

BC/27096
IB/81200

T/UNICAMP

H677_e

*Estudo das Respostas
Farmacogenéticas à
Carbamazepina e à Fenitoína*

**Tese apresentada ao Departamento de
Genética e Evolução do Instituto de
Biologia - UNICAMP**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo (a) candidato (a)
Eduardo Alexandre Hofstatter
Hofstatter
e aprovada pela Comissão Julgadora
[Assinatura]
21/12/95

Candidato: Eduardo Alexandre Hofstatter

Orientador: Prof. Dr. Luis Alberto Magna

1995

Apoio Financeiro: CAPES e FAEP



UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE	TB	
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP	
	H677e	
V.	E.	
TCMBO BC/	27096	
PROC.	667/96	
C	<input type="checkbox"/>	D <input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00	
DATA	20/03/96	
N.º CPD		

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

CM-00085279-1

Hofstatter, Eduardo Alexandre
H677e Estudo das respostas farmacogenéticas à carbamazepina
e à fenitoína / Eduardo Alexandre Hofstatter. -- Campinas,
SP : [s.n.], 1995.

Orientador : Luis Alberto Magna.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Carbamazepina. 2. Fenitoína. 3. Farmacogenética.
4. Farmacologia clínica. 5. Anticonvulsivantes. 6. Epilepsia.
I. Magna, Luis Alberto. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Sumário

RESUMO	1
ABSTRACT	4
1. INTRODUÇÃO	7
2. OBJETIVOS	31
3. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODO	33
4. RESULTADOS	40
5. DISCUSSÃO	53
6. APÊNDICE	59
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

Figuras

Via Metabólica da Fenitoína	19
Principais Vias da Biotransformação Da Carbamazepina	21
Cromatograma do Fenobarbital, Fenitoína, Carbamazepina e Padrão Interno através de HPLC	39
Distribuição dos Níveis Plasmáticos de Fenitoína (Não Corrigidos para Dose/Kg/Dia)	43
Distribuição dos Níveis Plasmáticos de Fenitoína (Corrigidos para Dose/Kg/Dia)	46
Distribuição dos Níveis Plasmáticos de Carbamazepina (Não Corrigidos para Dose/Kg/Dia)	48
Distribuição dos Níveis Plasmáticos de Carbamazepina (Corrigidos para Dose/Kg/Dia)	52

ABREVIATURAS

CBZ =	CARBAMAZEPINA
DPH =	DIFENIL-HIDANTOÍNA (FENITOÍNA)
FB =	FENOBARBITAL
MPPH =	METIL-FENIL-FENIL-HIDANTOÍNA (PADRÃO INTERNO)
5HT =	5 HIDROXI-TRIPTAMINA
GABA =	ÁCIDO GAMA-AMINOBUTÍRICO
EDTA =	ÁCIDO ETILENO DIAMINO TETRA-ACÉTICO (anticoagulante)
HPLC =	HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (cromatografia líquida de alta resolução)
µg =	micrograma
°C =	Graus Celsius
mV =	milivolt
UV =	ultravioleta
EEG =	Eletroencefalograma
AUF =	unidade de ampliação dos sinais elétricos (para registro do cromatograma)
n° =	número (tamanho da amostra)
Fig. =	figura
Tab. =	tabela
p.ex. =	por exemplo
freq. =	frequência
pac. =	paciente
conc. =	concentração
cols. =	colaboradores
FT =	Faixa terapêutica
FCM =	FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
HC =	HOSPITAL DAS CLÍNICAS

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Luís Alberto Magna e Elisete, pela confiante orientação e acima de tudo pela amizade e palavras de estímulo com que me acolheram;
- Ao Prof. Dr. Gilberto de Nucci e Liliam, pelo apoio e amizade, que traduziram-se em acolhimento e equipamentos laboratoriais que viabilizaram este trabalho;
- À Heloísa H. A. Ferreira, cujo auxílio nas dosagens, organização das fichas e dados dos pacientes, compreensão e amizade foram imprescindíveis;
- À Maria Anunciatta Chinelatto, cuja amizade, preocupação para conosco e orientação humanística são de inestimável valor;
- Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Guerreiro, responsável pelo ambulatório de Epilepsia, pela constante disposição em colaborar;
- Ao Prof. Dr. Bernardo Beiguelman, pelas valiosas contribuições na redação;
- À secretária Claudia, do Departamento de Genética Médica;
- À secretária Tereza, do departamento de Genética e Evolução;
- À secretária Dora, do Departamento de Farmacologia;
- Ao João Eduardo Stersi Costa, pelo acabamento gráfico;
- Aos colegas de pós-graduação e docentes com os quais convivi.

*Dedico este trabalho aos meus filhos e demais familiares,
principalmente à minha mãe, que doou-se excepcionalmente
para que o mesmo fosse possível.*

...Talvez seja este, portanto, o desafio final proposto pelo conhecimento do Genoma Humano: redefinir nosso sentido e descobrir um meio de afirmar, em face de todos os detalhes técnicos da Genética, que a vida humana é maior do que o ADN do qual brotou, que os seres humanos conservam um valor espiritual que transcende os mistérios das sequências de 3 bilhões de pares de bases...

(T. Wilkie)

RESUMO

RESUMO

A fenitoína e a carbamazepina são fármacos anticonvulsivantes de faixa terapêutica estreita, sendo indicada sua monitorização terapêutica.

Neste trabalho descrevemos uma técnica de cromatografia líquida de alta resolução para medir os níveis plasmáticos dos anticonvulsivantes fenitoína, carbamazepina e fenobarbital nos pacientes do Ambulatório de Epilepsia do HC da UNICAMP, supervisionado pela Disciplina de Neurologia da FCM. Dosamos 925 amostras, com as quais obtivemos uma visão geral dos níveis plasmáticos de cada anticonvulsivante e detivemo-nos, com mais profundidade, na análise da distribuição dos pacientes segundo os níveis da fenitoína e da carbamazepina.

As amostras dos usuários de fenitoína totalizaram 216 e apresentaram um alto percentual de níveis plasmáticos deslocados da faixa terapêutica (44,48% abaixo e 27,12% acima da FT), indicando maior dificuldade de ajuste de doses. Além disso, 7 pacientes sob monoterapia apresentaram níveis plasmáticos muito acima da faixa terapêutica, sugerindo uma distribuição bimodal cuja explicação pode estar numa menor atividade enzimática devida à herança genética. Esses pacientes merecem uma investigação mais aprofundada.

