de quantificação); ^a Média, mg/L de homogeneizado; ^b Desvio-padrão.

(b)

Tempo (h)	Rato					M ^a	DP ^b
	1	2	3	4	5		
0,125	0,29	0,80	0,58	0,24	0,28	0,44	0,244
0,25	0,51	1,01	1,10	1,28	1,19	1,02	0,301
0,5	1,59	1,47	1,33	1,86	1,93	1,64	0,255
2	1,38	1,55	1,48	2,02	1,92	1,67	0,283
12	1,27	1,19	0,96	1,52	1,13	1,21	0,205
24	0,98	1,51	1,12	0,72	0,97	1,06	0,290
48	0,61	0,64	0,43	0,70	0,47	0,57	0,115
72	0,29	0,70	0,39	0,44	0,37	0,44	0,156
120	- *	- *	- *	0,12	- *	-	-

* Concentrações cerebrais < 0,1 mg/L (limite de quantificação); ^a Média, mg/L de homogeneizado; ^b Desvio-padrão.

(c)

Tempo (h)	Rato					M ^a	DP ^b
	1	2	3	4	5		
0,125	0,30	0,27	0,29	0,17	0,18	0,24	0,062
0,25	1,65	1,67	1,75	1,33	1,50	1,58	0,166
0,5	2,81	2,55	2,45	2,36	2,56	2,55	0,169
2	3,39	3,42	3,31	3,14	3,05	3,26	0,161
12	2,20	2,46	2,66	2,29	2,26	2,37	0,187
24	1,85	2,33	1,68	1,97	2,47	2,06	0,331
48	0,74	0,88	1,00	0,98	0,70	0,86	0,136
72	0,45	0,62	0,38	0,52	0,46	0,49	0,090
120	0,26	0,56	0,23	0,28	0,29	0,32	0,134

^a Média, mg/L de homogeneizado; ^b Desvio-padrão.

2.3. Caracterização da distribuição cerebral da lamotrigina

A tabela R.18 apresenta os níveis de lamotrigina medidos nas diversas regiões cerebrais analisadas após a administração i.p. de lamotrigina na dose de 10 mg/kg. A figura R.9 representa graficamente esses resultados.

Tabela R.18 Concentrações de lamotrigina obtidas em diversas regiões cerebrais 12, 24 e 48 horas após a administração i.p. do fármaco na dose de 10 mg/kg.

Região cerebral	Concentração de lamotrigina ^a		
	12 h	24 h	48 h
Córtex frontal	1,29	1,04	0,60
Córtex restante	1,33	0,93	0,50
Cerebelo	1,49	1,13	0,64
Estriado	1,41	0,97	0,54
Hipocampo	1,43	1,01	0,64
CV ^b	5,84	7,45	10,73
IC ₉₅ ^c	1,29-1,49	0,92-1,11	0,51-0,66

^a Valor resultante da junção das respectivas regiões cerebrais provenientes de 10 animais, mg/L de homogeneizado; ^b Coeficiente de variação, %; ^c Intervalo de confiança a 95%, mg/L.

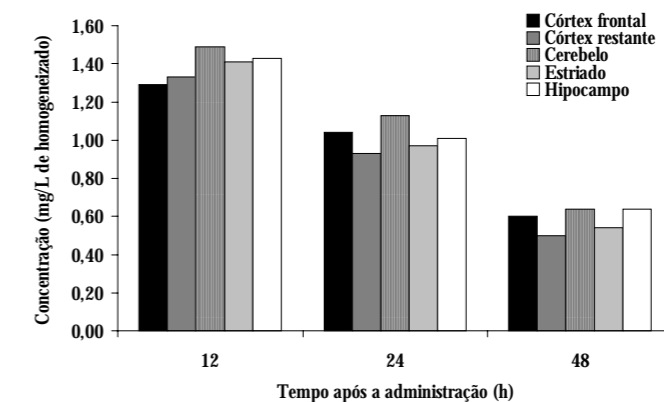


Figura R.9 Concentrações de lamotrigina obtidas após a administração i.p. do fármaco, na dose de 10 mg/kg, nas diversas regiões cerebrais. Cada valor determinado resulta da junção das respectivas regiões cerebrais provenientes de 10 animais.

3. ANÁLISE FARMACOCINÉTICA

3.1. Análise cinética da lamotrigina no plasma e no cérebro

3.1.1. Estudo da relação entre a dose administrada e os níveis de lamotrigina obtidos

Apresentam-se, em seguida, os resultados do estudo sobre a influência da dose nos níveis plasmáticos de lamotrigina: a tabela R.19 apresenta os resultados das análises de regressão efectuadas; a tabela R.20 refere-se à dispersão dos valores de área sob a curva normalizados pela dose; a tabela R.21 apresenta os resultados obtidos na análise de variância.

Tabela R.19 Análise de regressão entre: dose e área sob a curva de concentrações plasmáticas *versus* tempo (a); dose e concentração média máxima (b); dose e concentração média a cada tempo de amostragem (c); perfis de concentrações médias plasmáticas *versus* tempo a partir das 0,25 h (d).

(a)

Dose ^a	AUC ^b	Análise de regressão
5	87,57	
10	201,21	$y = 21,217x - 15,493$
20	407,34	$r^2 = 0,999^c$

^a mg/kg; ^b Área sob a curva, mg.h/L; ^c Coeficiente de determinação.

(b)

Dose ^a	C _{máx} ^b	Análise de regressão
5	2,46	
10	5,42	$y = 0,403x + 0,825$
20	8,69	$r^2 = 0,974^c$

^a mg/kg; ^b Concentração máxima, mg/L; ^c Coeficiente de determinação.

(c)

Tempo ^a	Análise de regressão	Coeficiente de determinação
0,125	$y = 0,055x + 1,500$	$r^2 = 0,204$
0,25	$y = 0,324x + 1,285$	$r^2 = 0,908$
0,5	$y = 0,360x + 0,950$	$r^2 = 0,981$
2	$y = 0,425x + 0,280$	$r^2 = 0,994$
12	$y = 0,307x + 0,285$	$r^2 = 0,999$
24	$y = 0,266x + 0,065$	$r^2 = 0,988$
48	$y = 0,151x - 0,270$	$r^2 = 0,998$
72	$y = 0,082x + 0,015$	$r^2 = 0,926$
120	$y = 0,053x - 0,155$	$r^2 = 0,933$

^a h.

(d)

Doses ^a	Análise de regressão	Coeficiente de determinação
5 e 10	$y = 2,062x + 0,219$	$r^2 = 0,975$
5 e 20	$y = 3,114x + 0,898$	$r^2 = 0,963$
10 e 20	$y = 1,482x + 0,652$	$r^2 = 0,951$

^a mg/kg.

Tabela R.20 Coeficiente de variação dos valores de área sob a curva de concentrações plasmáticas *versus* tempo normalizados pela dose.

Dose ^a	AUC / D ^b	CV ^c
5	17,51	
10	20,12	8,18
20	20,37	

^a mg/kg; ^b Área sob a curva normalizada pela dose, kg.h/L; ^c Coeficiente de variação, %.

Tabela R.21 Análise de variância das concentrações plasmáticas normalizadas pela dose a cada tempo de amostragem.

Tempo ^a	Dose ^b	Rato					Significado estatístico ^c
		1	2	3	4	5	
0,125	5	0,282	0,274	0,234	0,150	0,212	p < 0,05
	10	0,283	0,305	0,302	0,349	0,249	
	20	0,109	0,122	0,117	0,094	0,129	
0,25	5	0,562	0,442	0,544	0,376	0,390	p < 0,05
	10	0,467	0,507	0,512	0,549	0,675	
	20	0,426	0,306	0,456	0,316	0,364	
0,5	5	0,496	0,490	0,494	0,520	0,462	NS
	10	0,426	0,400	0,480	0,508	0,680	
	20	0,450	0,400	0,394	0,406	0,352	
2	5	0,596	0,438	0,412	0,356	0,404	NS
	10	0,397	0,470	0,395	0,560	0,594	
	20	0,436	0,515	0,396	0,428	0,399	
12	5	0,374	0,380	0,338	0,316	0,350	NS
	10	0,357	0,313	0,378	0,395	0,276	
	20	0,278	0,326	0,337	0,332	0,324	
24	5	0,248	0,230	0,234	0,252	0,264	NS
	10	0,339	0,288	0,304	0,211	0,348	
	20	0,260	0,312	0,242	0,244	0,268	

48	5	0,112	0,102	0,066	0,084	0,084	p < 0,05
	10	0,143	0,168	0,081	0,098	0,153	
	20	0,132	0,124	0,150	0,124	0,152	
72	5	0,070	0,048	0,080	0,034	0,054	p < 0,05
	10	0,088	0,132	0,111	0,086	0,097	
	20	0,084	0,079	0,068	0,084	0,080	
120	5	0,054	- *	0,024	- *	0,036	NS
	10	0,045	0,031	0,011	0,020	0,018	
	20	0,044	0,068	0,040	0,024	0,058	

^a h; ^b mg/kg; ^c NS, estatisticamente não significativo ($p > 0,05$);
* Concentrações plasmáticas < 0,1 mg/L (limite de quantificação).

As tabelas seguintes apresentam os resultados do estudo sobre a influência da dose nos níveis cerebrais de lamotrigina: a tabela R.22 apresenta os resultados das análises de regressão efectuadas; a tabela R.23 refere-se à dispersão dos valores de área sob a curva normalizados pela dose; a tabela R.24 apresenta os resultados obtidos na análise de variância.

Tabela R.22 Análise de regressão entre: dose e área sob a curva de concentrações cerebrais *versus* tempo (a); dose e concentração média máxima (b); dose e concentração média a cada tempo de amostragem (c); perfis de concentrações médias cerebrais *versus* tempo a partir das 0,5 h (d).

(a)

Dose ^a	AUC ^b	Análise de regressão
5	32,44	$y = 7,039x + 3,711$ $r^2 = 0,975^c$
10	83,79	
20	141,26	

^a mg/kg; ^b Área sob a curva, mg.h/L; ^c Coeficiente de determinação.

(b)

Dose ^a	C _{máx} ^b	Análise de regressão
5	1,05	
10	1,67	$y = 0,149x + 0,255$
20	3,26	$r^2 = 0,997^c$

^a mg/kg; ^b Concentração máxima, mg/L de homogeneizado; ^c Coeficiente de determinação.

(c)

Tempo ^a	Análise de regressão	Coeficiente de determinação
0,125	$y = -0,004x + 0,360$	$r^2 = 0,077$
0,25	$y = 0,065x + 0,300$	$r^2 = 0,985$
0,5	$y = 0,110x + 0,405$	$r^2 = 0,979$
2	$y = 0,149x + 0,255$	$r^2 = 0,997$
12	$y = 0,112x + 0,120$	$r^2 = 0,999$
24	$y = 0,107x - 0,070$	$r^2 = 0,996$
48	$y = 0,042x + 0,045$	$r^2 = 0,930$
72	$y = 0,021x + 0,115$	$r^2 = 0,698$
120	-	-

^a h.

(d)

Doses ^a	Análise de regressão	Coeficiente de determinação
5 e 10	$y = 1,376x + 0,326$	$r^2 = 0,955$
5 e 20	$y = 2,770x + 0,376$	$r^2 = 0,934$
10 e 20	$y = 1,970x - 0,233$	$r^2 = 0,937$

^a mg/kg.

Tabela R.23 Coeficiente de variação dos valores de área sob a curva de concentrações cerebrais versus tempo normalizados pela dose.

Dose ^a	AUC / D ^b	CV ^c
5	6,49	
10	8,38	13,26
20	7,06	

^a mg/kg; ^b Área sob a curva normalizada pela dose, kg.h/L; ^c Coeficiente de variação, %.

Tabela R.24 Análise de variância das concentrações cerebrais normalizadas pela dose a cada tempo de amostragem.

Tempo ^a	Dose ^b	Rato					Significado estatístico ^c
		1	2	3	4	5	
0,125	5	0,046	0,032	0,032	0,106	0,046	p < 0,05
	10	0,029	0,080	0,058	0,024	0,028	
	20	0,015	0,014	0,014	0,008	0,009	
0,25	5	0,130	0,096	0,114	0,132	0,112	p < 0,05
	10	0,051	0,101	0,110	0,128	0,119	
	20	0,082	0,084	0,088	0,066	0,075	
0,5	5	0,162	0,158	0,176	0,178	0,188	p < 0,05
	10	0,159	0,147	0,133	0,186	0,193	
	20	0,140	0,128	0,122	0,118	0,128	
2	5	0,214	0,184	0,194	0,282	0,172	NS
	10	0,138	0,155	0,148	0,202	0,192	
	20	0,170	0,171	0,166	0,157	0,152	
12	5	0,176	0,140	0,130	0,114	0,136	NS
	10	0,127	0,119	0,960	0,152	0,113	
	20	0,110	0,123	0,133	0,114	0,113	
24	5	0,072	0,102	0,082	0,086	0,092	NS
	10	0,098	0,151	0,112	0,072	0,097	
	20	0,092	0,116	0,084	0,098	0,124	

48	5	0,032	0,032	0,034	0,030	0,060	p < 0,05
	10	0,061	0,064	0,043	0,070	0,047	
	20	0,037	0,044	0,050	0,049	0,035	
72	5	0,030	0,024	0,032	0,036	0,022	p < 0,05
	10	0,029	0,070	0,039	0,044	0,037	
	20	0,022	0,031	0,019	0,026	0,023	
120	5	- *	- *	- *	- *	- *	-
	10	- *	- *	- *	0,012	- *	
	20	0,013	0,028	0,012	0,014	0,014	

^a h; ^b mg/kg; ^c NS, estatisticamente não significativo ($p > 0,05$);
* Concentrações cerebrais < 0,1 mg/L (limite de quantificação).

3.1.2. Análise compartimental

Representam-se, na tabela R.25, as equações biexponenciais que melhor ajustaram os níveis plasmáticos de lamotrigina obtidos após a administração i.p. do fármaco nas doses de 5, 10 e 20 mg/kg. A figura R.10 representa graficamente as curvas plasmáticas ajustadas. A tabela R.26 apresenta os parâmetros farmacocinéticos estimados para a lamotrigina, nas diferentes doses utilizadas, através da análise cinética monocompartimental.

Tabela R.25 Equações biexponenciais resultantes do ajuste dos níveis plasmáticos de lamotrigina obtidos após a administração i.p. do fármaco aos ratos em dose única de 5, 10 e 20 mg/kg.

Dose (mg/kg)	Equação biexponencial
5	$C_t = 2,200.e^{-0,027.t} - 2,200.e^{-7,013.t}$
10	$C_t = 5,039.e^{-0,025.t} - 5,039.e^{-8,203.t}$
20	$C_t = 8,423.e^{-0,021.t} - 8,423.e^{-3,220.t}$

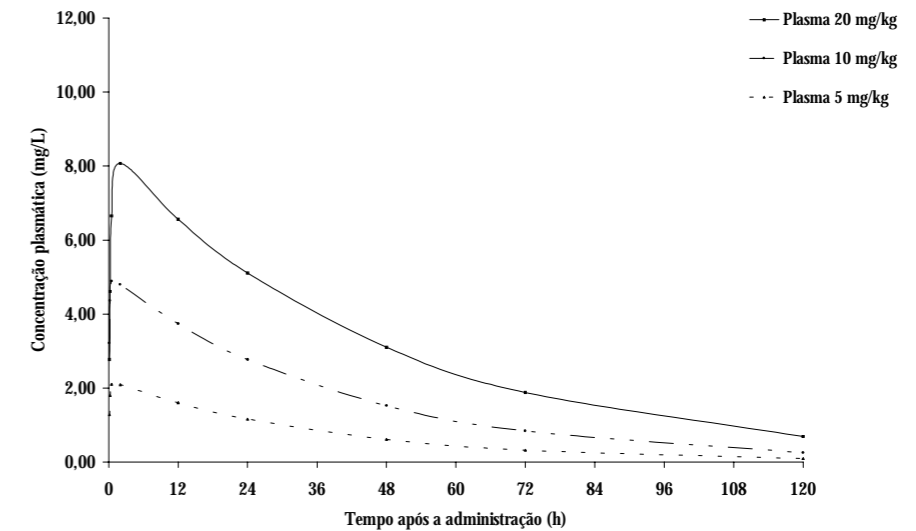


Figura R.10 Curvas plasmáticas ajustadas por equações biexponenciais para a lamotrigina nas doses de 5, 10 e 20 mg/kg.

Tabela R.26 Parâmetros farmacocinéticos da lamotrigina obtidos em ratos após a administração i.p. do fármaco em dose única de 5, 10 e 20 mg/kg, utilizando o modelo cinético monocompartimental.

Parâmetros	5 mg/kg	10 mg/kg	20 mg/kg
k_{el} (h ⁻¹)	0,027	0,025	0,021
$t_{1/2el}$ (h)	25,67	27,72	33,00
k_a (h ⁻¹)	7,01	8,20	3,22
$t_{1/2a}$ (h)	0,099	0,084	0,215
AUC_0^∞ / D (kg.h/L)	16,23	20,10	19,92
$t_{máx}$ (h)	0,80	0,71	1,57
$C_{máx}$ (mg/L)	2,14	4,94	8,10
V_d (L/kg)	2,27	1,98	2,37
CL (L/h/kg)	0,061	0,050	0,050
TMR (h)	37,18	40,12	47,93

Representam-se, na tabela R.27, as equações biexponenciais que melhor ajustaram os níveis cerebrais de lamotrigina obtidos após a administração i.p. do fármaco nas doses de 5, 10 e 20 mg/kg. A figura R.11 representa graficamente as curvas cerebrais ajustadas.

Tabela R.27 Equações biexponenciais resultantes do ajuste dos níveis cerebrais de lamotrigina obtidos após a administração i.p. do fármaco aos ratos em dose única de 5, 10 e 20 mg/kg.