As amostras de carbamazepina totalizaram 421 e comparativamente à fenitoína, apresentaram um percentual menor de níveis plasmáticos deslocados da faixa terapêutica (9,74% abaixo e 22,09% acima da FT). Mesmo no caso da carbamazepina, cujo percentual de amostras com nível dentro da faixa terapêutica

é maior, o trabalho tornou clara a importância de um controle sistemático dos níveis plasmáticos para detecção da aderência ao tratamento e das variações metabólicas em nossa população, dentre cujas causas as diferenças genéticas foram objeto especial de nossa atenção. Além das amostras de fenitoína e carbamazepina, foram dosadas ainda 96 de pacientes usuários de fenobarbital e 192 de pacientes sob regime de politerapia, cujos resultados foram descritos no capítulo 6 (apêndice) .

O método cromatográfico utilizado para as dosagens viabilizou a implantação de um serviço de rotina de controle dos níveis plasmáticos de anticonvulsivantes para o Departamento de Neurologia. Assim, cumprimos os objetivos propostos, e fornecemos subsídios para outros trabalhos que venham a ser desenvolvidos.

ABSTRACT

ABSTRACT

This thesis describes the use of a high performance liquid chromatography (HPLC) procedure to measure the plasma levels of the anticonvulsivants phenytoin, carbamazepine and phenobarbital in patients attended at the Epilepsy Ambulatory of the Department of Neurology at the university hospital of the State University of Campinas (UNICAMP). A total of 925 plasma samples were assayed for their anticonvulsivant levels with particular attention being paid to the concentrations of phenytoin and carbamazepine.

Of the 216 samples in which phenytoin was detected, the plasma levels were below and above the therapeutic range in 44.5 and 27.1%, respectively. This wide distribution outside of the recommended limits suggests a difficulty in regulating the circulating levels of this drug. In seven patients of the latter group, the concentrations were markedly greater than the acceptable upper limit. Such variation is suggestive of a bimodal distribution and may reflect a genetically-determined lower activity of the enzyme (s) involved in the metabolism of phenytoin, although the precise cause (s) of the high concentrations in these patients would merit further detailed investigation.

Carbamazepine was detected in 421 plasma samples, a lower percentage of which fell outside the recommended therapeutic range (9.7% below and 22.1% above) compared to phenytoin. Although the proportion of individuals with carbamazepine concentrations within the therapeutic range was greater than

for phenytoin, rigorous monitoring of the plasma levels was still necessary in order to ascertain the levels of patient compliance and genetic variation in this drug's metabolism within the population.

In addition to the above drugs, the levels of the phenobarbital were also determined in 96 patients using this anticonvulsant and in 192 individuals undergoing multi-drug therapy. The results for these two groups are provided in chapter 6 (Appendix).

The chromatographic method employed in this study proved to be useful for the routine monitoring of plasma anticonvulsant levels in patients attended by the Department of Neurology. This procedure and the findings of this study should provide a starting point for further investigations into anticonvulsant therapy.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O estudo interdisciplinar das diferenças interétnicas ou diferenças de população na resposta ou na disposição de agentes químicos exógenos denomina-se farmacogenética.

Na medida em que tais diferenças são genéticas, a farmacogenética é um ramo da farmacogenética. Contudo, frequentemente pode ser difícil determinar se uma dada diferença metabólica tem origem genética ou no ambiente, porque os fenótipos "metabolizador lento" e "metabolizador rápido" não são independentes dos fatores ambientais. A variação de pessoa a pessoa dentro de uma população pode ser principalmente genética, enquanto a diferença entre duas populações pode ser devida, por exemplo, à costumeira ingestão de diferentes alimentos.

O termo farmacogenética, introduzido na literatura pertinente em 1959 por Vogel (130) designa as variações geneticamente controladas entre os membros de uma espécie, na disposição dos fármacos e na resposta farmacológica. Seus conceitos fundamentais são oriundos das investigações acerca de casos de intoxicações que ocorreram em alguns indivíduos quando grandes populações humanas receberam potentes novos fármacos (82).

A farmacogenética emergiu como disciplina a partir da Segunda Guerra Mundial, com a observação de que alguns soldados negros norte-americanos sofriam hemólise sob ação da primaquina. Após o fim da guerra, detectou-se como causa desse fenômeno uma deficiência genética de atividade da enzima

desidrogenase de 6-fosfato de glucose. A farmacogenética tem se desenvolvido rapidamente como uma ciência da genética do metabolismo de fármacos mais do que de receptores de fármacos.

A variação genética é considerada a principal fonte de diferenças no metabolismo de fármacos entre espécies, sexos e indivíduos.

À medida em que os estudos farmacogenéticos foram se sistematizando nessas duas últimas décadas, acumularam-se evidências de grandes variações inter-individuais em percentuais significativos da população caucasóide, bem como dos demais grupos étnicos, na biodisponibilidade de vários fármacos. Por exemplo, aproximadamente 5% dos caucasóides e 18% dos japoneses têm capacidade defeituosa de metabolização da mefenitoína e do mefobarbital (60). O defeito relaciona-se ao polimorfismo do gene P450mp, o qual pertence à mesma família do gene P450dl, e é transmitido de forma autossômica recessiva (132).

Além disso, o conhecimento dos níveis plasmáticos dos fármacos de faixa terapêutica estreita, entre os quais incluem-se os anticonvulsivantes abordados neste trabalho, através da monitorização terapêutica instituída como rotina hospitalar, já demonstrou ser de fundamental importância em muitas decisões de conduta clínica, pois ajuda a elucidar problemas tais como os ligados à aderência ao tratamento, necessidade ou não de politerapia etc. Mesmo assim, como as investigações envolvem alto custo, estão longe de estarem concluídas.

A capacidade de biotransformação, ou seja, a aptidão para defender o organismo contra injúrias químicas, deve necessariamente ser variável, uma vez que a espécie humana é e sempre foi exposta a toxinas variáveis na alimentação e correlatos. As informações sobre a distância genética entre as populações, baseadas em comparações de diversos "loci" gênicos fornecem algumas bases de referências para comparações inter-étnicas.

Biotransformação é o processo pelo qual o organismo metaboliza um substrato em um ou mais derivados estruturalmente diferentes, os metabólitos, e é fundamental para a eliminação de vários compostos danosos. Algumas substâncias estranhas ao organismo, inclusive alguns fármacos, são muito lipossolúveis para serem excretadas com eficiência pelos rins e, após serem filtrados no glomérulo renal, são prontamente reabsorvidas por difusão, no epitélio tubular. A biotransformação permite a conversão desses compostos em outros mais polares, ou mais hidrossolúveis, e por isso mais favoráveis à excreção renal.

Apesar de o metabolismo de fármacos representar em geral uma desintoxicação do organismo, há exceções a essa regra e, em alguns casos, os produtos metabólicos são biologicamente ativos, respondendo total ou parcialmente pela atividade do composto original (é o caso da carbamazepina, da difenil-hidantoina e da primidona, como veremos adiante). Assim, alterações no metabolismo sempre têm um papel importante na intensidade e na duração da ação do fármaco, bem como na ocorrência de efeitos colaterais.

Justifica-se dessa forma o presente trabalho, que teve início com a implantação da Unidade de Farmacologia Clínica "MIGUEL SERVET", HC, Unicamp. Os objetivos dessa unidade incluem pesquisas de biodisponibilidade de fármacos e prestação de serviços de rotina para o Ambulatório de Epilepsia, do Departamento de Neurologia, na forma de dosagens de níveis plasmáticos de anticonvulsivantes nos pacientes usuários.

1.1. HISTÓRICO

A epilepsia é conhecida desde a antiguidade e, durante muito tempo, sua descrição envolveu conceitos religiosos, pois evoca a lembrança de um "transe espiritual". No fim do século passado, o neurologista inglês HUGHLINGS JACKSON (100) propôs que as crises convulsivas eram consequência de "descargas ocasionais, repentinas, excessivas, rápidas e locais da substância cinzenta". Por suas observações é considerado o pai dos conceitos modernos da epilepsia.

Nessa mesma época, C. SHERRINGTON (61) introduziu o termo sinapse para definir a zona de contato especializada descrita histologicamente por RAMON Y CAJAL (104). Desde 1920, quando OTTO LOEWI (61) demonstrou ser a acetilcolina um neurotransmissor do nervo vago para o coração, preparou-se o terreno para o intenso debate desencadeado na década de trinta sobre os mecanismos de transmissão sináptica. Duas escolas, uma "farmacológica" e outra "fisiológica" defendiam o ponto de vista de que existia apenas um mecanismo de transmissão sináptica. Os fisiologistas, liderados por JOHN ECCLES (61), defendiam que a transmissão era elétrica e os farmacologistas, liderados por HENRY DALE (61), defendiam que a transmissão era puramente química e que um mediador liberado pelo neurônio pré-sináptico iniciava uma corrente na célula pós-sináptica. Nas décadas de 50 e 60, os trabalhos de FATT e KATZ, ECCLES, FURSHPAN e POTTER (61), demonstraram que ambas as transmissões coexistem e com o advento da microscopia eletrônica, ficou claro que a forma das sinapses de transmissões química e elétrica eram distintas, e que os neurônios eram separados por uma fenda.

Muitos avanços no conhecimento da etiologia e classificação das epilepsias foram realizados desde então, mas continua válida a assertiva de que quase sempre as crises têm correlação com descargas anormais e excessivas observáveis com auxílio do EEG.

Esses avanços conduziram à definição de epilepsia pela OMS como sendo "um distúrbio cerebral crônico, de várias etiologias, caracterizado por convulsões recorrentes, causadas pela descarga excessiva dos neurônios cerebrais..." (36). A convulsão foi assim caracterizada como um evento ou sintoma com início e fim, enquanto as epilepsias representam um distúrbio crônico, segundo Porter são mais "um grupo de síndromes do que uma doença" (100).

A frequência estimada na população em geral é de 3 a 6 indivíduos afetados em cada grupo de 1000 habitantes (42). Observou-se, porém, que qualquer indivíduo pode vir a ter uma crise epilética, dependendo do estímulo ambiental, ou de um traumatismo, episódios febris, etc.. PORTER conclui que: "A epilepsia pode ser causada por praticamente todas as doenças ou distúrbios graves que acometem o ser humano" (100).

As classificações das epilepsias não foram tão simples de serem feitas quanto a definição, e a subdivisão mais antiga é a que situa de um lado as epilepsias com causas identificáveis (sintomática) e de outro as sem causas identificáveis (criptogênicas). O grupo criptogênico diminui à medida em que aprimoram-se os métodos de diagnóstico. As classificações podem obedecer a critérios anátomo-fisiológicos, tipo de agente desencadeante, idade de início das crises, ciclo sono-vigília etc. MERLIS (79), por exemplo, combinou os critérios "tipo de convulsão" e "etiologia". Outra abordagem seria a classificação quanto à influência psicossomática. Numa extremidade da escala, por exemplo, estariam as de origem psicogênica ("pseudocrises"), cuja cura é essencialmente psicoterápica. Na outra extremidade se situariam aquelas que dependem de ação medicamentosa ou cirúrgica e, entre ambos os extremos, grande número de tipos em que seria útil uma ação integrada da psicoterapia e da medicação ou cirurgia, mesmo quando o auxílio psicoterápico não influi na causa etiológica, mas no convívio com os sintomas e na cura.

O primeiro fármaco antiepilético efetivo introduzida no arsenal terapêutico foi o fenobarbital, em 1912 por HAUPTMANN (41). Desde então muitos progressos terapêuticos foram alcançados, mas o fenobarbital continua sendo utilizado, por seu baixo custo, naqueles pacientes em que os efeitos colaterais desse fármaco não são relevantes, e sua ação terapêutica é efetiva.

Dos outros fármacos aqui enfocados, a fenitoína foi a segunda a ser utilizada. Sintetizada em 1908 por BILTZ (103), suas propriedades anticonvulsivantes foram, contudo, conhecidas somente em 1938 (80). Os primeiros estudos referentes à fenitoína como anticonvulsivante e as primeiras descrições referentes às concentrações plasmáticas, sanguíneas e no líquido céfalo raquidiano após doses orais e endovenosas situam-se na década de 60. As observações pioneiras de efeitos colaterais correlacionados às concentrações sanguíneas inadequadas durante terapias de longa duração foram realizadas em 1966.

Por fim, a carbamazepina, que já era empregada na década de 60 para tratamento da neuralgia do trigêmeo, foi introduzida na década de 70 na terapia anticonvulsivante (103).