Dose (mg/kg)	Equação biexponencial
5	$C_t = 1,014.e^{-0,031.t} - 1,014.e^{-2,807.t}$
10	$C_t = 1,699.e^{-0,020.t} - 1,699.e^{-2,908.t}$
20	$C_t = 3,105.e^{-0,023.t} - 3,105.e^{-0,919.t}$

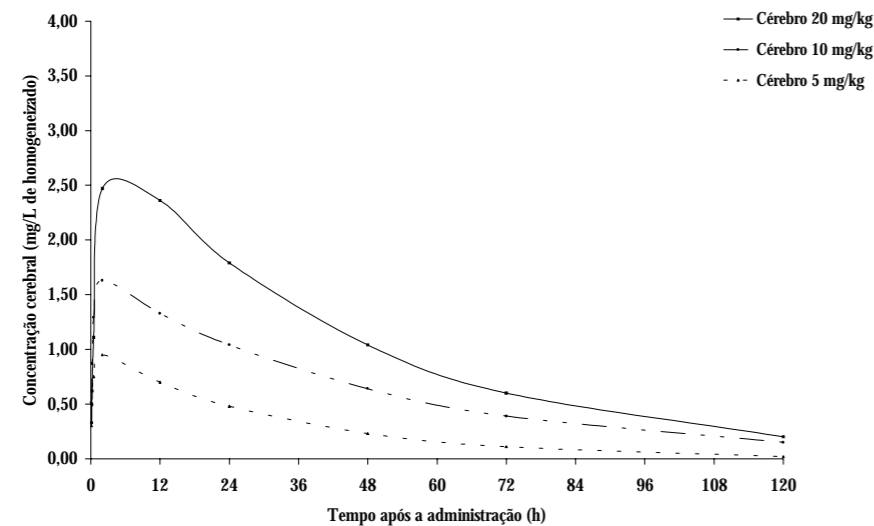


Figura R.11 Curvas cerebrais ajustadas por equações biexponenciais para a lamotrigina nas doses de 5, 10 e 20 mg/kg.

3.1.3. Análise não-compartimental

Apresentam-se, na tabela R.28, os parâmetros farmacocinéticos estimados para a lamotrigina, nas diferentes doses utilizadas, através da análise cinética independente do modelo.

Tabela R.28 Parâmetros farmacocinéticos da lamotrigina obtidos em ratos após a administração i.p. do fármaco em dose única de 5, 10 e 20 mg/kg, utilizando a análise cinética independente do modelo.

Parâmetros	5 mg/kg	10 mg/kg	20 mg/kg
k_{el} (h^{-1})	0,023	0,025	0,019
$t_{1/2}$ (h)	29,90	28,02	36,12
AUC_0^∞ / D (kg.h/L)	18,19	20,82	20,92
$t_{máx}$ (h)	0,50	0,25	2,00
$C_{máx}$ (mg/L)	2,46	5,42	8,69
V_d (L/kg)	2,37	1,93	2,49
CL (L/h/kg)	0,055	0,048	0,048
TMR (h)	43,38	39,67	51,66

Apresentam-se, na tabela R.29, os parâmetros farmacocinéticos estimados para a lamotrigina na sua passagem pelo cérebro, nas diferentes doses utilizadas, através da análise cinética independente do modelo.

Tabela R.29 Parâmetros farmacocinéticos cerebrais da lamotrigina obtidos em ratos após a administração i.p. do fármaco em dose única de 5, 10 e 20 mg/kg.

Parâmetros	5 mg/kg	10 mg/kg	20 mg/kg
λ (h^{-1})	0,029	0,019	0,020
$t_{1/2}$ (h)	24,14	35,87	34,39
AUC_0^∞ / D (kg.h/L)	6,70	8,54	7,31
$t_{máx}$ (h)	2,00	2,00	2,00
$C_{máx}$ (mg/L)	1,05	1,67	3,26
TMR (h)	34,38	52,60	48,65

3.2. Distribuição da lamotrigina entre o plasma e o cérebro

3.2.1. Estudo da relação entre níveis plasmáticos e níveis cerebrais correspondentes

A figura R.12 representa as curvas de níveis plasmáticos e cerebrais obtidos em função do tempo após a administração i.p. da lamotrigina aos ratos em dose única de 5, 10 e 20 mg/kg (valores das tabelas R.16 e R.17). A tabela R.30 apresenta os resultados das análises de regressão efectuadas.

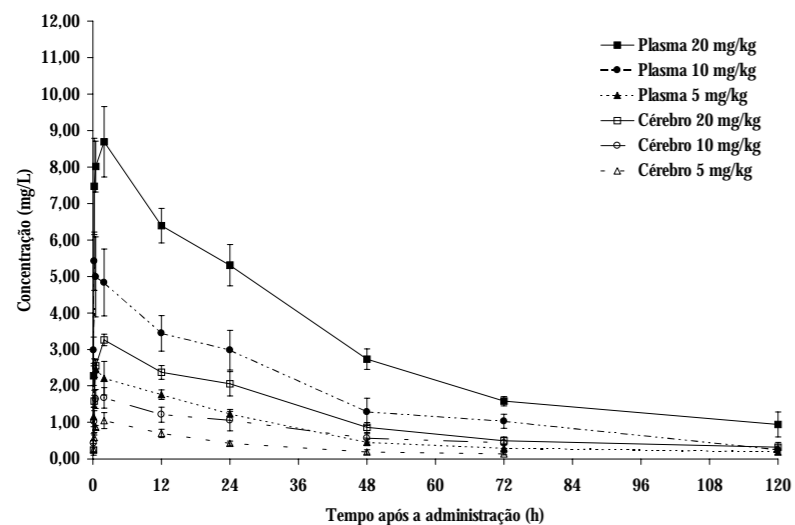


Figura R.12 Curvas plasmáticas e cerebrais obtidas após a administração i.p. da lamotrigina em dose única de 5, 10 e 20 mg/kg (média ± desvio-padrão).

Tabela R.30 Análises de regressão efectuadas entre os perfis de concentrações médias plasmáticas e cerebrais, em função do tempo, obtidos após a administração i.p. da lamotrigina a ratos em dose única de 5, 10 e 20 mg/kg.

Dose ^a	Análise de regressão		
	[0,125 – 72/120] h	[0,25 – 72/120] h	[0,5 – 72/120] h
5	$y = 0,350x + 0,007$ $r^2 = 0,792^b$	$y = 0,339x + 0,046$ $r^2 = 0,806^b$	$y = 0,394x + 0,010$ $r^2 = 0,930^b$
10	$y = 0,234x + 0,216$ $r^2 = 0,610^b$	$y = 0,223x + 0,322$ $r^2 = 0,696^b$	$y = 0,307x + 0,149$ $r^2 = 0,997^b$
20	$y = 0,342x - 0,126$ $r^2 = 0,863^b$	$y = 0,324x + 0,021$ $r^2 = 0,858^b$	$y = 0,364x - 0,046$ $r^2 = 0,978^b$

^a mg/kg; ^b Coeficiente de determinação.

A tabela R.31 apresenta os valores das razões entre as concentrações de lamotrigina no cérebro e as respectivas concentrações plasmáticas, assim como os resultados do estudo da sua dependência relativamente à dose e ao tempo. A representação gráfica das razões cérebro/plasma em função do tempo apresenta-se na figura R.13.

Tabela R.31 Valores médios das razões níveis cerebrais/níveis plasmáticos (a), com avaliação da sua dependência em relação à dose (b) e ao tempo (c) por análise de variância.

(a)

Dose ^a	Razão nível cerebral / nível plasmático ^b					
	[0,125 – 72/120] h	<i>n</i>	[0,25 – 72/120] h	<i>n</i>	[0,5 – 72/120] h	<i>n</i>
5	0,39 ± 0,178	40	0,41 ± 0,163	35	0,43 ± 0,162	30
10	0,33 ± 0,130	40	0,35 ± 0,114	35	0,38 ± 0,097	30
20	0,31 ± 0,104	45	0,33 ± 0,079	40	0,35 ± 0,069	35

^a mg/kg; ^b média ± desvio-padrão.

(b)

Tempo ^a	0,125	0,25	0,5	2	12	24	48	72	120
Significado estatístico^b	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	-

^a h; ^b NS, estatisticamente não significativo ($p > 0,05$).

(c)

Dose ^a	p ^b	Intervalo com diferenças não significativas
5	NS	[0,125-72] h (p > 0,05)
10	p < 0,05	[0,5-72] h (p > 0,05)
20	P < 0,05	[0,5-120] h (p > 0,05)

^a mg/kg; ^b [0,125-72/120] h; NS, estatisticamente não significativo (p > 0,05).

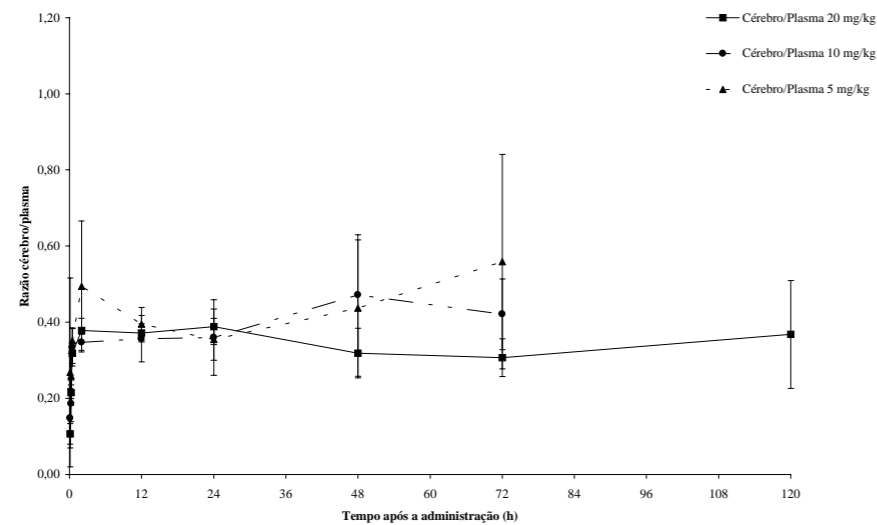


Figura R.13 Perfis das razões níveis cerebrais/níveis plasmáticos, em função do tempo, para as doses de 5, 10 e 20 mg/kg (média ± desvio-padrão).

3.2.2. Análise compartimental

Apresentam-se, na tabela R.32, os parâmetros farmacocinéticos estimados para a lamotrigina, nas diferentes doses utilizadas, através de uma análise cinética compartimental com ajuste simultâneo dos dados de níveis plasmáticos e dos dados de níveis cerebrais.

Tabela R.32 Parâmetros farmacocinéticos da lamotrigina obtidos em ratos após a administração i.p. do fármaco em dose única de 5, 10 e 20 mg/kg, utilizando o modelo cinético compartimental que considera o subcompartimento cerebral, com ajuste simultâneo dos dados plasmáticos e cerebrais: parâmetros farmacocinéticos correspondentes ao modelo monocompartimental da curva de níveis plasmáticos (a); parâmetros farmacocinéticos correspondentes ao modelo compartimental de distribuição da lamotrigina no cérebro (b).

(a)

Parâmetros	5 mg/kg	10 mg/kg	20 mg/kg
k_{el} (h ⁻¹)	0,028	0,024	0,022
$t_{1/2el}$ (h)	24,75	28,88	31,50
k_a (h ⁻¹)	6,54	8,78	3,19
$t_{1/2a}$ (h)	0,106	0,079	0,217
$AUC_{0-\infty} / D$ (kg.h/L)	16,31	20,16	19,76
t_{max} (h)	0,84	0,67	1,57
C_{max} (mg/L)	2,25	4,76	8,36
V_d (L/kg)	2,16	2,06	2,30
CL (L/h/kg)	0,061	0,050	0,050
TMR (h)	35,89	41,87	45,78

(b)

Parâmetros	5 mg/kg	10 mg/kg	20 mg/kg
CL/V (h ⁻¹)	4,63	2,46	1,97
R	0,39	0,38	0,34
K (h ⁻¹)	11,77	6,50	5,70
TMT (h)	0,085	0,154	0,175

3.2.3. Análise não-compartimental

Apresentam-se, na tabela R.33, os parâmetros farmacocinéticos estimados para a lamotrigina, nas diferentes doses utilizadas, através de uma análise cinética independente do modelo, mediante aproximação semiparamétrica e convolução combinadas com regressão não-linear (deconvolução numérica indirecta).

Tabela R.33 Parâmetros farmacocinéticos da lamotrigina obtidos em ratos após a administração i.p. do fármaco em dose única de 5, 10 e 20 mg/kg, através de uma análise por deconvolução numérica indirecta.

Parâmetros	5 mg/kg	10 mg/kg	20 mg/kg
<i>CL/V</i> (h ⁻¹)	4,64	2,47	2,40
<i>R</i>	0,40	0,37	0,34
<i>K</i> (h ⁻¹)	11,68	6,68	5,96
<i>TMT</i> (h)	0,086	0,150	0,168

V. DISCUSSÃO

1. TÉCNICA ANALÍTICA

1.1. Desenvolvimento da técnica analítica

A caracterização neurofarmacocinética da lamotrigina em ratos, pretendida com o presente trabalho de investigação, requereu o desenvolvimento de uma técnica analítica adequada à determinação dos níveis de lamotrigina atingidos no plasma e no cérebro dos animais após a administração de uma determinada dose de fármaco.

Depois de uma cuidadosa pesquisa bibliográfica, apercebemo-nos de que nenhum dos métodos que tinham sido publicados até à data era apropriado ao nosso estudo. De facto, a maioria foi desenvolvida tendo em vista a monitorização terapêutica da lamotrigina na prática clínica. Assim, tais métodos não só não abrangem o leque de concentrações por nós desejado, como, principalmente, não são adequados à quantificação de lamotrigina noutros fluidos biológicos que não sejam o plasma ou o soro. Já depois de termos iniciado o desenvolvimento da presente técnica, foi publicada por Ren, Scheuer e Zheng (1998) uma nova técnica para determinação de lamotrigina em diversas matrizes biológicas, como sejam o plasma, a urina e o homogeneizado de cérebro. Até ao presente, não temos conhecimento da publicação de nenhuma outra técnica para a quantificação deste antiepiléptico em plasma e em cérebro de rato.

A técnica por nós desenvolvida (CASTEL-BRANCO *et al.*, 2001) envolve um sistema de HPLC de fase reversa, que é de utilização comum na prática laboratorial. As condições cromatográficas são simples, não exigindo cuidados especiais. O tempo de análise é curto, uma vez que a lamotrigina é detectada antes de terem decorrido 10 minutos após a sua injeção no sistema cromatográfico. A detecção a 306 nanómetros elimina a maioria

dos eventuais interferentes provenientes das próprias matrizes biológicas. A preparação das amostras segue um método de extracção líquido-líquido simples e de custos baixos. Por fim, a possibilidade de aplicação da presente técnica à determinação quase simultânea de lamotrigina em plasma e em cérebro abre portas a inúmeros estudos de investigação experimental com utilização deste antiepiléptico.

1.2. Validação da técnica analítica

A validação de métodos analíticos é universalmente aceite e reconhecida como sendo uma etapa importante do desenvolvimento e utilização dos ditos procedimentos. É através da validação do método que se assegura a sua adequação àquilo que se pretende, o que constitui um passo decisivo na interpretação correcta dos resultados. Actualmente, qualquer método analítico que se pretende utilizar na investigação básica, na indústria ou na prática laboratorial necessita de ser acompanhado por um relatório de validação que comprove a sua idoneidade.

Contudo, se, por um lado, a validação é indiscutivelmente recomendada por todos os autores, já em relação aos mecanismos necessários para a sua realização, mediante a execução de um protocolo rigoroso e efectivo, não existe uma posição unânime. A existência de uma grande diversidade de métodos analíticos, com um leque vastíssimo de aplicações, dificulta a elaboração de um protocolo de aplicação universal, uma vez que este deve ser o mais adequado possível ao método em causa. Porém, mesmo quando são limitadas a determinados campos de trabalho, as orientações existentes são, muitas vezes, vagas, imprecisas e confusas. Jenke (1996a) fez uma revisão da literatura dedicada à validação de métodos analíticos e concluiu que não existem orientações concretas que

respondam às questões com que, na prática, se depara o analista quando pretende validar uma determinada técnica: que parâmetros de validação se devem utilizar nesta situação? Que procedimentos se devem executar na avaliação de cada parâmetro seleccionado? Que critérios de aceitação se devem ter em conta para cada parâmetro?

Foi perante uma situação semelhante que, colocando as mesmas questões, partimos para uma pesquisa bibliográfica intensa, em busca de orientações concretas para o nosso trabalho. No âmbito dos métodos bioanalíticos – dado pretendermos validar uma técnica cromatográfica para a quantificação de um fármaco em fluidos biológicos –, encontramos um documento que viria a servir de base e inspiração a todo o processo de validação: o relatório da conferência sobre *validação de métodos analíticos em estudos de biodisponibilidade, bioequivalência e farmacocinética*, que se realizou em Washington, em Dezembro de 1990. Este relatório, que está publicado em diversas revistas científicas (SHAH *et al.*, 1991, 1992a e 1992b), apresenta as principais questões e orientações discutidas na conferência, procurando definir princípios orientadores para a validação de métodos bioanalíticos.

Mas se o referido documento indica procedimentos concretos para o estudo dos parâmetros mais habituais nos protocolos de validação, já a referência a estudos mais específicos – como a utilização do modelo de regressão linear ponderada, o estudo da eficácia da extracção, a determinação do limite de detecção ou a avaliação da estabilidade do analito na matriz biológica – é escassa e insuficiente. Por este motivo, para a elaboração do presente protocolo de validação, em busca de orientações concretas, tivemos necessidade de recorrer também aos trabalhos originais publicados por outros autores (GARDEN, MITCHELL e MILLS, 1980; JOHNSON *et al.*, 1988; MEHTA, 1989; CARDONE, WILLAVIZE e LACY, 1990; LANG e BOLTON, 1991; HOOPER, 1995; WIELING *et al.*, 1996; entre outros).