Os estudos envolvendo o emprego dos anticonvulsivantes nos seres humanos apresentam peculiaridades, algumas das quais exemplificamos a seguir:

a. O uso frequente da combinação de vários fármacos (politerapia) acarreta dificuldades analíticas como, por exemplo, para diferenciar o fenômeno de auto-indução enzimática do fenômeno de indução cruzada;

b. As epilepsias ocorrem em intervalos de tempo imprevisíveis, o que dificulta a observação clínica tanto do quadro, quanto do efeito dos fármacos sobre os sintomas;

c. Os compostos algumas vezes apresentam cinética de primeira ordem e outras vezes cinética de Michaelis-Menten;

d. a distribuição no organismo parece envolver números variáveis de compartimentos;

e. Os dados referentes aos metabólitos ainda são incompletos. Por exemplo, a epoxicarbamazepina (metabólito da carbamazepina) apresenta a mesma atividade que a carbamazepina em alguns estudos com animais, e 20% da atividade da carbamazepina nos estudos com seres humanos. Em momentos diferentes em relação à ingestão da droga mãe, apresenta nível plasmático variável entre 5 e 80% do nível da mesma, e uma ligação proteica plasmática de 50%, em comparação com 75% de ligação da droga-mãe.

f. A maioria dos trabalhos foi conduzida em condições de concentração em equilíbrio ("steady state"). Quando a meia vida dos fármacos é grande, as flutuações de nível plasmático são mínimas, mas se a meia vida é relativamente pequena (como a da carbamazepina) ela produz flutuações significativas.

Ainda assim alguns dados farmacológicos importantes já estão bem estabelecidos, como por exemplo a) a correlação entre concentrações plasmáticas crescentes dos anticonvulsivantes e a atividade paroxística decrescente no EEG1, com controle clínico das convulsões. Assim, ficou evidenciada uma relação dose-resposta; b) Um índice de distribuições plasmáticas em vários compartimentos foi estabelecido, com concentrações variando em paralelo. Uma decorrência disso foram os trabalhos tentando prever o nível de um fármaco no líquido céfalo-raquidiano a partir das concentrações salivares desse fármaco (o que pressupõe um número de assertivas sobre distribuição e ligação proteica ainda não confirmadas).

1.2. Mecanismo de Ação dos Anticonvulsivantes

Há duas vias gerais através das quais os fármacos podem atenuar ou eliminar as convulsões: a. através dos efeitos diretos nos neurônios alterados nos focos convulsivos; b. efeitos redutores da disseminação da excitação do foco das convulsões e prevenção do envolvimento da função de agregados de neurônios normais (103). Os anticonvulsivantes aqui focalizados agem principalmente pelo segundo mecanismo, ao que se conhece até o presente.

A. Fenitoína

Os efeitos da fenitoína em vários sistemas de segundos mensageiros, tais como os sistemas de nucleotídeos cíclicos e os sistemas de cálcio poderiam explicar a ação múltipla desse composto em numerosas células e funções fisiológicas. Já é claro, porém, que nenhuma ação isolada da fenitoína é suficiente para explicar todos os seus diversos efeitos no sistema nervoso. O efeito ou efeitos precisos desse anticonvulsivante no tecido neuronal, e a dúvida quanto a ter poucos ou muitos sítios de ação ainda precisam ser elucidados. Porém, abaixo são relacionados os mecanismos de ação já descritos, em torno de cuja importância já há consenso.

A.1. Efeito sobre a excitabilidade neuronal:

Acredita-se que o efeito principal da fenitoína seja impedir que o foco epilético se irradie para os neurônios subjacentes. Além disso, a fenitoína reduz o aumento prolongado da excitabilidade e da descarga repetitiva independente que ocorre nos nervos periféricos após uma estimulação rápida supramáxima. Esses efeitos nos nervos periféricos sugerem que a fenitoína tem um efeito geral de estabilização da membrana neuronal que pode, de alguma forma, ser relacionado aos efeitos do cálcio ou sódio na excitabilidade neuronal (124). A fenitoína é muito mais potente em inibir a fase tônica das convulsões generalizadas tonico-clônicas do que a fase clônica.

A.2. Efeito sobre a potenciação pós-tetânica (PPT) :

A potenciação pós-tetânica é um fenômeno fisiológico que tem sido relacionado ao desenvolvimento de áreas e hiper-excitabilidade no cérebro. A PPT é, ainda, um importante mecanismo que conduz a um encadeamento de impulsos nos circuitos excitatórios cerebrais e à difusão dessa atividade para os neurônios adjacentes bem como sua propagação para agregados neuronais distantes, resultando numa difusão incontrolada da excitação para o cérebro todo na descarga convulsiva tônica máxima (120).

A PPT refere-se especificamente ao aumento do potencial de ação do componente pós-sináptico elicitado pela estimulação pré-sináptica seguindo um estímulo repetitivo (tétano). Assim, estimular de forma repetitiva um circuito neuronal, cessar tal estímulo e novamente provocá-lo, produz uma resposta mais dramática nesse mesmo circuito.

Esse fenômeno sugere que o uso repetitivo de uma via neuronal sensibiliza-a durante um tempo para posterior descarga. Isso pode desenvolver uma hiper-excitabilidade nos circuitos neuronais e é um modelo atrativo, que implica em mecanismos neuronais normais no desenvolvimento da difusão do foco epilético.

Sabe-se que o efeito inibitório da fenitoína na PPT pode representar um dos maiores sítios de ação na prevenção da difusão das convulsões. O mecanismo pelo qual a fenitoína regula a PPT não foi claramente estabelecido. Contudo, é visível que tanto o acúmulo de cálcio no nervo terminal durante o tétano quanto a habilidade da fenitoína em bloquear os canais de sódio de uma forma uso-dependente podem ser mecanismos que contribuem para a ação da fenitoína no bloqueio da PPT.

A.3 Efeito na Descarga Repetitiva Continuada (DRC)

Tem-se acumulado um volume crescente de evidências que indicam que a DRC é uma propriedade importante dos neurônios e desempenha um papel no estado de excitabilidade da célula. A DRC está presente em vários tipos de neurônios do SNC e está envolvida na ação farmacológica anticonvulsivante na epileptogênese. A fenitoína é efetiva na regulação da DRC (56), e esta ação é coerente com a ação clínica como anticonvulsivante efetivo contra convulsões tônico clônicas generalizadas no ser humano. Os resultados experimentais, até o presente, indicam que os níveis de fenitoína no líquido céfalo-raquidiano no homem estão numa faixa de concentração que podem inibir a DRC. A hipótese da fenitoína agir como

anticonvulsivante limitando a DRC é atraente, mas ainda não confirmada. Alguns dos efeitos da fenitoína na DRC podem ser mediados pelo bloqueio uso-dependente dos canais de sódio produzido pela fenitoína.

A.4 Efeitos da fenitoína no transporte ativo de sódio -potássio.

Em 1955, WOODBURY (140) evidenciou que a fenitoína influencia de forma importante os movimentos do íon sódio através das membranas da célula nervosa. Esse trabalho ensejou muitas das pesquisas dos 30 anos seguintes em torno do papel da fenitoína na condutância iônica nas membranas neuronais. Esse autor sugeriu que a fenitoína regula o transporte de sódio no cérebro, e propôs que o mecanismo através do qual este anticonvulsivante poderia aumentar o transporte ativo de sódio seria sua ação sobre a ATPase de sódio e potássio. Ficou demonstrado que a fenitoína regula essa enzima sob certas condições e não sob outras. Tanto "in vivo" quanto "in vitro" a fenitoína aumenta a atividade da ATPase de sódio e potássio, segundo os experimentos realizados nos sinaptossomas cerebrais e medula (32,136) . DELGADO-ESCUELTA e HORAN (23) revendo os dados de vários experimentos concluíram que o efeitos da fenitoína no transporte ativo de potássio nos sinaptossomas ocorre sob condições nas quais o conteúdo de potássio na célula está reduzido, e a concentração de sódio aumentada, condições estas mais encontradas na região do foco epileptogênico. Postulou-se, então, que a causa pela qual a fenitoína não tem efeito na regulação da atividade da ATPase de sódio e potássio sob condições normais, decorre do fato de que o fármaco só atuaria quando as proporções de sódio e potássio na membrana celular estão alteradas, como nos focos epileptogênicos.

Ainda a partir dos estudos de WOODBURY, vários investigadores demonstraram que a fenitoína diminui o número de canais de sódio abertos na fase inicial do potencial de ação (121) . Mais recentemente estabeleceu-se uma semelhança entre a ação da fenitoína e a da tetrodotoxina ou dos anestésicos locais no bloqueio dos canais de sódio (25,121) , ação esta que pode explicar alguns dos efeitos de estabilização de membrana da fenitoína.

A.5. Efeitos da fenitoína nos canais de cálcio

A fenitoína inibe tanto o influxo de cálcio quanto o de sódio durante a despolarização e, segundo os estudos de FERRENDELLI et al. (31) , essas condutâncias são afetadas independentemente uma da outra. Pode também inibir a captação e sequestro de cálcio no nervo terminal após sua entrada. Como consequência, a fenitoína tem tanto o efeito depressivo através do bloqueio da captação de cálcio quanto um efeito potencialmente excitatório através do bloqueio da captação e sequestro do cálcio nos nervos terminais, o que levou vários pesquisadores a sugerirem ser essa a explicação para a ação tanto anticonvulsivante quanto excitatória no tecido nervoso.

A.6 Efeito nas enzimas "calmodulina-alvo"

A calmodulina é a principal proteína ligada ao cálcio relacionada à mediação de alguns dos efeitos do cálcio na função celular (14) . Formando um complexo com o cálcio, pode regular vários sistemas enzimáticos na célula. A principal enzima regulada pelo cálcio e pela calmodulina é uma cinase de proteína específica dependente do cálcio e da calmodulina. A cinase de calmodulina II é a principal cinase de proteína dependente de cálcio que se demonstrou ser regulada pelo cálcio e pela calmodulina. Evidenciou-se que a fenitoína inibe a fosforilação protéica regulada pelo cálcio e pela calmodulina em preparações neuronais e em preparações dos nervos terminais pré-sinápticos. A capacidade da fenitoína de regular esse sistema enzimático cálcio-dependente sugere que a fenitoína pode modular vários dos efeitos de segundo mensageiro do cálcio no sistema nervoso e, em consequência, vários outros processos celulares, explicando, assim, porque a fenitoína influencia vários processos bioquímicos neuronais e não neuronais, alguns deles inclusive tóxicos. O papel exato da fenitoína na inibição dos sistemas enzimáticos regulados pelo cálcio e pela calmodulina é uma área importante para futuras investigações.

A.7 Efeitos no metabolismo dos nucleotídeos cíclicos

Demonstrou-se que a fenitoína regula o metabolismo do AMP cíclico (adenosina 3,5-monofosfato) e do GMP cíclico (guanosina 3,5-monofosfato) . Ambos os nucleotídeos são apontados como os principais segundos mensageiros na função celular (30) . A fenitoína deprime os níveis basais do GMP cíclico no cerebelo "in vivo", bem como previne as elevações do nível cerebral do AMP cíclico e do GMP cíclico resultantes das convulsões por estímulo elétrico.

Os estudos desenvolvidos até o momento sugerem que a fenitoína pode atuar diretamente no metabolismo dos nucleotídeos ou que esta ação pode ser secundária aos seus efeitos estabilizadores, que resultam em alterações na produção ou metabolismo do nucleotídeo cíclico durante a despolarização neuronal. A relação entre tais efeitos e a ação anticonvulsivante ou tóxica ainda está em estudos.

A.8 Efeitos nos sistemas de neurotransmissão

A fenitoína influencia a liberação de neurotransmissores em várias preparações (141) . Ela inibe a liberação de norepinefrina e outros neurotransmissores de preparações de nervos terminais intactos tanto "in vitro" quanto "in vivo", e a recaptação de neurotransmissores. Tais efeitos dependem da dose de fenitoína , uma vez que diferentes efeitos são obtidos com diferentes doses, o que sugere que a fenitoína age em diferentes sítios na regulação da liberação e recaptação de transmissores. A fenitoína também diminui a concentração de ácido glutâmico no cérebro e aumenta a concentração de glutamina e GABA, efeito este observado em diferentes espécies e preparações, o que sugere que esse antiepilético desempenha um papel na regulação do nível e metabolismo desse principal neurotransmissor inibitório. A fenitoína afeta ainda o metabolismo da acetilcolina. Tais efeitos podem ser regulados pela ação da fenitoína nos sistemas de segundos mensageiros do cálcio e nucleotídeos cíclicos.

A fenitoína deprime a transmissão sináptica (141). Mais recentemente, observou-se que a fenitoína pode inibir a transmissão sináptica dependente de despolarização, mas pode facilitar vários potenciais de fundo durante o período de "repouso" da sinapse, o que lança luz sobre a capacidade tanto excitatória quanto inibitória da mesma sobre o sistema nervoso.