1. Especificidade e selectividade

A técnica demonstrou ser específica e selectiva para a quantificação da lamotrigina em plasma e em homogeneizado de cérebro de rato. Nos tempos de retenção característicos da lamotrigina e do seu análogo estrutural não foram detectados picos provenientes das matrizes biológicas utilizadas, de que são exemplo os cromatogramas apresentados na figura R.2. Os fármacos analisados também não revelaram qualquer pico cromatográfico a esses tempos de retenção.

As elevadas especificidade e selectividade da técnica foram conseguidas através da conjugação de diversos factores. Por um lado, uma criteriosa selecção da coluna e da fase móvel foi capaz de promover uma separação adequada dos diferentes componentes. Por outro lado, o comprimento de onda utilizado na detecção do analito – 306 nanómetros – constituiu, por si só, um factor capaz de eliminar uma grande parte dos interferentes potenciais, por a maioria dos compostos não absorver radiação nesta zona do espectro (contrariamente ao que acontece abaixo dos 240 nm). A utilização deste comprimento de onda foi possível devido ao facto de a lamotrigina, para além de absorver a radiação abaixo dos 240 nm, apresentar uma outra zona de absorção entre os 280 nm e os 340 nm, com o pico a situar-se por volta dos 305 nm, conforme se encontra descrito na literatura (RAMACHANDRAN, UNDERHILL e JONES, 1994) e foi comprovado por nós através de um varrimento do espectro de absorção do fármaco entre 200 nm e 400 nm.

2. Linearidade

O intervalo de concentrações considerado para a quantificação da lamotrigina em amostras de plasma (0,1–15,0 mg/L) e de cérebro (0,1–5,0 mg/L de homogeneizado) revelou ser adequado à prática laboratorial, abrangendo a quase totalidade das concentrações determinadas. Apenas algumas amostras, obtidas cinco dias após a administração intraperitoneal da lamotrigina ao animal, se encontraram abaixo do limite de quantificação da técnica.

A aplicação do modelo de regressão linear ponderada ao ajuste dos dados permitiu obter uma maior exactidão dos resultados, principalmente nas concentrações mais baixas. De facto, ao contrariar a maior influência que as concentrações mais elevadas têm na definição da equação da recta, por apresentarem maiores variâncias do que as concentrações mais baixas, a ponderação permite calibrar, com um grau de exactidão mais elevado, uma gama de concentrações mais alargada (ALMEIDA, CASTEL-BRANCO e FALCÃO, 2002). A tabela D.1, que apresenta os níveis de exactidão obtidos com a aplicação da regressão linear convencional e da regressão linear ponderada aos dados dos ensaios interdia do plasma e do homogeneizado de cérebro, demonstra claramente a melhoria da exactidão dos resultados na porção mais baixa da recta.

Tabela D.1 Comparação da exactidão obtida através da aplicação da regressão linear simples ($w_i = 1$) e da regressão linear ponderada ($w_i = 1/x^2$) aos dados do ensaio interdia do plasma (a).

$C_{teórica}^a$	Recta não-ponderada ($w_i = 1$)	Recta ponderada ($w_i = 1/x^2$)
	$y = 0,255x + 0,034$	$y = 0,264x + 0,007$
	Bias^b	Bias^b
0,1	-103,24	-0,33
0,5	-16,30	+1,44
2,5	+1,12	+1,82
5,0	+2,88	+1,46
10,0	+1,89	-0,52
15,0	-1,14	-3,79
Média	-19,132	+0,013

^a mg/L; ^b Bias, %.

Tabela D.1 Comparação da exactidão obtida através da aplicação da regressão linear simples ($w_i = 1$) e da regressão linear ponderada ($w_i = 1/x^2$) aos dados do ensaio interdia do homogeneizado de cérebro (b).

$C_{teórica}^a$	Recta não-ponderada ($w_i = 1$)	Recta ponderada ($w_i = 1/x^2$)
	$y = 0,266x - 0,002$	$y = 0,263x + 0,003$
	Bias^b	Bias^b
0,1	+18,58	-0,63
0,5	+7,75	+4,83
1,0	-2,72	-3,70
3,0	-2,60	-2,21
5,0	+0,95	+1,65
Média	+4,391	-0,012

^a mg/L; ^b Bias, %.

A qualidade do ajuste foi confirmada, por qualquer um dos processos utilizados, em todos os ensaios:

> Uma primeira indicação do correcto ajuste dos dados foi obtida através dos valores determinados de coeficiente de correlação: em qualquer dos ensaios, o coeficiente de correlação foi sempre superior a 0,98 (tabela R.7), valor que assumimos como sendo aquele a partir do qual se pode considerar a existência de uma correlação bem definida.

> Uma outra demonstração da qualidade do ajuste foi obtida através dos valores assumidos pela percentagem de erro relativo, que compara a concentração obtida através da equação da recta com a concentração teórica do padrão de calibração correspondente. Por definição, quanto mais baixa for a soma dos valores absolutos da percentagem de erro relativo e quanto mais uniformemente os valores da percentagem de erro relativo se distribuírem em redor do eixo das concentrações (em forma de banda horizontal), tanto melhor será o ajuste dos dados conseguido pelo modelo considerado. Na tabela D.2, comparam-se, para todos os ensaios efectuados, os valores das somas calculadas para o modelo de regressão linear simples e para o modelo de regressão linear ponderada com $w_i = 1/x^2$. Na figura D.1, apresentam-se os resultados gráficos da distribuição dos valores de percentagem de erro relativo para o modelo de regressão linear simples, que se podem comparar com os gráficos das figuras R.3 e R.4. Os resultados obtidos pelos dois processos confirmam a correcção do ajuste dos dados pelo modelo de ponderação escolhido.

> A confirmação da qualidade do ajuste foi ainda feita através da detecção de pontos fora da recta (*outliers*): a sua presença não ultrapassou, em qualquer dos ensaios realizados, o número de dois pontos não consecutivos, o que é considerado como sendo o limite máximo aceitável em face dos critérios de validação preestabelecidos.

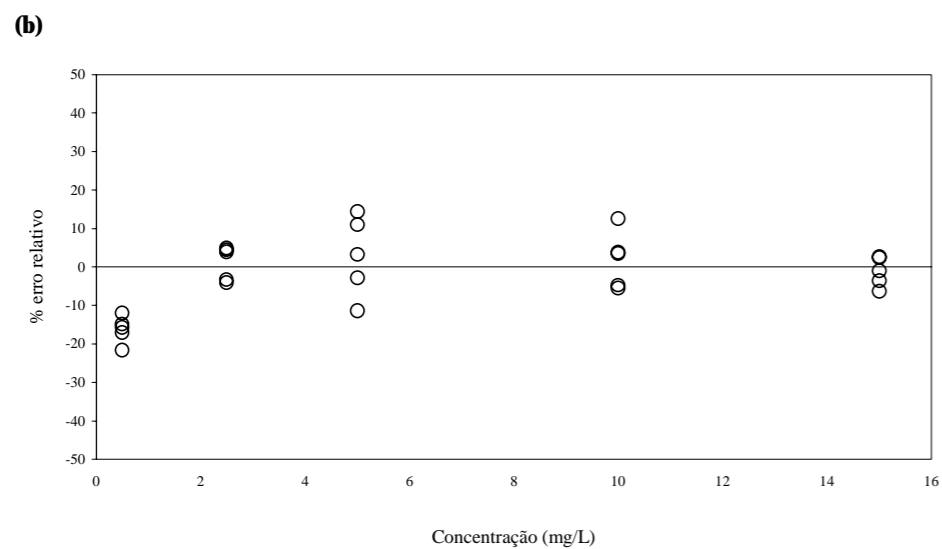
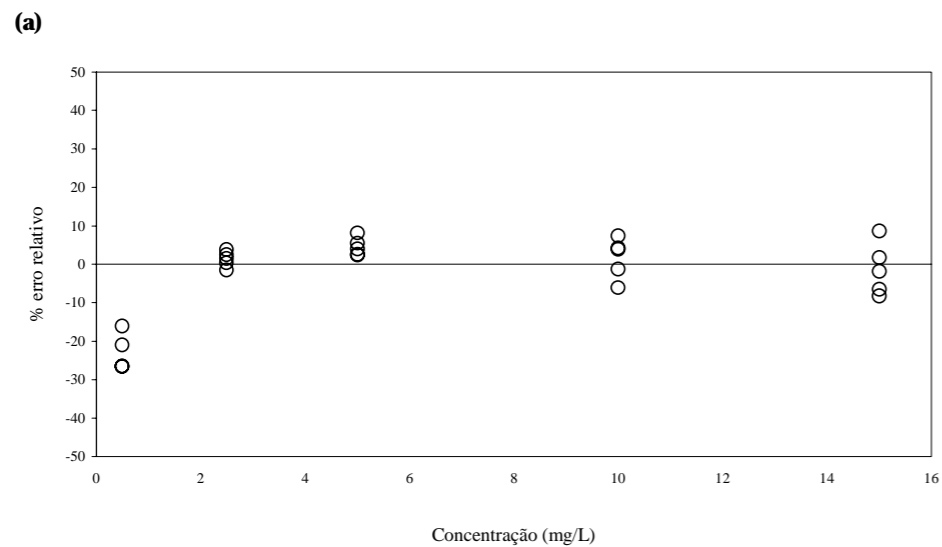


Figura D.1.1 Distribuição dos valores da percentagem de erro relativo em função do eixo das concentrações para o modelo de regressão linear simples ($w_i = 1$), nos ensaios intradia (a) e interdia (b) do plasma.

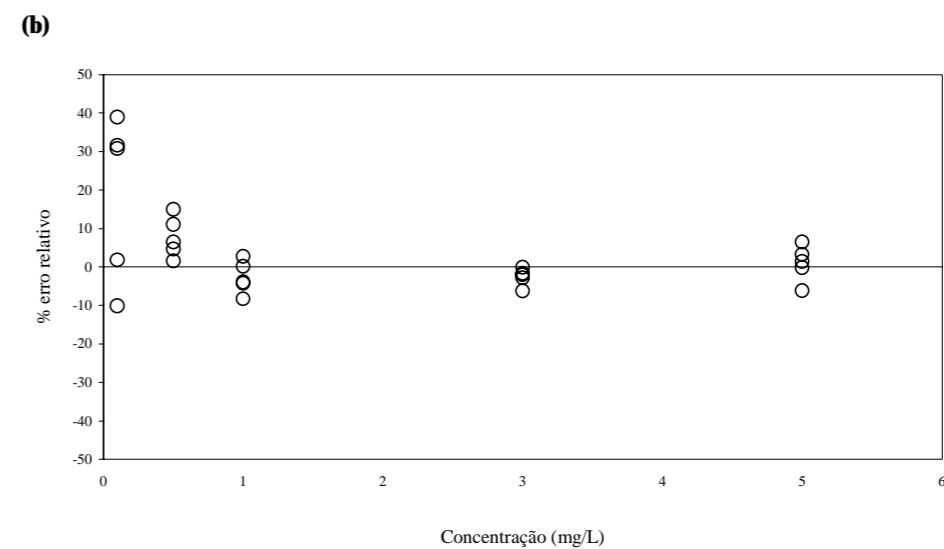
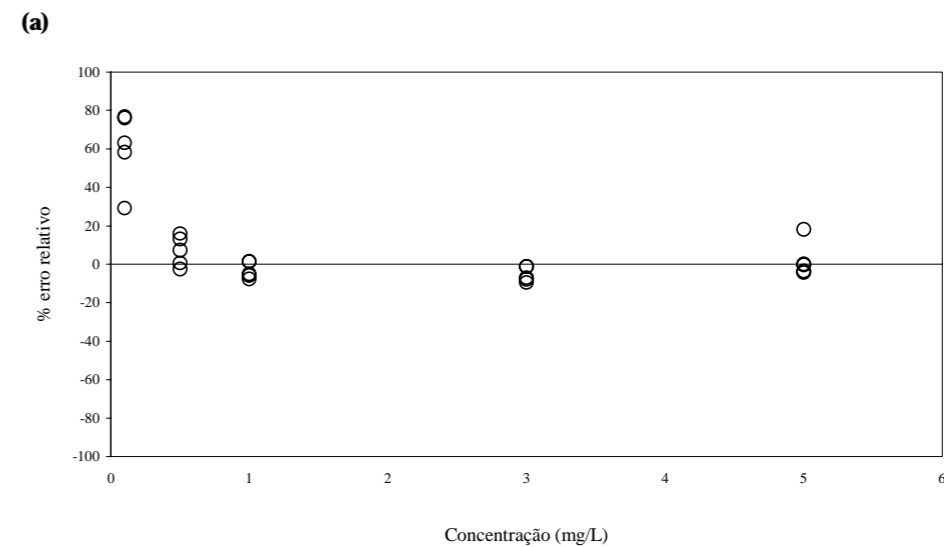


Figura D.1.2 Distribuição dos valores da percentagem de erro relativo em função do eixo das concentrações para o modelo de regressão linear simples ($w_i = 1$), nos ensaios intradia (a) e interdia (b) do homogeneizado de cérebro.

3. Precisão

Todos os valores calculados para o coeficiente de variação encontram-se dentro dos limites assumidos em face do critério de aceitação preestabelecido para este parâmetro: em nenhum dos ensaios ultrapassam o valor de 15%, com excepção dos resultados correspondentes ao padrão de calibração de 0,1 mg/L, que, quando preparado em homogeneizado de cérebro, apresenta uma dispersão de resultados, expressa em valores de coeficiente de variação, situada entre os 15% e os 20% (tabela R.8).

4. Exactidão

Todos os valores calculados para o *bias* encontram-se dentro dos limites assumidos como critério de aceitação deste parâmetro: em nenhum dos ensaios ultrapassam o

Tabela D.2 Somas dos valores absolutos da percentagem de erro relativo ($\Sigma \%ER$) calculadas para os modelos de regressão linear simples ($w_i = 1$) e de regressão linear ponderada ($w_i = 1/x^2$) nos ensaios intradia e interdia do plasma (a).

Ensaio	Recta não-ponderada ($w_i = 1$)	Recta ponderada ($w_i = 1/x^2$)
	$y = 0,255x + 0,034$	$y = 0,264x + 0,007$
$\Sigma \%ER^a$		
Intradia	788,90	112,38
Interdia	707,36	179,34

^aSoma da percentagem de erros relativos.

valor de 15% ou de 20%, no caso do padrão mais baixo (tabela R.9). Os resultados do teste estatístico *t* de *Student* emparelhado confirmam a boa exactidão da técnica analítica em qualquer uma das matrizes biológicas estudadas.

5. Eficácia da extracção

A recuperação absoluta da lamotrigina, na presença de padrão interno, apresenta, em qualquer uma das matrizes biológicas estudadas, valores médios superiores a 80%. A reprodutibilidade destes valores, avaliada através do cálculo do valor de coeficiente de variação respectivo, é aceitável, dado situar-se abaixo dos 15% em qualquer uma das matrizes (tabela R.10). Os resultados obtidos com o padrão interno isolado não se revelam muito díspares destes, assegurando, conjuntamente, o bom rendimento do processo de preparação das amostras para a análise cromatográfica.

Tabela D.2 Somas dos valores absolutos da percentagem de erro relativo ($\Sigma \%ER$) calculadas para os modelos de regressão linear simples ($w_i = 1$) e de regressão linear ponderada ($w_i = 1/x^2$) nos ensaios intradia e interdia do homogeneizado de cérebro (b).

Ensaio	Recta não-ponderada ($w_i = 1$)	Recta ponderada ($w_i = 1/x^2$)
	$y = 0,266x - 0,002$	$y = 0,263x + 0,003$
$\Sigma \%ER^a$		
Intradia	417,27	182,17
Interdia	201,83	171,61

^aSoma da percentagem de erros relativos.

6. Sensibilidade, limite de detecção e limite de quantificação

No que respeita aos limites de detecção e quantificação, a literatura é, por vezes, controversa, apresentando variadíssimas maneiras de se proceder à sua determinação (MILLER e MILLER, 1988; JENKE, 1996b).

Devido ao facto de esta ser uma técnica para quantificação de um fármaco em matrizes biológicas, optámos por assumir a definição de limite de quantificação adoptada na conferência de Washington, que considera que o limite de quantificação, na prática, corresponde ao padrão mais baixo da recta de calibração (SHAH *et al.*, 1991). Considerámos, portanto, que, em qualquer uma das matrizes biológicas estudadas, o valor mais baixo de lamotrigina mensurável é de 0,1 mg/L.

Quanto ao limite de detecção, optámos pela sua determinação instrumental, procurando encontrar a concentração mais baixa de analito que o sistema consegue diferenciar, com alguma confiança, da própria matriz biológica. Inspirados no trabalho apresentado por Lang e Bolton (1991), seguimos o método das diluições, até encontrarmos aquela diluição para a qual já não é possível fazer a distinção entre o pico do analito e os picos característicos da matriz em causa. Considerámos, como critério de aceitação, a variabilidade da resposta cromatográfica, assumindo que já não é possível fazer uma distinção fidedigna quando o triplo do desvio-padrão das respostas é superior à média das próprias respostas. Assim, perante as diluições utilizadas, pudemos definir o limite de detecção da técnica do plasma como tendo o valor de 0,010 mg/L, e o do homogeneizado de cérebro, como tendo o valor de 0,025 mg/L (tabela R.11).

7. Estabilidade

Os resultados obtidos no estudo da estabilidade da lamotrigina em plasma e em homogeneizado de cérebro, quando o armazenamento se fez no frigorífico (4° C), observaram os critérios de aceitação preestabelecidos durante um período de, pelo menos, onze dias, para o plasma, e de três dias, para o cérebro. Quando o armazenamento se fez no congelador (-25° C), a lamotrigina revelou ser estável: no plasma, por um período de, pelo menos, mês e meio, e, no homogeneizado de cérebro, durante, pelo menos, quatorze dias (tabelas R.12 e R.13). Estes resultados asseguraram a boa prática laboratorial que seguimos durante o desenrolar do presente trabalho de investigação.

2. DESENHO EXPERIMENTAL

Antes de iniciarmos o estudo cinético propriamente dito, com vista à caracterização neurofarmacocinética da lamotrigina em animais de laboratório, procurámos otimizar as condições experimentais, de modo a assegurar a fiabilidade dos resultados.

Animais

Em primeiro lugar, procedemos à escolha da espécie animal a utilizar nas experiências. Após uma pesquisa bibliográfica sobre o assunto, concluímos facilmente que o rato (*Rattus norvegicus*) e o murganho (*Mus musculus*) são as espécies mais utilizadas em estudos experimentais com anti-epilépticos. Uma análise atenta das publicações existentes sobre a lamotrigina confirmou como boa a preferência dada a estas espécies em estudos laboratoriais. Assim, optámos pelo rato Wistar, dado mostrar-se adequado aos objectivos do trabalho e ser fácil de adquirir, manejar e controlar. Utilizámos, em todas as experiências, ratos adultos (idade superior a 4 - 6 semanas de vida, com peso compreendido entre 250 e 320 gramas), de modo a assegurar a maturação de todos os sistemas biológicos do animal, como meio de padronizar, o mais possível, os resultados. Além disso, utilizámos unicamente ratos-macho, de forma a evitar, por um lado, quaisquer interferências do ciclo menstrual das fêmeas, e, por outro lado, as diferenças farmacocinéticas que se encontram descritas para este fármaco, nesta espécie, em relação aos dois sexos (PARSONS, DICKINS e MORLEY, 1995).

Administração do fármaco

Em seguida, estudámos qual seria a melhor via para a administração da lamotrigina ao rato. Atendendo ao objectivo da caracterização do processo de distribuição da lamotrigina entre a circulação sistémica e o cérebro do rato, num esforço de estabelecimento de uma relação bem definida entre os níveis plasmáticos obtidos e a resposta farmacológica desencadeada, optámos por uma via de administração parentérica. De facto, a administração por via oral iria dificultar a chegada do fármaco à circulação sistémica, através de uma primeira etapa de absorção eventualmente demorada e acompanhada de grande variabilidade interindividual. Entre as diversas vias parentéricas possíveis, escolhemos a via intraperitoneal, por se mostrar adequada aos objectivos do estudo, dado garantir, através da elevada vascularização do peritонеu, a colocação do fármaco injectado na circulação sistémica, de forma simples e reprodutível, num curto espaço de tempo.

Anestesia

No desenho experimental da nossa investigação, procurámos também ter sempre presente o bem-estar dos animais, orientando-nos por princípios éticos universais que asseguram, em última instância, a qualidade da própria investigação. Neste contexto, demos particular atenção à necessidade do recurso à anestesia para evitar o sofrimento do animal aquando da recolha das amostras. Apesar do tempo de anestesia ser muito curto em relação à duração da experiência – 10 minutos prévios à recolha das amostras, em comparação com um período de experiência que pode ir de alguns minutos a vários dias –, procurámos escolher um anestésico que não interferisse potencialmente

com o percurso do fármaco no organismo. Após uma análise exaustiva da bibliografia existente sobre estudos cinéticos experimentais com fármacos antiepilépticos e sobre estudos relacionados especificamente com a lamotrigina, seleccionámos a associação da cetamina com a clorpromazina como solução anestésica. De facto, em relação à cetamina, que é um anestésico dissociativo bastante utilizado em experimentação animal, apenas foi demonstrado, até ao presente, que interage com a fenitoína, levando ao aumento da sua absorção, quando injectada 10-15 minutos antes da administração oral deste antiepiléptico. Quando a fenitoína é administrada por via parentérica, não é detectada qualquer interferência com a sua cinética (SECHI *et al.*, 1992). A associação com a clorpromazina teve apenas como finalidade uma acção neuroléptica cardioprotectora, de modo a que a recolha de sangue por punção cardíaca se processasse sem dificuldade. A ausência de interferência com a técnica analítica também foi tida em consideração na escolha desta mistura anestésica.

Recolha das amostras

Os tempos de amostragem foram escolhidos em função do objectivo de se alcançar um compromisso entre o número de pontos suficiente para a caracterização dos perfis desenhados em função do tempo e a utilização racional dos animais de laboratório, reduzindo-se assim ao mínimo o número de animais necessário para uma correcta interpretação dos resultados.

Quanto à escolha do anticoagulante que foi utilizado para a obtenção de plasma a partir do sangue recolhido do animal, foram tidos em conta a eventual interferência da substância com a determinação da lamotrigina ou do seu padrão interno, através da

técnica de HPLC, e o volume máximo de plasma conseguido a partir de uma mesma quantidade de sangue. Nenhum dos anticoagulantes estudados – heparina, citrato e EDTA (ácido etileno-diamino-tetracético) – mostrou interferir com a técnica analítica. No entanto, o citrato distinguiu-se das restantes substâncias por permitir obter uma quantidade maior de plasma a partir de um mesmo volume de sangue e por originar cromatogramas de plasma com menos ruído do que os resultantes da utilização dos outros anticoagulantes. Foi por estes dois motivos que o citrato foi seleccionado para a realização das experiências.

2.1. Selecção da formulação mais adequada para a administração da lamotrigina

Após termos definido as condições experimentais a utilizar, colocámo-nos uma última questão: saber qual seria a formulação mais adequada para administrar a lamotrigina aos animais, tendo em consideração a finalidade do nosso trabalho. Uma pesquisa atenta na literatura, buscando as diferentes formulações relativas à utilização da lamotrigina em animais, levou-nos a seleccionar três formulações, e, após isso, a realizar estudos preliminares com os animais, a fim de podermos optar pela mais apropriada.

Os veículos e as formulações escolhidos foram os seguintes: suspensão de lamotrigina em metilcelulose a 0,25%, que é a formulação mais utilizada nos estudos experimentais com este antiepiléptico (p. ex. MILLER *et al.*, 1986b; WHEATLEY e MILLER, 1989); solução lipofílica de lamotrigina em propilenoglicol a 50%, como é referido por Walker *et al.* (2000); solução aquosa de lamotrigina, encontrando-se esta sob a forma de isotionato de lamotrigina (WALTON *et al.*, 1996; CONROY *et al.*, 1999).

Os estudos preliminares em causa foram realizados com a administração da lamotrigina na dose de 10 mg/kg, atendendo ao facto de esta ser a dose referida para o desencadeamento da resposta anticonvulsivante no rato (WHEATLEY e MILLER, 1989). Para além disso, a escolha desta dose teve em consideração a obtenção de níveis plasmáticos semelhantes à margem terapêutica proposta para os doentes epilépticos (MORRIS *et al.*, 1998).

O objectivo destes estudos foi avaliar até que ponto a administração de lamotrigina em suspensão ou em solução e, neste último caso, conforme seja em solução lipofílica ou em solução aquosa, origina níveis plasmáticos e cerebrais diferentes. A análise dos resultados permitiu concluir que:

> A magnitude da absorção, medida através do valor de área sob a curva de níveis plasmáticos ou cerebrais em função do tempo, é semelhante para as diferentes formulações utilizadas. De facto, quer os valores de coeficiente de variação determinados para cada tecido – 7,20% e 8,78%, respectivamente, para o plasma e para o cérebro – quer os intervalos de confiança determinados com um grau de significância de 95% – [112,46-161,44] mg.h/L para o plasma e [37,96-59,13] mg.h/L para o cérebro – revelam não existir diferenças significativas entre os valores de área sob a curva determinados para cada tecido.

> A velocidade da absorção, pelo contrário, difere nas três formulações utilizadas. De facto, detectam-se de umas para outras diferenças significativas entre os níveis de lamotrigina que foram medidos durante as duas primeiras horas de amostragem (tabelas R.14 e R.15). A análise dos valores obtidos permite localizar o pico plasmático da lamotrigina, quando foi administrada em solução aquosa, logo ao primeiro tempo de amostragem, ou seja, 15 minutos após a injeção do fármaco.

Por sua vez, o máximo cerebral pode considerar-se atingido ao fim de 30 minutos após a administração da lamotrigina, visto os valores obtidos aos 2º e 3º tempos de amostragem não apresentarem diferenças significativas entre si (ANOVA, $p > 0,05$). No que respeita às outras formulações, apenas se atingem os máximos plasmáticos e cerebrais 2 horas após a administração da lamotrigina, não sendo possível, em nenhuma das situações, distinguir o momento em que ocorre o máximo plasmático do momento em que ocorre o máximo cerebral. Assim, em qualquer um destes casos, a entrada do fármaco no cérebro assume como passo-limitante a entrada do fármaco, que vem do peritoneu, na circulação sistémica. A representação gráfica mais pormenorizada dos níveis de lamotrigina medidos no plasma e no cérebro dos animais durante as duas primeiras horas de amostragem é apresentada na figura D.2.

A solução aquosa de lamotrigina (isotionato de lamotrigina dissolvido em água destilada) demonstrou ser a mais adequada para a realização dos estudos cinéticos pretendidos: por um lado, é a única que permite caracterizar a passagem da lamotrigina do plasma para o cérebro, ao conseguir diferenciar a parte inicial das duas curvas traçadas; por outro lado, encontra-se-lhe associada uma menor dispersão dos valores medidos, o que possibilita uma maior reprodutibilidade dos resultados.

Esta conclusão era, de certo modo, esperada, atendendo às características físico-químicas das formulações. De facto, às suspensões está, normalmente, associada uma absorção mais lenta, como consequência da maior dificuldade manifestada pelas partículas em atravessarem o peritoneu. Por sua vez, a absorção de um fármaco a partir de uma solução lipofílica também se encontra, geralmente, retardada, devido à libertação mais lenta do fármaco a partir do veículo lipófilo onde se encontra dissolvido (LÖSCHER, NOLTING e FASSBENDER, 1990).

Note-se, no entanto, que, no caso da solução aquosa de lamotrigina, a passagem do fármaco do peritoneu para a corrente sanguínea, apesar de não ser um passo-limitante do processo, só se pode considerar completa a partir das 2 horas de amostragem, uma vez que só a partir desse ponto os níveis plasmáticos medidos começam a decrescer de modo significativo (ANOVA, $p > 0,05$ para os três primeiros tempos de amostragem). Como consequência, os níveis cerebrais são mantidos num patamar máximo até os níveis plasmáticos começarem a diminuir, ou seja, entre os 30 minutos e as 2 horas após a administração do fármaco.

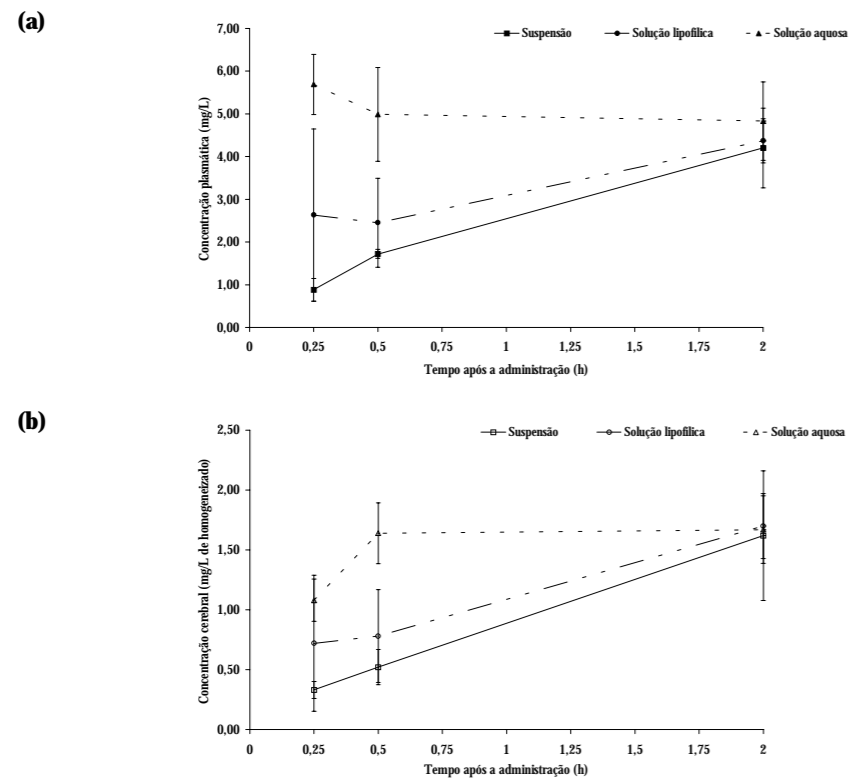


Figura D.2 Níveis plasmáticos (a) e cerebrais (b) de lamotrigina obtidos durante as primeiras 2 horas após a administração i.p. do fármaco, em dose única de 10 mg/kg, sob a forma de suspensão, solução lipofílica e solução aquosa (média \pm desvio-padrão).

2.2. Caracterização da cinética plasmática e cerebral da lamotrigina

Após ser administrada aos ratos, por via intraperitoneal e sob a forma de solução aquosa, a lamotrigina atinge rapidamente níveis máximos no plasma e no cérebro, o que é indicador, respectivamente, de uma rápida absorção a partir da cavidade intraperitoneal e de uma fácil penetração através da barreira hematoencefálica. Estas observações são comparáveis às de Walton *et al.* (1996) e às de Walker *et al.* (2000).

Depois de serem atingidos os níveis máximos, os perfis plasmáticos e cerebrais da lamotrigina em função do tempo apresentam uma descida monoexponencial. Verifica-se que o decréscimo das curvas do plasma e do cérebro ocorre em paralelo, o que indica que a distribuição da lamotrigina entre o plasma e o cérebro é limitada pelo fluxo sanguíneo e não pela permeabilidade da membrana. Pode-se, por isso, esperar que a passagem da lamotrigina através da barreira hematoencefálica se faça por difusão simples. A ausência de uma retenção excessiva do fármaco por parte do tecido cerebral está de acordo com Parsons, Dickins e Morley (1995), quando estes autores referem que a velocidade de eliminação da lamotrigina a partir dos diversos tecidos é comparável à do plasma, com exceção dos rins e dos tecidos que contêm melanina.

Os resultados obtidos nesta etapa serão discutidos mais adiante sob a perspectiva de uma análise farmacocinética (página 230 e seguintes).

2.3. Caracterização da distribuição cerebral da lamotrigina

Através da quantificação da lamotrigina em diversas regiões cerebrais, procurámos saber se a distribuição cerebral deste antiepiléptico se processa de forma uniforme ou, pelo contrário, se a lamotrigina se concentra preferencialmente em determinadas regiões do cérebro.

Para este estudo foram considerados suficientes apenas três tempos de amostragem: 12, 24 e 48 horas após a administração da lamotrigina. A escolha destes tempos teve em consideração o final da fase de incorporação da lamotrigina no cérebro e o início da fase de eliminação, durante os quais ocorre a distribuição do fármaco no organismo e pode ter lugar uma maior retenção do fármaco num determinado tecido.

Os resultados obtidos revelam que a lamotrigina se distribui de forma homogénea no cérebro do rato. De facto, a pequena dispersão dos valores obtidos nas diferentes regiões cerebrais – expressa pelos baixos valores de coeficiente de variação calculados e pela dimensão dos intervalos de confiança determinados com um grau de significância de 95% (tabela R.18) – é indicadora da ausência de diferenças significativas entre os níveis de lamotrigina determinados nas diferentes regiões cerebrais a cada tempo de amostragem.

Além disso, também não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas (teste Mann-Whitney U, $p > 0,05$) entre os níveis de lamotrigina medidos nas diferentes regiões cerebrais e a concentração previamente obtida na análise do cérebro total para a mesma dose administrada e a idêntico tempo de amostragem. A figura D.3 expressa esta comparação através da representação, num mesmo gráfico, dos valores obtidos nas diferentes fracções e os correspondentes níveis medidos no cérebro total de um outro conjunto de ratos.

Este perfil homogéneo de distribuição cerebral encontrado na lamotrigina difere do perfil descrito para a fenitoína, que é um antiepiléptico clássico que se pensa que actua por um mecanismo de acção bastante semelhante ao da lamotrigina. Walker *et al.* (1996) referem, num estudo de microdialise sobre a farmacocinética da fenitoína no rato, a existência de concentrações de fenitoína mais elevadas no hipocampo do que no córtex frontal; em contrapartida, o mesmo grupo de investigação refere, num outro estudo de

microdialise em ratos, a existência de níveis de lamotrigina idênticos no hipocampo e no córtex frontal (WALKER *et al.*, 2000). Curiosamente, as diferenças observadas na distribuição cerebral da lamotrigina e da fenitoína são acompanhadas por diferenças nos seus perfis anticonvulsivantes.

Deste modo, a caracterização da distribuição cerebral da lamotrigina reveste-se de máxima importância, porquanto abre caminho para que a investigação básica possa continuar a procurar identificar com êxito os múltiplos mecanismos de acção da lamotrigina, ao mesmo tempo que traz nova luz sobre a compreensão do vasto espectro de actividade antiepiléptica apresentado por este fármaco, o qual torna possível, por exemplo, a sua eficácia na abordagem de epilepsias refractárias.