A fenitoína pode inibir a liberação de neurotransmissores dos sinaptossomas tanto por bloqueio do fluxo de cálcio quanto por inibição direta dos processos bioquímicos sinaptossômicos intracelulares tais como fosforilação da proteína e outros eventos mediados pela calmodulina. Sob condições onde o cálcio penetra nos sinaptossomas através de algum ionóforo, a fenitoína poderia ainda inibir a liberação dos neurotransmissores. Esses estudos propiciaram a primeira evidência de que existem ao menos dois mecanismos para explicar os efeitos da fenitoína na liberação dos transmissores sinápticos. A fenitoína mais provavelmente bloqueia a liberação de transmissores durante um potencial de ação, minimizando ou limitando o aporte de cálcio e tendo um efeito específico em outros processos moleculares no interior das terminações nervosas que modulam a liberação de transmissores. A fenitoína inibe o fluxo de cálcio para o interior dos sinaptossomas e bloqueia a entrada de cálcio nas mitocôndrias, as quais servem como importantes sistemas tamponantes para manter a concentração de cálcio no nervo terminal num nível baixo. Inibindo esse processo, a fenitoína pode efetivamente aumentar o cálcio intra-sinaptossômico, causando uma ligeira hipersensibilidade com um aumento significativo em vários potenciais de fundo.

A fenitoína tem visíveis efeitos diretos na transmissão sináptica. Contudo, tais efeitos podem ocorrer tanto durante uma convulsão quanto durante a fase interictal. Assim, o efeito da fenitoína no controle das convulsões sem influir significativamente nos processos mentais não se explica claramente por esse mecanismo. Talvez alguns dos efeitos de comportamento observados com o uso da fenitoína estejam relacionados com esse amortecimento da transmissão sináptica.

a.9. Receptores de Fenitoína

A neurofarmacologia dos receptores desempenhou um papel primordial no desenvolvimento de vários fármacos nos últimos 20 anos. Até o momento, porém, exceto para o receptor benzodiazepínico (10), não há evidências para um sítio de ligação específico para antiepilépticos. Estudos recentes indicam que a fenitoína em concentrações terapêuticas desloca efetivamente os benzodiazepínicos desse receptor, sugerindo que a fenitoína também se liga a esse receptor em concentrações terapêuticas e propiciando evidências de uma proteína de ligação específica para a fenitoína no sistema nervoso central. A identificação de receptores de antiepilépticos tem implicações importantes no desenvolvimento de novos fármacos e na compreensão dos mecanismos de ação dos antiepilépticos e, portanto, é uma área fundamental para investigações futuras.

Sumário: Unificando os mecanismos de ação

Nenhum mecanismo de ação isolado da fenitoína pode responder por todos os seus efeitos.

A capacidade da fenitoína de regular o transporte de sódio através das membranas neuronais é um dos mecanismos de ação principais em que, certamente, se baseiam alguns dos efeitos clínicos no tecido neuronal. Por outro lado, a capacidade da fenitoína de modular a descarga repetitiva continuada (DRC) pode explicar a sua ação inibitória sobre a fase tônica das convulsões generalizadas tônico-clônicas. A ação da fenitoína sobre os sistemas de segundo mensageiro calmodulina e nucleotídeo cíclico podem ser os responsáveis por alguns dos vários efeitos da fenitoína nos processos celulares.

A capacidade da fenitoína de regular e inibir a liberação de neurotransmissores voltagem-dependentes nas sinapses também pode desempenhar um papel importante na ação terapêutica deste composto.

Há, ainda, a inibição dos canais de cálcio e retirada de cálcio de dentro dos nervos terminais, que claramente influem muito na ação excitatória e inibitória desse antiepiléptico. O efeito regulatório da fenitoína sobre a potenciação postetânica (PPT) também explica algumas das propriedades anticonvulsivantes do fármaco. Os efeitos inibitórios da fenitoína na PPT podem ser explicados ao nível molecular pela ação da mesma nos sistemas de cálcio e sódio.

B. Carbamazepina

A carbamazepina é um congênera estrutural do tricíclico antidepressivo imipramina, e foi demonstrada sua eficiência nos tratamentos das convulsões parciais simples, parciais complexas, e tônico-clônicas generalizadas. É inefetiva nas crises de ausência generalizadas (13,112,118). Mostrou-se equivalente à fenitoína no tratamento das convulsões parciais e tônico-clônicas. Pode ser efetiva em dose única e em tratamento de longa duração da psicose maníaco-depressiva. É considerada ainda o medicamento de escolha para as nevralgias do trigêmeo.

Os mecanismos propostos para explicar a ação da carbamazepina podem ser divididos em dois grupos básicos: 1. Ação da carbamazepina nos canais de sódio para reduzir as descargas repetitivas contínuas de alta frequência de potenciais de ação e 2. Ação da CBZ na transmissão sináptica.

b.1. Redução das descargas repetitivas contínuas de alta frequência pela CBZ.

Alguns estudos já demonstraram a capacidade da CBZ de reduzir a excitabilidade de nervos periféricos (49,65). Tais observações sugerem que a CBZ reduziu diretamente a condutância de sódio, que é subjacente ao potencial de ação, uma vez que houve um aumento do limiar, diminuição da velocidade de condução, e diminuição da altura do potencial de ação. Porém esses resultados foram sempre observados em experimentos com concentrações de CBZ supra-terapêuticas. Outros estudos iniciais também sugeriram que a CBZ reduziu a descarga espontânea de potenciais de ação registrados em nervos periféricos (49). Hershkowitz e Raines (45) demonstraram que a CBZ deprime a atividade "fina" do músculo em concentrações que têm pouco ou nenhum efeito na velocidade de condução nervosa, de uma maneira semelhante à produzida pelos anestésicos locais. Além da CBZ, seu metabólito ativo, a epoxi-CBZ também mostrou-se efetiva em limitar as descargas repetitivas de alta frequência, em concentrações comparáveis às da CBZ, enquanto o metabólito inativo, a diol-CBZ não afetou a descarga repetitiva de alta frequência

mesmo em concentrações de maior magnitude do que aquelas em que a CBZ mostrou-se efetiva. Assim, a CBZ e seu metabólito ativo limitaram a descarga repetitiva continuada de alta frequência em concentrações séricas terapêuticas que não modificaram os potenciais de ação isolados. O efeito da CBZ nas descargas repetitivas apresenta três propriedades: 1. Voltagem-dependência: a redução da descarga repetitiva continuada pela CBZ pode ser reforçada evocando os potenciais de ação de um potencial de membrana reduzido e pode ser revertido evocando a sequência repetitiva que se segue à hiperpolarização da membrana;