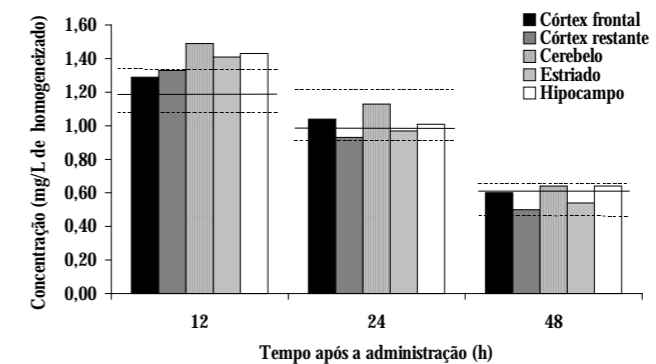


Figura D.3 Concentrações cerebrais de lamotrigina obtidas após a administração i.p. do fármaco na dose de 10 mg/kg. Linhas sólidas = mediana das concentrações de lamotrigina obtidas na análise do cérebro total. Linhas a tracejado = intervalo interquartil correspondente ($n=5$). Barras = concentrações médias de lamotrigina nas diferentes regiões cerebrais ($n=10$).

3. ANÁLISE FARMACOCINÉTICA

3.1. Análise cinética da lamotrigina no plasma e no cérebro

3.1.1. Estudo da relação entre a dose administrada e os níveis de lamotrigina obtidos

Estando uma vez desenhadas, a partir dos resultados experimentais, as curvas plasmáticas de lamotrigina em função do tempo (tabela R.16 e figura R.7) e as respectivas curvas de níveis cerebrais (tabela R.17 e figura R.8), procurámos, numa primeira fase, estudar o tipo de relação que existe entre a dose administrada e as concentrações obtidas no animal.

Habitualmente, as concentrações de fármaco no sangue aumentam de forma proporcional à dose, comportamento este que se designa por *cinética linear* ou independente da dose e do tempo. No entanto, alguns fármacos estão sujeitos a processos de absorção, distribuição ou eliminação que envolvem sistemas enzimáticos ou transportadores saturáveis, de tal modo que incrementos progressivos na dose de fármaco administrada não originam alterações proporcionais nos níveis plasmáticos correspondentes. As causas da não-linearidade são múltiplas, podendo estar associadas, por sua vez, a cada um dos diferentes processos que regulam a cinética de disposição do fármaco. Por exemplo, a fenitoína apresenta uma cinética não-linear devido a um metabolismo levado a cabo por um sistema enzimático de capacidade limitada; já a carbamazepina apresenta uma cinética não-linear

motivada por fenómenos de auto-indução enzimática; e o ácido valpróico apresenta uma cinética não-linear como consequência de um processo de ligação a proteínas plasmáticas de carácter saturável (GARCÍA SÁNCHEZ, 1997).

Existem diversas formas de averiguar a existência ou não de linearidade entre a dose de fármaco administrada e as concentrações obtidas. Analisemos pormenorizadamente os resultados:

1. Em qualquer dos tecidos estudados, as análises de regressão efectuadas apresentam coeficientes de determinação bastante próximos da unidade, o que é indicador da existência de uma relação linear entre as variáveis em causa para o intervalo de doses utilizado (tabelas R.19 e R.22). Note-se apenas a excepção correspondente ao coeficiente apresentado ao primeiro tempo de amostragem (0,125 horas: $r^2 = 0,204$, para o plasma, e $r^2 = 0,077$, para o cérebro), que se explica por condicionantes galénicas que influenciam esta fase inicial de incorporação do fármaco na circulação sistémica. Uma relação de falta de linearidade verifica-se também mais tarde, no cérebro, às 72 horas de amostragem, numa zona onde os níveis de lamotrigina medidos assumem já valores muito residuais. Como sinal desta situação, já não foi possível efectuar a análise de regressão, no cérebro, às 120 horas de amostragem, uma vez que os níveis cerebrais atingidos, após a administração das doses de 5 e de 10 mg/kg, se encontravam abaixo do limite de quantificação da técnica analítica (0,1 mg/L). Para evitar o enviesamento dos resultados na procura da relação dose-concentrações medidas, a análise de regressão levada a cabo entre os perfis plasmáticos obtidos com as diferentes doses foi efectuada eliminando o primeiro tempo de amostragem, ou seja, utilizando apenas as concentrações obtidas a partir de 0,25 horas após a toma, e foi efectuada a partir de 0,5 horas no caso do

cérebro, em virtude de isso corresponder ao momento a partir do qual já se encontra ultrapassada a fase de incorporação do fármaco, respectivamente, na circulação sistêmica e no sistema nervoso central.

2. Os baixos valores do coeficiente de variação apresentados como medida de dispersão dos valores da área sob a curva normalizados pela dose (tabelas R.20 e R.23) são também indicadores de linearidade, já que revelam que os níveis de lamotrigina obtidos seguem o “princípio da sobreposição”, segundo o qual tendem a ser aproximadamente iguais quando são normalizados pela dose.

3. A análise de variância realizada entre os níveis de lamotrigina normalizados pela dose a cada tempo de amostragem (tabelas R.21 e R.24) demonstra também a linearidade existente na parte principal do processo de disposição do fármaco, ao revelar diferenças estatisticamente não significativas quanto aos valores obtidos, no plasma, entre as 0,5 e as 24 horas e, no cérebro, entre as 2 e as 24 horas após a administração do fármaco. No entanto, este método, ao apresentar maior sensibilidade aos valores experimentais do que os processos anteriores – situação que seria atenuada com o aumento do número de animais analisados em cada ponto –, detecta alguma falta de linearidade na fase final da eliminação do fármaco. Este facto pode visualizar-se nas figuras D.4 e D.5, onde se detecta alguma diferença na inclinação relativa das curvas após a normalização pela dose.

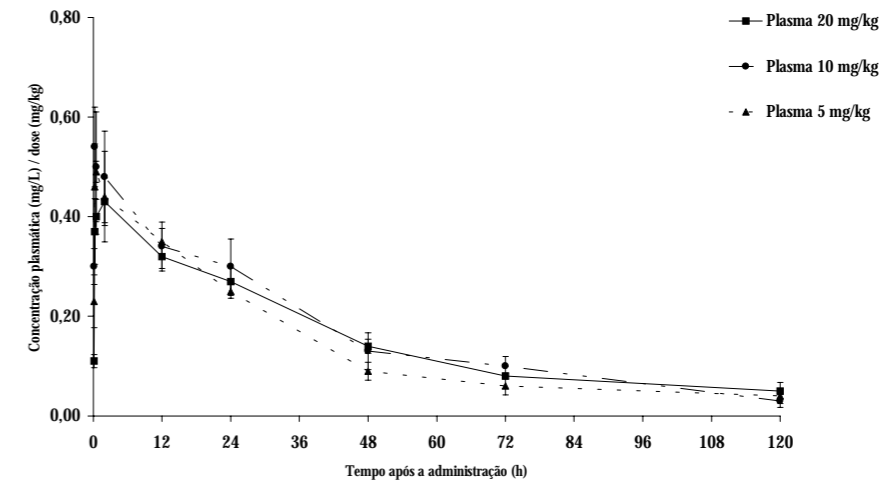


Figura D.4 Curvas plasmáticas de lamotrigina normalizadas pela dose.

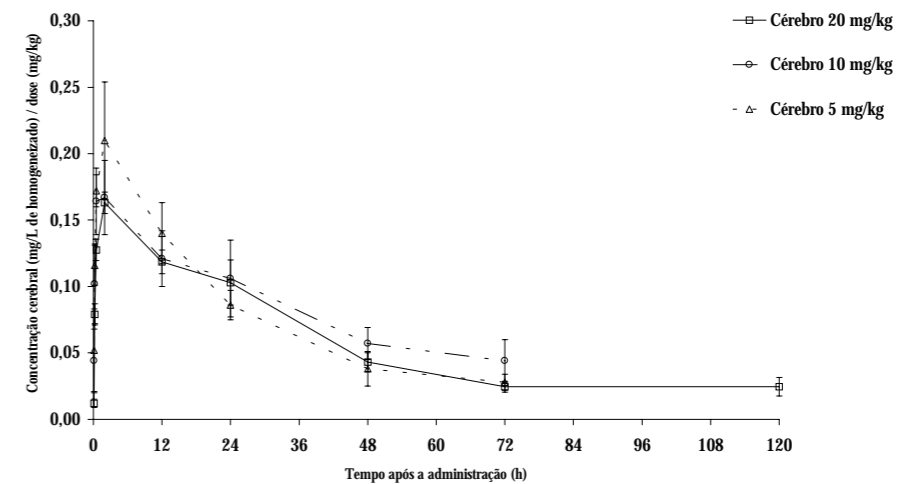


Figura D.5 Curvas cerebrais de lamotrigina normalizadas pela dose.

No seu conjunto, os resultados obtidos permitem afirmar que, no intervalo de doses compreendido entre 5 e 20 mg/kg – que foi escolhido tendo em conta o desencadeamento da resposta anticonvulsivante no rato (WHEATLEY e MILLER, 1989) e o intervalo de concentrações plasmáticas até agora aceite como margem terapêutica para este fármaco (MORRIS *et al.*, 1998) –, a lamotrigina apresenta, quando é administrada por via intraperitoneal, uma relação dose - concentrações plasmáticas e uma relação dose - concentrações cerebrais de tipo linear.

Até ao presente, a lamotrigina tem sido descrita como sendo um fármaco que apresenta uma cinética linear. Segundo Parsons, Dickins e Morley (1995), a farmacocinética da lamotrigina apresenta-se proporcional à dose na maioria das espécies estudadas. Walton *et al.* (1996) também observam, num estudo experimental com a lamotrigina, a existência de um aumento linear dos seus níveis séricos com a dose, quando o fármaco é administrado por via parentérica num intervalo de doses compreendido entre 10 e 100 mg/kg. Do mesmo modo, Walker *et al.* (2000) descrevem uma farmacocinética linear para a lamotrigina entre 10 e 40 mg/kg, quando esta é administrada intraperitonealmente. Todos estes resultados experimentais, que são indicadores de uma cinética linear, convergem, por sua vez, com os resultados de diversos estudos clínicos efectuados com este antiepiléptico (p. ex. COHEN *et al.*, 1987; PECK, 1991; BARTOLI *et al.*, 1997). Também os resultados por nós obtidos estão de acordo com o comportamento linear da cinética plasmática descrita na literatura para a lamotrigina.

Por outro lado, os resultados agora obtidos ajudam a esclarecer a dúvida colocada por Yamashita *et al.* (1997) em relação à falta de linearidade observada para a dose de 20 mg/kg, quando a lamotrigina é administrada aos ratos em dose única oral. Segundo as observações destes autores, a lamotrigina apresenta uma cinética linear para doses

orais situadas entre 2,5 e 10 mg/kg, mas as suas concentrações séricas deixam de ser proporcionais à dose quando a lamotrigina é administrada na dose de 20 mg/kg. A explicação para este facto pode passar, segundo os mesmos autores, por uma saturação dos mecanismos de absorção ou dos mecanismos de eliminação. Os resultados que obtivemos, ao demonstrarem linearidade para um intervalo de doses compreendido entre 5 e 20 mg/kg, quando a lamotrigina é administrada por via intraperitoneal, não revelam saturação de mecanismos de eliminação, pelo que sugerem que a acentuada falta de linearidade observada por estes autores se deve à ocorrência de um eventual passo-limitante no processo de incorporação do fármaco. Esta conclusão parece estar de acordo, por sua vez, com Parsons, Dickins e Morley (1995), na referência que fazem à existência de um retardamento do esvaziamento gástrico dependente da dose, quando a lamotrigina é administrada a roedores por via oral. No entanto, afirmam que isso não se verifica para doses inferiores a 25 mg/kg/dia.

Sobre a cinética da lamotrigina no cérebro, pouco foi descrito até hoje. Apenas Walton *et al.* (1996) referem a existência de um aumento linear dos níveis cerebrais da lamotrigina com o aumento da dose, por semelhança com o que ocorre no soro, quando o fármaco é administrado, por via parentérica, num intervalo de doses compreendido entre 10 e 100 mg/kg. Os nossos resultados revelam a existência de linearidade na relação dose - concentrações cerebrais. Este estudo reveste-se de extrema importância na medida em que, conhecendo-se relativamente bem a relação que intercede entre a dose de lamotrigina administrada e os níveis plasmáticos correspondentes, a relação entre os níveis plasmáticos e a resposta farmacológica obtida se encontra ainda por definir (KILPATRICK, FORREST e BRODIE, 1996; CHONG e DUPUIS, 2002; FROSCHE *et al.*, 2002). Atendendo a que a lamotrigina, para exercer a sua acção farmacológica, necessita de penetrar no sistema nervoso central, torna-se essencial estudar detalhadamente o seu comportamento neste sistema.

3.1.2. Análise compartimental

Na análise compartimental realizada apenas com os dados plasmáticos, considerou-se, de uma forma simplificada, o organismo como um compartimento único onde o fármaco se distribui de forma homogênea e donde é eliminado segundo uma cinética de primeira ordem.

Os parâmetros farmacocinéticos estimados (tabela R.26) permitem fazer uma primeira caracterização da passagem da lamotrigina pelo organismo, salientando-se que:

> Após administração intraperitoneal, o tempo necessário para a incorporação da lamotrigina na circulação sistêmica revela-se semelhante para as doses de 5 e 10 mg/kg, mas duplica quando se administra a dose de 20 mg/kg. No entanto, a semelhança que se verifica entre os valores estimados de área sob a curva normalizados pela dose sugere que a quantidade de fármaco incorporada, de forma inalterada, no organismo, é proporcional à dose administrada;

> O volume aparente de distribuição, cujo valor é independente da dose administrada, é cerca de 50 a 60 vezes superior ao volume de plasma do rato (39,2 ml de plasma/kg de rato; GERLOWSKI e JAIN, 1983). Este valor elevado indica a existência de uma distribuição extensa de lamotrigina pelos tecidos, o que, por sua vez, é consequência das características básicas e lipófilas da molécula. Os valores obtidos nesta análise compartimental estão de acordo com os valores referidos na literatura (PARSONS, DICKINS e MORLEY, 1995);

3.1.3. Análise não-compartimental

Os parâmetros cinéticos obtidos por análise não-compartimental a partir do ajuste dos dados plasmáticos (tabela R.28) são bastante parecidos com os estimados através da aplicação do modelo monocompartimental (tabela R.26), o que confirma a validade da análise compartimental na interpretação dos nossos dados experimentais.

A análise cinética não-compartimental dos dados cerebrais (tabela R.29), por comparação com a análise dos dados plasmáticos (tabela R.28), permite constatar que:

> O tempo de semivida aparente da fase terminal da curva de níveis cerebrais de lamotrigina é comparável ao da curva de níveis plasmáticos, o que está de acordo com o que se encontra descrito na literatura (PARSONS, DICKINS e MORLEY, 1995).

3.2. Distribuição da lamotrigina entre o plasma e o cérebro

3.2.1. Estudo da relação entre níveis plasmáticos e níveis cerebrais correspondentes

A caracterização da relação existente entre a evolução das concentrações plasmáticas da lamotrigina ao longo do tempo e os níveis atingidos no cérebro nesse mesmo período constitui uma etapa importante no conhecimento do processo que se desenrola entre a administração de uma determinada dose do fármaco e o desencadeamento da resposta farmacológica.

Procurámos, assim, numa primeira abordagem da distribuição da lamotrigina entre o plasma e o cérebro, avaliar a relação entre os dados plasmáticos e os dados cerebrais correspondentes. Fizemo-lo através de dois processos complementares, cujos resultados passamos a analisar:

1. As análises de regressão estabeleceram boas correlações entre níveis plasmáticos e níveis cerebrais, para qualquer uma das doses estudadas, a partir do terceiro tempo de amostragem, ou seja, transcorrida meia hora após a administração do fármaco (tabela R.30). Este período inicial corresponde ao tempo necessário para a incorporação do fármaco na circulação sistémica e, seguidamente, no sistema nervoso central, conforme analisado anteriormente. Deste modo, os resultados da análise de regressão são indicadores da existência de uma relação linear entre níveis plasmáticos e níveis cerebrais, desde que o sistema tenha atingido o equilíbrio;

2. As análises de variância revelaram não existir qualquer tipo de dependência das razões níveis cerebrais / níveis plasmáticos relativamente à dose (tabela R.31b). Em relação ao tempo, também revelaram não existir dependência, a partir do momento em que o sistema se encontra em equilíbrio, ou seja, a partir do terceiro tempo de amostragem (tabela R.31c). A figura R.13 representa graficamente estas situações. Em consequência, assumimos que os elementos que caracterizam melhor a distribuição da lamotrigina entre o plasma e o cérebro são os valores da razão cérebro/plasma que foram obtidos com a média dos valores tomados apenas a partir do terceiro tempo de amostragem (tabela R.31a). Para tornar possível a comparação do grau de captura da lamotrigina por parte do cérebro, que foi levada a cabo em diversos estudos, os valores de níveis cerebrais expressos em mg/L de homogeneizado foram convertidos em valores expressos em $\mu\text{g/g}$ de tecido cerebral, assumindo-se

que a gravidade específica do cérebro é igual a 1,0 g/ml (ADUSUMALLI *et al.*, 1993; DEGUCHI *et al.*, 1995). Os valores médios das razões cérebro/plasma, com os níveis cerebrais expressos em $\mu\text{g/g}$ de tecido cerebral, calculados a partir de 0,5 horas após a toma foram, então, de $2,59 \pm 0,970$, $2,29 \pm 0,580$ e $2,10 \pm 0,411$ (média \pm desvio-padrão), respectivamente, para as doses de 5, 10 e 20 mg/kg.