2. Uso-dependência: quando se produz uma limitação, o primeiro potencial de ação na sequência de potenciais de ação não é afetado. Contudo, com potenciais de ação sucessivos, há uma redução no índice máximo da ascensão e nas alturas dos potenciais de ação enquanto há falha das descargas;

3. Tempo-dependência: Após uma sequência de potenciais de ação ter sido evocada para produzir uma descarga reduzida na presença de CBZ, potenciais de ação evocados subsequentes à primeira sequência foram, também, reduzidos em amplitude e taxa máxima de ascensão. Esses resultados sugerem que a CBZ afeta os canais de sódio, provavelmente inativando-os. Propôs-se que a CBZ liga-se aos canais de sódio apenas no estado inativo e, assim, limita a descarga repetitiva apenas quando a membrana estiver despolarizada, de tal forma que uma fração dos canais esteja no estado inativo (77). O bloqueio das descargas repetitivas pode ser revertido através da hiperpolarização da membrana para remover toda inativação dos canais de sódio. Além disso, desde que a inativação seja reforçada pela CBZ, os potenciais de ação iniciais na sequência não são afetados, mas os potenciais de ação subsequentes na sequência são mais afetados devido à prolongada inativação dos canais de sódio abertos durante os potenciais de ação iniciais na cadeia. Finalmente, a recuperação dos canais de sódio da inativação é demorada e, assim, a redução nos potenciais de ação produzidos numa sequência podia persistir por várias centenas de milissegundos. Assim, propôs-se que a CBZ limitou a descarga repetitiva de alta frequência ligando-se aos canais de sódio no estado inativo e retardando a taxa de recuperação da inativação desses canais.

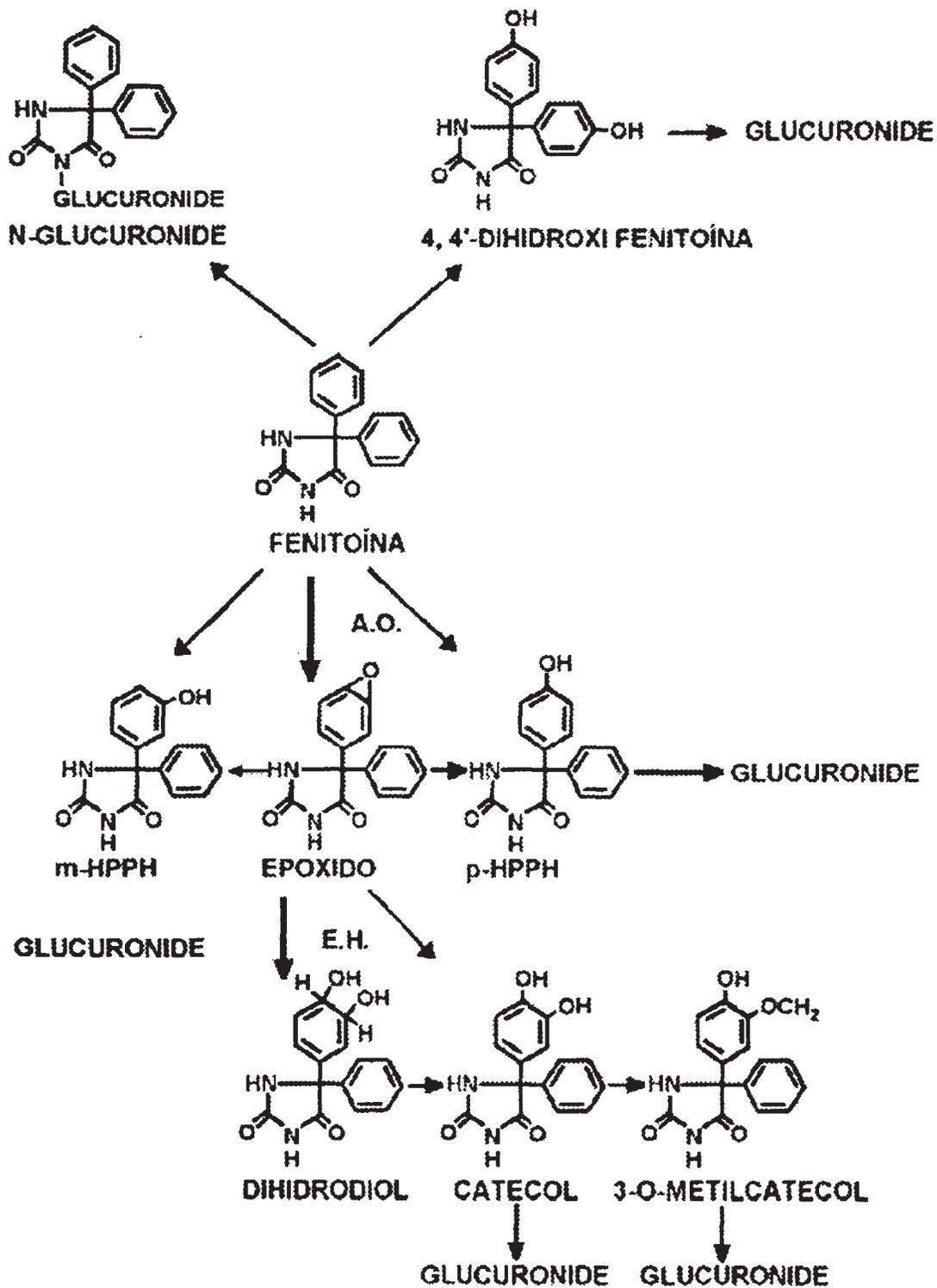
Nos neurônios piramidais do hipocampo (considerado uma preparação neuronal mais organizada), observou-se que o efeito anticonvulsivante da CBZ deve-se diretamente à redução da excitabilidade da membrana dos neurônios (122). Assim, a ação da CBZ traduz-se na ligação aos canais de sódio e no reforço à inativação dos canais de sódio voltagem-dependentes.

b.2. Ações sinápticas da CBZ

Os estudos disponíveis até o presente indicam que a CBZ pode diminuir a transmissão sináptica excitatória, mas não esclarecem se o efeito da CBZ é pré ou pós-sináptico (34,44,106).