O estudo da distribuição da lamotrigina entre o plasma e o cérebro revelou, nesta primeira abordagem, a existência de uma relação linear entre níveis plasmáticos e níveis cerebrais, após o sistema atingir o equilíbrio. As razões cérebro/plasma calculadas revelaram ser um bom indicador da capacidade de o cérebro de entrar em equilíbrio com o plasma, mantendo-se as suas concentrações proporcionais às existentes em circulação. Embora uma retenção excessiva da lamotrigina por parte do tecido cerebral não se faça sentir, tal como foi revelado pelo paralelismo entre os dois tipos de curva traçados, já a extensão da distribuição da lamotrigina pelo tecido cerebral se revela significativa. De facto, os níveis cerebrais determinados são cerca de duas vezes superiores aos níveis encontrados no plasma, o que se justifica pelas características básicas e lipofílicas da lamotrigina, que lhe permitem atravessar facilmente a barreira hematoencefálica e ter grande afinidade com o tecido cerebral. Tais valores estão de acordo, apesar das diferentes metodologias utilizadas, com os resultados descritos por outros autores (PARSONS, DICKINS e MORLEY, 1995; WALTON *et al.*, 1996).

3.2.2. Análise compartimental

A análise compartimental realizada através do ajuste simultâneo dos dados plasmáticos e cerebrais obtidos experimentalmente permitiu caracterizar mais adequadamente a passagem da lamotrigina através do organismo, dando particular relevância à sua passagem pelo cérebro, que é o local onde vai exercer a acção farmacológica. Os parâmetros farmacocinéticos estimados (tabela R.32) caracterizam o comportamento da lamotrigina após a sua administração ao rato, por via intraperitoneal, em dose única: os primeiros parâmetros referem-se à cinética da lamotrigina no plasma, sendo os valores obtidos facilmente comparáveis aos valores estimados anteriormente, aquando da análise monocompartimental efectuada apenas com os dados dos níveis plasmáticos (tabela R.26); o segundo conjunto de parâmetros descreve o processo cinético de distribuição da lamotrigina entre o plasma e o cérebro.

O tempo médio de trânsito durante a primeira passagem pelo tecido é um parâmetro muito útil, quer por discriminar diferenças na distribuição tecidual quer por reflectir a concentração tecidual de um determinado composto. Se o cálculo do tempo de semivida dá uma indicação da afinidade relativa do tecido para determinado composto, o tempo médio de trânsito permite caracterizar ainda com maior acuidade essa afinidade, bem como o próprio processo da distribuição (McNAMARA, FLEISHAKER e HAYDEN, 1987). Os resultados obtidos são disso reveladores: para a dose de 5 mg/kg, a lamotrigina apresenta uma semivida no cérebro ligeiramente inferior à estimada para as doses superiores (redução de cerca de 30% - tabela R.29); no entanto, para a mesma dose de 5 mg/kg, o valor do tempo médio de trânsito é cerca de metade dos valores estimados para as restantes doses, não havendo dúvidas acerca da maior rapidez de passagem das moléculas de lamotrigina pelo cérebro, quando a lamotrigina é administrada na dose mais baixa.

Note-se também a vantagem do cálculo directo deste parâmetro em relação à sua determinação através do cálculo da diferença entre os tempos médios de residência no tecido e no organismo, o que não se revela adequado quando a curva tecidual é muito parecida com a curva plasmática. Nessa situação, os tempos médios de residência calculados são muito parecidos e a diferença pode chegar a não ter significado, por atingir valores negativos (McNAMARA, FLEISHAKER e HAYDEN, 1987). É o que acontece com os nossos dados experimentais. Os valores bastante curtos do tempo médio de trânsito da lamotrigina, na sua primeira passagem pelo cérebro, são indicadores de uma distribuição tecidual limitada pelo fluxo sanguíneo e não pela permeabilidade da membrana. Estes resultados estão de acordo com a análise monocompartimental levada a cabo apenas com os dados plasmáticos, onde o cérebro é um tecido incluído no compartimento único central.

O conjunto dos últimos quatro parâmetros salientam o comportamento da lamotrigina quando é administrada na dose mais baixa: em comparação com as restantes doses, verifica-se, no caso da dose de 5 mg/kg, uma maior velocidade de incorporação do fármaco no cérebro (CL/V), uma passagem mais breve através do tecido cerebral (TMT), e bem ainda um retorno mais rápido à circulação sistémica (K). Tais resultados revelam que o processo de distribuição da lamotrigina entre o plasma e o cérebro não é completamente independente da dose administrada. Este facto reveste-se de particular importância, atendendo a que a lamotrigina vai desencadear a sua resposta farmacológica no tecido cerebral. Deste modo, poderá esperar-se uma intensidade da resposta farmacológica maior para doses mais elevadas de lamotrigina, uma vez que o estudo cinético reconhece que, quando é administrada em doses mais elevadas, as moléculas de lamotrigina permanecem mais tempo nos seus locais de acção.

3.2.3. Análise não-compartimental

Os parâmetros cinéticos obtidos por análise não-compartimental (tabela R.33) são bastante idênticos aos estimados através da aplicação do modelo compartimental, o que confirma a validade do modelo compartimental, que considera o subcompartimento cerebral, na interpretação dos presentes dados experimentais.

Ambos os tratamentos cinéticos apresentam coeficientes de partilha cérebro/plasma com valores bastante semelhantes aos determinados experimentalmente, sob a forma de razão entre as concentrações obtidas no cérebro e as concentrações obtidas no plasma (tabela D.3). Este facto significa que, uma vez atingido o equilíbrio entre os dois sistemas, as concentrações cerebrais são proporcionais àquelas encontradas no plasma, pelo que a determinação plasmática reflecte adequadamente a concentração do fármaco no local de acção.

Tabela D.3. Comparação entre os valores de coeficiente de partilha cérebro/plasma determinados por diferentes processos.

Dose ^a	Razão cérebro/plasma	Análise compartimental	Análise não-compartimental
5	0,43	0,39	0,40
10	0,38	0,38	0,37
20	0,35	0,34	0,34

^a mg/kg

VI. CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

- 1. Foi desenvolvida e validada uma técnica analítica de cromatografia líquida de elevada resolução para a quantificação de lamotrigina em plasma e em homogeneizado de cérebro de rato. A técnica revelou-se simples e a execução do protocolo de validação assegurou a fiabilidade das determinações efectuadas. As características da técnica permitem a sua utilização quer na clínica quer em estudos laboratoriais envolvendo outras matrizes biológicas.**
- 2. O estudo desenhado com vista à selecção da formulação mais adequada para a administração da lamotrigina aos animais, no âmbito do presente trabalho, permitiu escolher, como forma de administração do fármaco, a solução aquosa de isotionato de lamotrigina. Tal estudo demonstrou que a incorporação da lamotrigina na corrente sanguínea não constitui um passo-limitante do processo de distribuição do fármaco quando se utiliza esta formulação, assegurando assim a não interferência da formulação administrada com os resultados experimentais.**
- 3. Quer os níveis plasmáticos quer os níveis cerebrais de lamotrigina, quando esta foi administrada a ratos-macho adultos, por via intraperitoneal, nas doses de 5, 10 e 20 mg/kg, revelaram a existência de uma relação com a dose de tipo linear.**
- 4. Os níveis plasmáticos determinados nas condições acima referidas foram adequadamente preditos através de um modelo cinético monocompartimental. A análise cinética não-compartimental comprovou a validade do modelo assumido na análise compartimental.**

5. Do mesmo modo, os níveis cerebrais foram adequadamente preditos através de um modelo cinético compartimental que considera o subcompartimento cerebral. A análise cinética independente do modelo, mediante aproximação semiparamétrica e convolução combinadas com regressão não-linear (deconvolução numérica indirecta), comprovou a validade do modelo assumido na análise compartimental com ajuste simultâneo dos dados plasmáticos e cerebrais.

6. Na distribuição da lamotrigina entre a circulação sistémica e o tecido cerebral, verificou-se, uma vez transcorrida a fase de incorporação no cérebro, uma relação linear entre os níveis plasmáticos e os níveis cerebrais correspondentes no intervalo de doses considerado, o que sugere a existência de um processo de difusão simples na transposição da barreira hematoencefálica. O coeficiente de partilha cérebro/plasma, determinado por diversos métodos, permitiu concluir que os níveis plasmáticos de lamotrigina são bons indicadores dos níveis de fármaco no local de acção.

7. A análise cinética do processo de distribuição da lamotrigina entre o plasma e o cérebro revelou também que, quando é administrada na dose mais baixa, a lamotrigina passa mais rapidamente pelo cérebro, pelo que o tempo de permanência no local de acção é menor e, conseqüentemente, pode esperar-se uma resposta farmacológica de menor intensidade. Estes resultados explicam, pelo menos em parte, a necessidade de se obterem, nos seres humanos, níveis séricos mais elevados do que os inicialmente previstos para a obtenção da resposta terapêutica (1-4 mg/L), o que justifica a aceitabilidade clínica da margem terapêutica da lamotrigina actualmente situada entre 3 e 14 mg/L.

8. Os resultados obtidos no estudo da distribuição cerebral da lamotrigina revelaram que esta se distribui de forma homogénea no cérebro do rato. Tal perfil de distribuição abre caminho à compreensão dos múltiplos mecanismos de acção da lamotrigina, ao mesmo tempo que justifica, pelo menos em parte, o vasto espectro de actividade deste antiepiléptico de nova geração.

VII. BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- ADUSUMALLI, V.E. [et al.] (1993) – Distribution of the anticonvulsant felbamate to cerebrospinal fluid and brain tissue of adult and neonatal rats. **Drug Metab. Dispos.** 21:5 (1993) 1079-1085.
- ALMEIDA, A.M.; CASTEL-BRANCO, M.M.; FALCÃO, A.C. (2002) – Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. **J. Chromatogr. B.** 774:2 (2002) 215-222.
- ALVAREZ-CEDRON RODRÍGUEZ, L. (1997) – Introducción a HPLC. In **II Curso de Determinación de Fármacos por HPLC en fluidos biológicos**. Salamanca, 1997. p.3-12.
- ARMJO, J.A. [et al.] (1999) – Lamotrigine Serum Concentration-to-Dose Ratio: Influence of Age and Concomitant Antiepileptic Drugs and Dosage Implications. **Ther. Drug Monit.** 21:2 (1999) 182-190.
- BARTOLI, A. [et al.] (1997) – The Influence of Dosage, Age, and Comedication on Steady State Plasma Lamotrigine Concentrations in Epileptic Children: A Prospective Study With Preliminary Assessment of Correlations With Clinical Response. **Ther. Drug Monit.** 19:3 (1997) 252-260.
- BATTINO, D. [et al.] (1997) – Lamotrigine Plasma Concentrations in Children and Adults: Influence of Age and Associated Therapy. **Ther. Drug Monit.** 19:6 (1997) 620-627.
- BAXTER, M.G.; MILLER, A.A.; WEBSTER, R.A. (1973) – Some studies on the convulsant action of folic acid. **Br. J. Pharmacol.** 48:2 (1973) 350P-351P.
- BENETELLO, P. (1995) – New antiepileptic drugs. **Pharmacol. Res.** 31:314 (1995) 155-162.
- BERRY, D.J. [et al.] (2002) – Lack of an Effect of Topiramate on Lamotrigine Serum Concentrations. **Epilepsia.** 43:8 (2002) 818-823.
- BESAG, F.M.C. [et al.] (1998) – Carbamazepine Toxicity with Lamotrigine: Pharmacokinetic or Pharmacodynamic Interaction? **Epilepsia.** 39:2 (1998) 183-187.
- BETTS, T. [et al.] (1991) – Human safety of lamotrigine. **Epilepsia.** 32:Suppl 2 (1991) S17-21.
- BIALER, M. (1993) – Comparative Pharmacokinetics of the Newer Antiepileptic Drugs. **Clin. Pharmacokinet.** 24:6 (1993) 441-452.
- BIALER, M. (2002) – New Antiepileptic Drugs Currently in Clinical Trials: Is There a Strategy in Their Development? **Ther. Drug Monit.** 24:1 (2002) 85-90.
- BINNIE, C.D. [et al.] (1986) – Acute effects of lamotrigine (BW430C) in persons with epilepsy. **Epilepsia.** 27:3 (1986) 248-254.
- BLUME, W.T.; WOLF, P. (1997) – Introduction to the Epilepsies. In ENGEL, J.; PEDLEY, T.A., ed. lit. – **Epilepsy: A Comprehensive Textbook**. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1997. Vol 1, chapter 67: p.765-772.
- BOURGEAIS, B.FD (1995) – Important Pharmacokinetic Properties of Antiepileptic Drugs. **Epilepsia.** 36:Suppl 5 (1995) S1-S7.
- BRODIE, M.J. (1992) – Lamotrigine. **Lancet.** 339:8806 (1992) 1397-1400.

BRODIE, M.J.; RICHENS, A.; YUEN, A.W.C. (1995) – Double-blind comparison of lamotrigine and carbamazepine in newly diagnosed epilepsy. **Lancet**. 345:8948 (1995) 476-479.

CALABRESI, P. [et al.] (1996) – A field potential analysis on the effects of lamotrigine, GP 47779, and felbamate in neocortical slices. **Neurology**. 47:2 (1996) 557-562.

CALPENA CAMPANY, A.C. [et al.] (1990) – Validación de los métodos analíticos. **Farm. Clin.** 7:9 (1990) 749-758.

CARDONE, M.J.; WILLAVIZE, S.A.; LACY, M.E. (1990) – Method Validation Revisited: A Chemometric Approach. **Pharm. Res.** 7:2 (1990) 154-160.

CASQUERO DORADO, A.C. (1997) – Tipos de cromatografía líquida. In **II Curso de Determinación de Fármacos por HPLC en fluidos biológicos**. Salamanca, 1997. p.13-27.

CASTEL-BRANCO, M.M. [et al.] (2001) – Lamotrigine analysis in blood and brain by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. B**. 755:1-2 (2001) 119-127.

CASTEL-BRANCO, M.M. [et al.] (2002a) – Influence of administration vehicles and drug formulations on the pharmacokinetic profile of lamotrigine in rats. **Fund. Clin. Pharmacol.** 16 (2002) 1-6.

CASTEL-BRANCO, M.M. [et al.] (2002b) – Lamotrigine pharmacokinetics in the blood and brain of rats. **The Pharmacologist**. 44:2 (2002) suppl 1.

CHEN, H.G.; GROSS, J.F. (1979) – Estimation of Tissue-to-Plasma Partition Coefficients Used in Physiological Pharmacokinetic Models. **J. Pharmacokin. Biopharm.** 7:1 (1979) 117-125.

CHONG, E.; DUPUIS, L.L. (2002) – Therapeutic Drug Monitoring of Lamotrigine. **Ann. Pharmacother.** 36:5 (2002) 917-920.

CHUST, R.B. (1990) – Introdução à Cromatografia de Líquidos (HPLC). **Bol. SPQ**. 39 (1990) 43-53.

COHEN, A.F. [et al.] (1985) – Lamotrigine (BW430C), a potential anticonvulsant. Effects on the central nervous system in comparison with phenytoin and diazepam. **Br. J. Clin. Pharmacol.** 20:6 (1985) 619-629.

COHEN, A.F. [et al.] (1987) – Lamotrigine, a new anticonvulsant: Pharmacokinetics in normal humans. **Clin. Pharmacol. Ther.** 42:5 (1987) 535-541.

COLINO GANDARILLAS, C.I.; GONZALEZ LOPEZ, F. (1997) – Métodos de calibración. Uso de estándares externos e internos. In **II Curso de Determinación de Fármacos por HPLC en fluidos biológicos**. Salamanca, 1997. p.84-98.

COMMISSION on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy (1989) – Proposal for Revised Classification of Epilepsies and Epileptic Syndromes. **Epilepsia**. 30:4 (1989) 389-399.

CONROY, B.P. [et al.] (1999) – Lamotrigine Attenuates Cortical Glutamate Release during Global Cerebral Ischemia in Pigs on Cardiopulmonary Bypass. **Anesthesiology**. 90:3 (1999) 844-854.

CRAWFORD, P. (2002) – Interactions Between Antiepileptic Drugs and Hormonal Contraception. **CNS Drugs**. 16:4 (2002) 263-272.

CUNNINGHAM, M.O.; JONES, R.S.G. (2000) – The anticonvulsant lamotrigine decreases spontaneous glutamate release but increases spontaneous GABA release in the rat entorhinal cortex in vitro. **Neuropharmacol.** 39:11 (2000) 2139-2146.

CUTLER, D.J. (1978a) – Numerical Deconvolution by Least Squares: Use of Prescribed Input Functions. **J. Pharmacokin. Biopharm.** 6:3 (1978) 227-241.

CUTLER, D.J. (1978b) – Numerical Deconvolution by Least Squares: Use of Polynomials to Represent the Input Function. **J. Pharmacokin. Biopharm.** 6:3 (1978) 243-263.

CUTLER, D.J. (1978c) – Linear Systems Analysis in Pharmacokinetics. **J. Pharmacokin. Biopharm.** 6:3 (1978) 265-282.

DALBY, N.O.; NIELSEN, E.B. (1997) – Comparison of the preclinical anticonvulsant profiles of tiagabine, lamotrigine, gabapentin and vigabatrin. **Epilepsy Res.** 28:1 (1997) 63-72.

DECERCE, J. [et al.] (2000) – Lamotrigine-valproate interaction: relationship to the dose of valproate. **Epilepsia**. 41:Suppl 7 (2000) 220-221.

DEGUCHI, Y. [et al.] (1995) – Study on Brain Interstitial Fluid Distribution and Blood-Brain Barrier Transport of Baclofen in Rats by Microdialysis. **Pharm. Res.** 12:12 (1995) 1838-1844.

DEPOT, M. [et al.] (1990) – Kinetic effects of multiple oral doses of acetaminophen on a single oral dose of lamotrigine. **Clin. Pharmacol. Ther.** 48:4 (1990) 346-355.

DICHTER, M.A. (1997) – Overview: The Neurobiology of Epilepsy. In ENGEL, J.; PEDLEY, T.A., ed. lit. – **Epilepsy: A Comprehensive Textbook**. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1997. Vol 1, chapter 21: p.233-235.

DICKINS, M. [et al.] (1995) – Lamotrigine: Chemistry and Biotransformation. In LEVY, R.H.; MATTSON, R.H.; MELDRUM, B.S., ed. lit. – **Antiepileptic Drugs**. 4th edition, New York: Raven Press Ltd., 1995. Chapter 77: p.871-875.

DOHENY, H.C. [et al.] (1999) – Blood and cerebrospinal fluid pharmacokinetics of the novel anticonvulsant levetiracetam (ucb L059) in the rat. **Epilepsy Res.** 34:2-3 (1999) 161-168.

DOMÉNECH BERROZPE, J.; LAUROBA VILADROSA, J. (1997) – Farmacocinética no compartimental. In DOMÉNECH BERROZPE, J.; MARTÍNEZ LANA, J.; PLÁ DELFINA, J.M., eds. – **Biofarmacia y Farmacocinética**. Madrid: Editorial Síntesis, 1997. Vol 1, cap. 18: p.391-420.

DOMÉNECH BERROZPE, J.; MARTÍNEZ LANA, J.; PLÁ DELFINA, J.M., eds. (1997) – **Biofarmacia y Farmacocinética**. Madrid: Editorial Síntesis, 1997. Vol 1.

DREIFUSS, F.E. (1997) – Classification of Epileptic Seizures. In ENGEL, J.; PEDLEY, T.A., ed. lit. – **Epilepsy: A Comprehensive Textbook**. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1997. Vol 1, chapter 44: p.517-524.

EBERT, U. [et al.] (2000) – Effects of rifampicin and cimetidine on pharmacokinetics and pharmacodynamics of lamotrigine in healthy subjects. **Eur. J. Clin. Pharmacol.** 56:4 (2000) 299-304.

EBERT, U.; REISSMÜLLER, E.; LÖSCHER, W. (2000) – The new antiepileptic drugs lamotrigine and felbamate are effective in phenytoin-resistant kindled rats. **Neuropharmacol.** 39:10 (2000) 1893-1903.

EBLING, W.F.; WADA, D.R.; STANSKI, D.R. (1994) – From Piecewise to Full Physiologic Pharmacokinetic Modeling: Applied to Thiopental Disposition in the Rat. **J. Pharmacokinet. Biopharm.** 22:4 (1994) 259-292.

ELWES, R.D.C.; BINNIE, C.D. (1996) – Clinical Pharmacokinetics of Newer Antiepileptic Drugs: Lamotrigine, Vigabatrin, Gabapentin and Oxcarbazepine. **Clin. Pharmacokinet.** 30:6 (1996) 403-415.

ENGEL, J.; PEDLEY, T.A. (1997) – Introduction: What Is Epilepsy?. In ENGEL, J.; PEDLEY, T.A., ed. lit. – **Epilepsy: A Comprehensive Textbook**. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1997. Vol 1, chapter 1: p.1-7.

ESTEVEZ, A. (1994) – Antiepilépticos. In GARRETT, J.; OSSWALD, W.; GUIMARÃES, S., coord. – **Terapêutica medicamentosa e suas bases farmacológicas**. 3ª ed. Porto: Porto Editora, 1994. Vol. 1, cap. 19: p.250-262.

FAUGHT, E. [et al.] (1999) – Adding Lamotrigine to Valproate: Incidence of Rash and Other Adverse Effects. **Epilepsia**. 40:8 (1999) 1135-1140.

FERRON, G.M. [et al.] (2000) – Lack of pharmacokinetic interaction between retigabine and lamotrigine. **Epilepsia**. 41: Suppl 7 (2000) 111.

FITTON, A.; GOA, K.L. (1995) – Lamotrigine. An Update of its Pharmacology and Therapeutic Use in Epilepsy. **Drugs**. 50:4 (1995) 691-713.

FRAILE LAFUENTE, M.A. (2001) – **Aplicación de métodos modelo-dependiente y modelo-independiente al análisis de la cinética de distribución tisular de fármacos**. Salamanca: Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, 2001. Tese de Doutoramento.

FRASER, A.D. [et al.] (1995) – Lamotrigine Analysis in Serum by High-Performance Liquid Chromatography. **Ther. Drug Monit.** 17:2 (1995) 174-178.

FROSCHER, W. [et al.] (2002) – Prospective study on concentration-efficacy and concentration-toxicity: correlations with lamotrigine serum levels. **Epileptic Disord.** 4:1 (2002) 49-56.

FUERST, R.H. (1990) – Basic Concepts in Epilepsy. **J. Pharm. Tech.** 6 (1990) 146-150.

GARCÍA SÁNCHEZ, M.J. (1997) – Farmacocinética no lineal. In DOMÉNECH BERROZPE, J.; MARTÍNEZ LANA, J.; PLÁ DELFINA, J.M., ed. lit. – **Biofarmacia y Farmacocinética**. Madrid: Editorial Síntesis, 1997. Vol 1, cap. 10: p.201-226.

GARDEN, J.S.; MITCHELL, D.G.; MILLS, W.N. (1980) – Nonconstant Variance Regression Techniques for Calibration-Curve-Based Analysis. **Anal. Chem.** 52:14 (1980) 2310-2315.

GERLOWSKI, L.E.; JAIN, R.K. (1983) – Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling: Principles and Applications. **J. Pharm. Sci.** 72:10 (1983) 1103-1127.

GIDAL, B.E. [et al.] (1997) – Lamotrigine pharmacokinetics in patients receiving felbamate. **Epilepsy Res.** 27:1 (1997) 1-5.

GIDAL, B.E.; GARNETT, W.R. (1995) – Perspective on Lamotrigine. **Ann. Pharmacother.** 29:2 (1995) 191-192.

GILLIAM, F. [et al.] (1998) – An active-control trial of lamotrigine monotherapy for partial seizures. **Neurology**. 51:4 (1998) 1018-1025.

GILMAN, J.T. (1995) – Lamotrigine: an antiepileptic agent for the treatment of partial seizures. **Ann. Pharmacother.** 29:2 (1995) 144-151.

GLAXOWELLCOME (1998). Substance Information Sheet – **Lamotrigine**. GlaxoWellcome, 1998. 5p.

GOA, K.L.; ROSS, S.R.; CHRISP, P. (1993) – Lamotrigine: A Review of its Pharmacological Properties and Clinical Efficacy in Epilepsy. **Drugs**. 46:1 (1993) 152-176.

GODDARD, G.V.; MCINTYRE, D.C.; LEECH, C.K. (1969) – A Permanent Change in Brain Function Resulting from Daily Electrical Stimulation. **Exp. Neurol.** 25:3 (1969) 295-330.

GOLDSMITH, P.; BITTENCOURT, P. R. M. (1995) – Rationalized polytherapy for epilepsy. **Acta Neurol. Scand. Suppl** 162 (1995) 35-39.

GONZALEZ LOPEZ, F. (1997) – Selección de columna y fase móvil. In **II Curso de Determinación de Fármacos por HPLC en fluidos biológicos**. Salamanca, 1997. p.48-60.

GRAM, L. (1990) – Octeto de la Epilepsia: Convulsiones y síndromes epilépticos. **Lancet (Ed. Esp.)**. 17:6 (1990) 339-341.

GRUNZE, H. [et al.] (1998) – Modulation of Calcium and Potassium Currents by Lamotrigine. **Neuropsychobiology**. 38:3 (1998) 131-138.

GUIDANCE for Industry. Bioanalytical Method Validation (2001). Rockville: FDA, 2001. 25p.

HACHAD, H.; RAGUENEAU-MAJLESSI, I.; LEVY, R.H. (2002) – New Antiepileptic Drugs: Review on Drugs Interactions. **Ther. Drug Monit.** 24:1 (2002) 91-103.

HOLDICH, T. [et al.] (1991) – Effect of lamotrigine on the pharmacology of the combined oral contraceptive pill. **Epilepsia**. 32:Suppl 1 (1991) S96.

HOOPEY, J.W. (1995) – Bioanalytical Validation – A North American View. In BLUME, H.H.; MIDHA, K.K, ed. lit. – **Bio-International 2. Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetic Studies**. Medpharm scientific Publishers Stuttgart, 1995. p.347-355.

HOSFORD, D.A.; WANG, Y. (1997) – Utility of the Lethargic (*lh/lh*) Mouse Model of Absence Seizures in Predicting the Effects of Lamotrigine, Vigabatrin, Tiagabine, Gabapentin, and Topiramate Against Human Absence Seizures. **Epilepsia**. 38:4 (1997) 408-414.

JAWAD, S. [et al.] (1986) – The effect of lamotrigine, a novel anticonvulsant, on interictal spikes in patients with epilepsy. **Br. J. Clin. Pharmacol.** 22:2 (1986) 191-193.

JAWAD, S. [et al.] (1987) – Lamotrigine: single-dose pharmacokinetics and initial 1 week experience in refractory epilepsy. **Epilepsy Res.** 1:3 (1987) 194-201.

JAWAD, S. [et al.] (1989) – Controlled Trial of Lamotrigine (Lamictal®) for Refractory Partial Seizures. **Epilepsia**. 30:3 (1989) 356-363.

JENKE, D.R. (1996a) – Chromatographic method validation: a review of current practices and procedures. I. General concepts and guidelines. **J. Liq. Chromatogr. & Relat. Technol.** 19:5 (1996) 719-736.

- JENKE, D.R. (1996b) – Chromatographic method validation: a review of current practices and procedures. II. Guidelines for primary validation parameters. **J. Liq. Chromatogr. & Relat. Technol.** 19:5 (1996) 737-757.
- JOHNSON, E.L. [et al.] (1988) – Biological sample preparation and data reduction concepts in pharmaceutical analysis. **J. Chromatogr. Sci.** 26:8 (1988) 372-379.
- KÄLVÄINEN, R.; KERÄNEN, T.; RIEKKINEN, P.J. (1993) – Place of Newer Antiepileptic Drugs in the Treatment of Epilepsy. **Drugs.** 46:6 (1993) 1009-1024.
- KANNER, A.M.; FREY, M. (2000) – Adding valproate to lamotrigine: A study of their pharmacokinetic interaction. **Neurology.** 55:4 (2000) 588-591.
- KARNES, H.T.; MARCH, C. (1991) – Calibration and validation of linearity in chromatographic biopharmaceutical analysis. **J. Pharm. Biom. Anal.** 9:10-12 (1991) 911-918.
- KAROL, M.D.; VENG-PEDERSEN, P.; BRASHEAR, R.E. (1983) – Diffusion and Flow Transfer of Theophylline Across the Blood-Brain Barrier: Pharmacokinetic Analysis. **J. Pharmacokinet. Biopharm.** 11:3 (1983) 273-287.
- KAUFMAN, K.R.; GERNER, R. (1998) – Lamotrigine toxicity secondary to sertraline. **Seizure.** 7:2 (1998) 163-165.
- KILPATRICK, E.S.; FORREST, G.; BRODIE, M.J. (1996) – Concentration-Effect and Concentration-Toxicity Relations with Lamotrigine: A Prospective Study. **Epilepsia.** 37:6 (1996) 534-538.
- KUO, C.C.; LU L. (1997) – Characterization of lamotrigine inhibition of Na⁺ channels in rat hippocampal neurones. **Br. J. Pharmacol.** 121:6 (1997) 1231-1238.
- KWAN, P.; SILLS, G.J.; BRODIE, M.J. (2001) – The mechanisms of action of commonly used antiepileptic drugs. **Pharmacol. Ther.** 90:1 (2001) 21-34.
- LAMB, R.J.; MILLER, A.A. (1985) – Effect of lamotrigine and some known anticonvulsant drugs on visually-evoked after-discharge in the conscious rat. **Br. J. Pharmacol.** 86 (1985) p.765.
- LANG, J.R.; BOLTON, S. (1991) – A comprehensive method validation strategy for bioanalytical applications in the pharmaceutical industry – 2. Statistical analyses. **J. Pharm. Biom. Anal.** 9:6 (1991) 435-442.
- LANG, D.G.; WANG, C.M.; COOPER, B.R. (1993) – Lamotrigine, Phenytoin and Carbamazepine Interactions on the Sodium Current Present in N4TG1 Mouse Neuroblastoma Cells. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 266:2 (1993) 829-835.
- LANGOSCH, J.M. [et al.] (2000) – Effects of Lamotrigine on Field Potentials and Long-Term Potentiation in Guinea Pig Hippocampal Slices. **Epilepsia.** 41:9 (2000) 1102-1106.
- LEACH, M.J.; BAXTER, M.G.; CRITCHLEY, M.A.E. (1991) – Neurochemical and Behavioral Aspects of Lamotrigine. **Epilepsia.** 32:Suppl 2 (1991) S4-S8.
- LEACH, M.J.; MARDEN, C.M.; MILLER, A.A. (1986) – Pharmacological Studies on Lamotrigine, A Novel Potential Antiepileptic Drug: II. Neurochemical Studies on the Mechanism of Action. **Epilepsia.** 27:5 (1986) 490-497.
- LEES, G.; LEACH, M.J. (1993) – Studies on the mechanism of action of the novel anticonvulsant lamotrigine (Lamictal) using primary neurological cultures from rat cortex. **Brain Res.** 612:1-2 (1993) 190-199.
- LOISEAU, P. [et al.] (1990) – A randomised double-blind placebo-controlled crossover add-on trial of lamotrigine in patients with treatment-resistant partial seizures. **Epilepsy Res.** 7:2 (1990) 136-145.
- LÖSCHER, W.; NOLTING, B.; FASSBENDER, C.P. (1990) – The role of technical, biological and pharmacological factors in the laboratory evaluation of anticonvulsant drugs. I. The influence of administration vehicles. **Epilepsy Res.** 7:3 (1990) 173-181.
- LÖSCHER, W.; SCHMIDT, D. (1988) – Which animal models should be used in the search for new antiepileptic drugs? A proposal based on experimental and clinical considerations. **Epilepsy Res.** 2:3 (1988) 145-181.
- LÖSCHER, W.; SCHMIDT, D. (1994) – Strategies in antiepileptic drug development: is rational drug design superior to random screening and structural variation?. **Epilepsy Res.** 17:2 (1994) 95-134.
- MACDONALD, R.L.; KELLY, K.M. (1994) – Mechanisms of Action of Currently Prescribed and Newly Developed Antiepileptic Drugs. **Epilepsia.** 35:Suppl 4 (1994) S41-S50.
- MACKICHAN, J.J.; FERRENDELLI, J.A.; WILDER, B.J. (1988) – Introduction to antiepileptic drugs. In TAYLOR, W.J.; CAVINESS, M.H.D., ed. lit. – **A Textbook for the Clinical Application of Therapeutic Drug Monitoring**, 2nd ed. Texas: Abbott Laboratories, 1988. p.208-209.
- MADDEN, EN. [et al.] (1996) – A Comparison of Six Deconvolution Techniques. **J. Pharmacokinet. Biopharm.** 24:3 (1996) 283-299.
- MARTÍNEZ LANA O, J. (1987) – Bases cinéticas de la distribución de fármacos. **Rev. Farmacol. Clin. Exp.** 4:3 (1987) 143-147.
- MARTÍNEZ LANA O, J. [et al.] (1992) – A Computer Program (DCN) for Numerical Convolution and Deconvolution of Pharmacokinetic Functions. **J. Pharmacobiodyn.** 15:5 (1992) 203-214.
- MAY, T.W.; RAMBECK, B.; JÜRGENS, U. (1996) – Serum Concentrations of Lamotrigine in Epileptic Patients: The Influence of Dose and Comedication. **Ther. Drug Monit.** 18:5 (1996) 523-531.
- MAY, T.W.; RAMBECK, B.; JÜRGENS, U. (1999) – Influence of Oxcarbazepine and Methsuximide on Lamotrigine Concentrations in Epileptic Patients With and Without Valproic Acid Comedication: Results of a Retrospective Study. **Ther. Drug Monit.** 21:2 (1999) 175-181.
- MCCABE, P.H. (2000) – New anti-epileptic drugs for the 21st century. **Exp. Opin. Pharmacother.** 1:4 (2000) 633-674.
- M McNAMARA, P.J.; FLEISHAKER, J.C.; HAYDEN, T.L. (1987) – Mean Residence Time in Peripheral Tissue. **J. Pharmacokinet. Biopharm.** 15:4 (1987) 439-450.
- MEHTA, A.C. (1989) – The validation criteria for analytical methods used in pharmacy practice research. **J. Clin. Pharm. Ther.** 14:6 (1989) 465-473.
- MELDRUM, B.S. (1996a) – Update on the Mechanism of Action of Antiepileptic Drugs. **Epilepsia.** 37:Suppl 6 (1996) S4-S11.
- MELDRUM, B. (1996b) – Action of established and novel anticonvulsant drugs on the basic mechanisms of epilepsy. **Epilepsy Res.** 11:Suppl (1996) 67-77.

MESSENHEIMER, J.A. (1995) – Lamotrigine. **Epilepsia**. 36:Suppl 2 (1995) S87-S94.

MILLER, A.A. [et al.] (1986a) – Lamotrigine. In MELDRUM, B.L.; PORTER, R.J., ed. lit. – **Current problems in epilepsy. 4. New antiepileptic drugs**. London: John Libbey & Co., 1986. Chapter 12: p.165-177.

MILLER, A.A. [et al.] (1986b) – Pharmacological Studies on Lamotrigine, A Novel Potential Antiepileptic Drug: I. Anticonvulsant Profile in Mice and Rats. **Epilepsia**. 27:5 (1986) 483-489.

MILLER, J.C.; MILLER, J.N. (1988) – Errors in instrumental analysis; regression and correlation. In MILLER, J.C.; MILLER, J.N., ed. lit. – **Statistics for analytical chemistry**. Chichester: Ellis Horwood Limited, 1988. p.101-136.

MODY, I.; SCHWARTZKROIN, P.A. (1997) – Acute Seizure Models (Intact Animals). In ENGEL, J.; PEDLEY, T.A., ed. lit. – **Epilepsy: A Comprehensive Textbook**. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1997. Vol 1, chapter 34: p.397-404.

MONACO, F.; SECHI, G. (1991) – The brain distribution of old and new antiepileptic drugs. **Epilepsy Res. Suppl**. 3 (1991) 57-65.

MORRIS, R.G. [et al.] (1998) – Lamotrigine and therapeutic drug monitoring: retrospective survey following the introduction of a routine service. **Br. J. Clin. Pharmacol.** 46 (1998) 547-551.

NOE, D.A.; KUMOR, K.M. (1983) – Drug Kinetics in Low-Flux (Small) Anatomic Compartments. **J. Pharm. Sci.** 72:6 (1983) 718-719.

NOEBELS, J.L. [et al.] (1997) – Genetic Models of Generalized Epilepsy. In ENGEL, J.; PEDLEY, T.A., ed. lit. – **Epilepsy: A Comprehensive Textbook**. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1997. Vol 1, chapter 39: p.457-465.

O'DONNELL, R.A.; MILLER, A.A. (1991) – The effect of lamotrigine upon development of cortical kindled seizures in the rat. **Neuropharmacol.** 30:3 (1991) 253-258.

OTSUKI, K. [et al.] (1998) – Effects of lamotrigine and conventional antiepileptic drugs on amygdala - and hippocampal-kindled seizures in rats. **Epilepsy Res.** 31:2 (1998) 101-112.

PANAYIOTOPOULOS, C.P. [et al.] (1993) – Interaction of lamotrigine with sodium valproate. **Lancet**. 341:8842 (1993) 445.

PARSONS, D.N.; DICKINS, M.; MORLEY, T.J. (1995) – Lamotrigine: Absorption, Distribution, and Excretion. In LEVY, R.H.; MATTSON, R.H.; MELDRUM, B.S., ed. lit. – **Antiepileptic Drugs**. 4th ed. New York: Raven Press Ltd., 1995. Chapter 78: p.877-881.

PARSONS, D.N.; MILES, D.W. (1984) – Metabolic Studies with BW430C, A Novel Anticonvulsant. **Epilepsia**. 25:5 (1984) 656.

PECK, A.W. (1991) – Clinical Pharmacology of Lamotrigine. **Epilepsia**. 32:Suppl 2 (1991) S9-S12.

PERUCCA, E. (1996) – The new generation of antiepileptic drugs: advantages and disadvantages. **Br. J. Clin. Pharmacol.** 42:5 (1996) 531-543.

PERUCCA, E. [et al.] (2000) – Levetiracetam does not interact with other antiepileptic drugs. **Epilepsia**. 41:Suppl 7 (2000) 254-255.

PERUCCA, E. (2002) – Marketed New Antiepileptic Drugs: Are They Better Than Old-Generation Agents? **Ther. Drug Monit.** 24:1 (2002) 74-80.

PHILLIPS, I. [et al.] (1997) – Weak blockade of AMPA receptor-mediated depolarisations in the rat cortical wedge by phenytoin but not lamotrigine or carbamazepine. **Eur. J. Pharmacol.** 337 (1997) 189-195.

PISANI, F. [et al.] (1993) – Interaction of lamotrigine with sodium valproate. **Lancet**. 341 (1993) 1224.

PISANI, F. [et al.] (1999) – The Efficacy of Valproate-Lamotrigine Comedication in Refractory Complex Partial Seizures. Evidence for a Pharmacodynamic Interaction. **Epilepsia**. 40:8 (1999) 1141-1146.

PORTARIA n.º 1005/92. **D.R. Série I-B**. 245 (92-10-23) 4930-4942.

PORTER, R.J.; ROGAWSKI, M.A. (1992) – New Antiepileptic Drugs: From Serendipity to Rational Discovery. **Epilepsia**. 33:Suppl 1 (1992) S1-S6.

POSTMA, T. [et al.] (2000) – Lamotrigine Treatment During Amygdala-Kindled Seizure Development Fails to Inhibit Seizures and Diminishes Subsequent Anticonvulsant Efficacy. **Epilepsia**. 41:12 (2000) 1514-1521.

RALL, W.; SCHLEIFER, L.S. (1990) – Drugs effective in the therapy of the epilepsies. In GILMAN, A.G. [et al.], ed. lit. – **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 8th ed. New York: Pergamon Press, 1990. Chapter 19: p.436.

RAMACHANDRAN, S.; UNDERHILL, S.; JONES, S.R. (1994) – Measurement of Lamotrigine Under Conditions Measuring Phenobarbitone, Phenytoin, and Carbamazepine Using Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography at Dual Wavelengths. **Ther. Drug Monit.** 16:1 (1994) 75-82.

RAMBECK, B. [et al.] (1997) – Concentrations of lamotrigine in a mother on lamotrigine treatment and her newborn child. **Eur. J. Clin. Pharmacol.** 51:6 (1997) 481-484.

RAMBECK, B.; SPECHT, U.; WOLF, P. (1996) – Pharmacokinetic Interactions of the New Antiepileptic Drugs. **Clin. Pharmacokinet.** 31:4 (1996) 309-324.

RAMBECK, B.; WOLF, P. (1993) – Lamotrigine Clinical Pharmacokinetics. **Clin. Pharmacokinet.** 25:6 (1993) 433-443.

RATAUD, J. [et al.] (1994) – Comparative study of voltage-sensitive sodium channel blockers in focal ischaemia and electric convulsions in rodents. **Neurosci. Lett.** 172:1-2 (1994) 19-23.

READ, N.G. [et al.] (1988) – Induction and exacerbation of hyaline droplet formation in the proximal tubular cells of the kidneys from male rats receiving a variety of pharmacological agents. **Toxicology**. 52:1-2 (1988) 81-101.

READ, N.G. (1991) – The role of lysosomes in hyaline droplet nephropathy induced by a variety of pharmacological agents in the male rat. **Histochem. J.** 23:10 (1991) 436-443.

REN, S.; SCHEUER, M.L.; ZHENG, W. (1998) – Determination of Lamotrigine in Biologic Materials by a Simple and Rapid Liquid Chromatographic Method. **Ther. Drug Monit.** 20:2 (1998) 209-214.

RCM – Resumo das características do medicamento (1999). Lisboa: INFARMED, 1999. 11p.

REUTENS, D.C.; DUNCAN, J.S.; PATSALOS, P.N. (1993) – Disabling tremor after lamotrigine with sodium valproate. **Lancet**. 342:8864 (1993) 185-186.

REYNOLDS, E.H.; PREECE, J.; CHANARIN, I. (1969) – Folic acid and anticonvulsants. **Lancet**. 1:7608 (1969) 1264-1265.

RICHENS, A. (1994) – Safety of Lamotrigine. **Epilepsia**. 35:Suppl 5 (1994) S37-S40.

RICHENS, A.; YUEN, A.W. (1991) – Overview of the clinical efficacy of lamotrigine. **Epilepsia**. 32:Suppl 2 (1991) S13-16.

RINALDI, G. [et al.] (2000) – The international classification of the epilepsies and epileptic syndromes. An algorithm for its use in clinical practice. **Epilepsy Res**. 41:3 (2000) 223-234.

RIVA, R. [et al.] (1996) – Pharmacokinetic Interactions Between Antiepileptic Drugs. Clinical Considerations. **Clin. Pharmacokinet**. 31:6 (1996) 470-493.

SALLUSTIO, B.C.; MORRIS, R.G. (1997) – High-Performance Liquid Chromatography Quantitation of Plasma Lamotrigine Concentrations: Application Measuring Trough Concentrations in Patients With Epilepsy. **Ther. Drug Monit**. 19:6 (1997) 688-693.

SARRO, G. [et al.] (1996) – Lamotrigine Potentiates the Antiseizure Activity of Some Anticonvulsants in DBA/2 Mice. **Neuropharmacol**. 35:2 (1996) 153-158.

SCHLUMBERGER, E. [et al.] (1994) – Lamotrigine in Treatment of 120 Children with Epilepsy. **Epilepsia**. 35:2 (1994) 359-367.

SECHI, G. [et al.] (1992) – Effects of Ketamine Anesthesia on Phenytoin Biodisposition. **Epilepsia**. 33:2 (1992) 366-371.

SHAH, V.P. [et al.] (1991) – Analytical methods validation: Bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. **Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet**. 16:4 (1991) 249-255.

SHAH, V.P. [et al.] (1992a) – Analytical Methods Validation: Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetic Studies. **J. Pharm. Sci**. 81:3 (1992) 309-312.

SHAH, V.P. [et al.] (1992b) – Analytical Methods Validation: Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetic Studies. **Pharm. Res**. 9:4 (1992) 588-592.

SHORVON, S.D. (1990) – Octeto de la Epilepsia: Epidemiología, clasificación, evolución natural y genética de la epilepsia. **Lancet (Ed. Esp.)**. 17:6 (1990) 334-338.

SMITH, D. [et al.] (1993) – Outcomes of Add-on Treatment with Lamotrigine in Partial Epilepsy. **Epilepsia**. 34:2 (1993) 312-322.

SMITH, S.E. [et al.] (1993) – Excitatory amino acid antagonists, lamotrigine and BW 1003C87 as anticonvulsants in the genetically epilepsy-prone rat. **Epilepsy Res**. 15:2 (1993) 101-111.

STEFANI, A. [et al.] (1996) – Lamotrigine inhibits Ca^{2+} currents in cortical neurons: functional implications. **Eur. J. Pharmacol**. 307:1 (1996) 113-116.

STEFANI, A.; SPADONI, F.; BERNARDI, G. (1997a) – Voltage-Activated Calcium Channels: Targets of Antiepileptic Drug Therapy?. **Epilepsia**. 38:9 (1997) 959-965.

STEFANI, A.; SPADONI, F.; BERNARDI, G. (1997b) – Differential Inhibition by Riluzole, Lamotrigine, and Phenytoin of Sodium and Calcium Currents in Cortical Neurons: Implications for Neuroprotective Strategies. **Exp. Neurol**. 147:1 (1997) 115-122.

STEINER, T.J. [et al.] (1999) – Lamotrigine Monotherapy in Newly Diagnosed Untreated Epilepsy: A Double-Blind Comparison with Phenytoin. **Epilepsia**. 40:5 (1999) 601-607.

SZABO, Z. [et al.] (1993) – Noncompartmental and Compartmental Modeling of the Kinetics of Carbon-11 Labeled Pylamine in the Human Brain. **Synapse**. 15:4 (1993) 263-275.

TEOH, H.; FOWLER, L.J.; BOWERY, N.G. (1995) – Effect of Lamotrigine on the Electrically-Evoked Release of Endogenous Amino Acids from Slices of Dorsal Horn of the Rat Spinal Cord. **Neuropharmacol**. 34:10 (1995) 1273-1278.

VAUGHAN, D.P.; DENNIS, M. (1978) – Mathematical Basis of Point-Area Deconvolution Method for Determining *In Vivo* Input Functions. **J. Pharm. Sci**. 67:5 (1978) 663-665.

VENG-PEDERSEN, P. (1980a) – Model-Independent Method of Analyzing Input in Linear Pharmacokinetic Systems Having Polyexponential Impulse Response. I: Theoretical Analysis. **J. Pharm. Sci**. 69:3 (1980) 298-305.

VENG-PEDERSEN, P. (1980b) – Model-Independent Method of Analyzing Input in Linear Pharmacokinetic Systems Having Polyexponential Impulse Response. II: Numerical Evaluation. **J. Pharm. Sci**. 69:3 (1980) 305-312.

VENG-PEDERSEN, P. (1980c) – Novel Deconvolution Method for Linear Pharmacokinetic Systems with Polyexponential Impulse Response. **J. Pharm. Sci**. 69:3 (1980) 312-318.

VENG-PEDERSEN, P. (1980d) – Novel Approach to Bioavailability Testing: Statistical Method for Comparing Drug Input Calculated by a Least-Squares Deconvolution Technique. **J. Pharm. Sci**. 69:3 (1980) 318-324.

VENG-PEDERSEN, P. (1984) – Theorems and implications of a model independent elimination/distribution function decomposition of linear and some nonlinear drug dispositions. I. Derivations and theoretical analysis. **J. Pharmacokinet. Biopharm**. 12:6 (1984) 627-648.

VENG-PEDERSEN, P. (1991) – Stochastic Interpretation of Linear Pharmacokinetics: A Linear System Analysis Approach. **J. Pharm. Sci**. 80:7 (1991) 621-631.

VEROTTA, D. [et al.] (1989) – A Semiparametric Approach to Physiological Flow Models. **J. Pharmacokinet. Biopharm**. 17:4 (1989) 463-491.

VON WEGERER, J. [et al.] (1997) – A calcium antagonistic effect of the new antiepileptic drug lamotrigine. **Eur. Neuropsychopharmacol**. 7:2 (1997) 77-81.

WALDMEIER, P.C. [et al.] (1995) – Similar potency of carbamazepine, oxcarbazepine, and lamotrigine in inhibiting the release of glutamate and other neurotransmitters. **Neurology**. 45:10 (1995) 1907-1913.

WALKER, M.C. [et al.] (1996) – Microdialysis Study of the Neuropharmacokinetics of Phenytoin in Rat Hippocampus and Frontal Cortex. **Epilepsia**. 37:5 (1996) 421-427.

WALKER, M.C. [et al.] (2000) – Comparison of serum, cerebrospinal fluid and brain extracellular fluid pharmacokinetics of lamotrigine. **Br. J. Pharmacol**. 130:2 (2000) 242-248.

WALTON, N.Y. [et al.] (1996) – Lamotrigine vs. phenytoin for treatment of status epilepticus: comparison in an experimental model. **Epilepsy Res.** 24:1 (1996) 19-28.

WANG, S.J. [et al.] (1996) – Inhibition of N-type calcium currents by lamotrigine in rat amygdalar neurones. **Neuroreport.** 7:18 (1996) 3037-3040.

WARNER, T. [et al.] (1992) – Lamotrigine induced carbamazepine toxicity: an interaction with carbamazepine-10,11-epoxide. **Epilepsy Res.** 11:2 (1992) 147-150.

WHEATLEY, P.L.; MILLER, A.A. (1989) – Effects of Lamotrigine on Electrically Induced Afterdischarge Duration in Anaesthetised Rat, Dog, and Marmoset. **Epilepsia.** 30:1 (1989) 34-40.

WHITE, H.S. (1997) – Clinical Significance of Animal Seizure Models and Mechanism of Action Studies of Potential Antiepileptic Drugs. **Epilepsia.** 38:Suppl 1 (1997) S9-S17.

WHITE, H.S. (1999) – Comparative Anticonvulsant and Mechanistic Profile of the Established and Newer Antiepileptic Drugs. **Epilepsia.** 40:Suppl 5 (1999) S2-S10.

WIELING, J. [et al.] (1996) – Rational experimental design for bioanalytical methods validation. Illustration using an assay method for total captopril in plasma. **J. Chromatogr. A.** 730:1-2 (1996) 381-394.

WINNONLIN Version 1.1 (1996). Palo Alto (CA): Pharsight Corporation Inc., 1996.

WOLF, P. (1997) – International Classification of the Epilepsies. In ENGEL, J.; PEDLEY, T.A., ed. lit. – **Epilepsy: A Comprehensive Textbook.** Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1997. Vol 1, chapter 68: p.773-777.

XIE, X. [et al.] (1995) – Interaction of the antiepileptic drug lamotrigine with recombinant rat brain type IIA Na⁺ channels and with native Na⁺ channels in rat hippocampal neurones. **Pflüg. Arch.** 430:3 (1995) 437-446.

YAMAOKA, K. [et al.] (1981) – A pharmacokinetic analysis program (MULTI) for microcomputers. **J. Pharmacobiodyn.** 4:11(1981) 879-885.

YAMAOKA, K.; NAKAGAWA, T.; UNO, T. (1978a) – Application of Akaike's Information Criterion (AIC) in the Evaluation of Linear Pharmacokinetic Equations. **J. Pharmacokinet. Biopharm.** 6:2 (1978) 165-175.

YAMAOKA, K.; NAKAGAWA, T.; UNO, T. (1978b) – Statistical Moments in Pharmacokinetics. **J. Pharmacokinet. Biopharm.** 6:6 (1978) 547-558.

YAMASHITA, S. [et al.] (1997) – Effects of Various Antiepileptic Drugs on Plasma Levels of Lamotrigine, a Novel Antiepileptic, in Rats. **Pharmacology.** 54:6 (1997) 319-327.

YANO, Y. [et al.] (1989) – Two-Compartment Dispersion Model for Analysis of Organ Perfusion System of Drugs by Fast Inverse Laplace Transform (FILT). **J. Pharmacokinet. Biopharm.** 17:2 (1989) 179-202.

YUEN, A.W.C. [et al.] (1992) – Sodium valproate acutely inhibits lamotrigine metabolism. **Br. J. Clin. Pharmacol.** 33:5 (1992) 511-513.

YUEN, A.W.C. (1994) – Lamotrigine: A Review of Antiepileptic Efficacy. **Epilepsia.** 35:Suppl 5 (1994) S33-S36.

ZARRANZ, J. (1992) – Epilepsia. In ROZMAN, F., ed. lit. – **Medicina Interna.** 12^a ed. Barcelona: ediciones Doyma, 1992. Vol. II: p.1420-1433.

ZARZUELO CASTAÑEDA, A. (1997) – Tratamiento de muestras biológicas. In **II Curso de Determinación de Fármacos por HPLC en fluidos biológicos.** Salamanca, 1997. p.66-70.

ZONA, C. [et al.] (2002) – Neocortical Potassium Currents Are Enhanced by the Antiepileptic Drug Lamotrigine. **Epilepsia.** 43:7 (2002) 685-690.

ZONA, C.; AVOLI, M. (1997) – Lamotrigine Reduces Voltage-Gated Sodium Currents in Rat Central Neurons in Culture. **Epilepsia.** 38:5 (1997) 522-525.