A CBZ também altera a ligação específica dos receptores dos agonistas da adenosina (74,119,141) mas essa propriedade não é a responsável pelas suas propriedades anti-epiléticas (74,134).

Figura 1
Via Metabólica da Fenitoína



Quanto à ação da CBZ sobre a transmissão sináptica por GABA, os resultados, até agora obtidos, sugerem que este antiepiléptico não modifica os mecanismos receptores GABA (77) .

Sumário: unificando os mecanismos de ação da carbamazepina

Tanto a CBZ quanto a epoxi-CBZ limitam as descargas repetitivas continuadas de alta frequência dos potenciais de ação sódio-dependentes, provavelmente ligando-se à forma inativa dos canais de sódio, produzindo um bloqueio uso- e voltagem-dependente dos canais de sódio. Assim, quando os neurônios estão despolarizados, a CBZ será mais efetiva, uma vez que mais canais estão no estado inativo. Sob condições fisiológicas normais, é provável que os axônios mielinizados e não mielinizados dos vertebrados tenham um grande potencial de membrana negativo, e dessa forma os potenciais de ação propagados são relativamente resistentes à ação da CBZ. Em contraste, o corpo celular dos neurônios está sujeito a despolarizações sinápticas e a correntes internas que produzem descargas abruptas. Isso é particularmente verdadeiro em neurônios sob descarga epilética. A CBZ é efetiva, assim, em limitar os potenciais de ação de alta frequência gerados nos neurônios lesados.

Além de alterar a excitabilidade neuronal, a CBZ pode alterar o processo de transmissão sináptica por afetar os canais de sódio pré-sinápticos. Em suma, a CBZ parece agir tanto na pré-sinapse, bloqueando os potenciais de ação de descarga, quanto na pós-sinapse, bloqueando o desenvolvimento de descargas repetitivas iniciadas nos corpos celulares. Esse efeito combinado pré e pós-sináptico é, provavelmente, a base para a ação antiepilética da CBZ.

1.3. Propriedades Químicas da Carbamazepina e da Fenitoína

1.3.1. Fenitoína

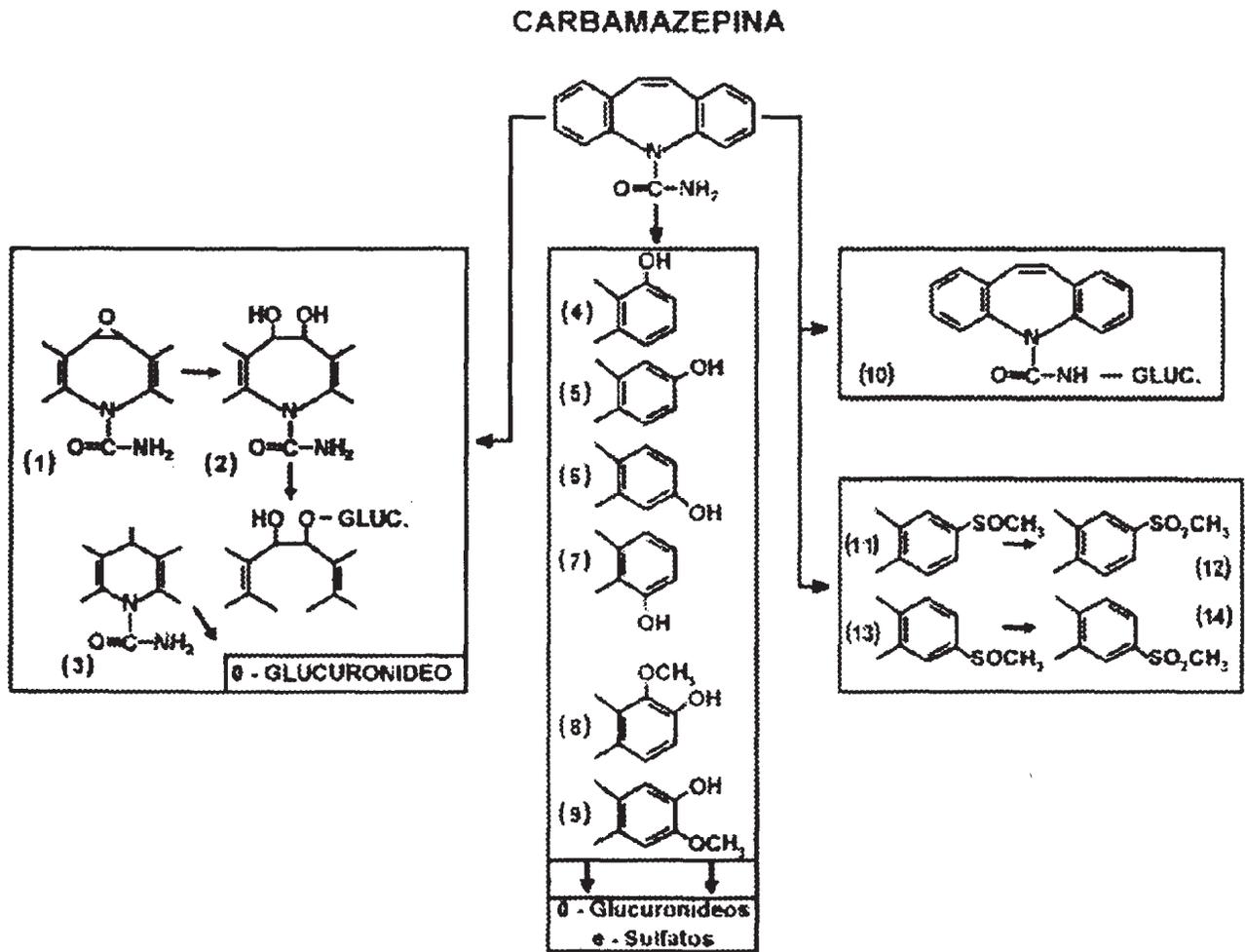
Fenitoína é o nome genérico da 5,5-difenil-hidantoína (forma ácida) . O nome relacionado no "Chemical Abstracts" é 5,5-diphenyl-2,4-imidazolidinedione. O ácido livre tem um peso molecular de 252.26, e o sal sódico tem um p.m. de 274.25, equivalente a um conteúdo de ácido livre de 91.98%. A forma ácida é utilizada em suspensões aquosas e em tabletes mastigáveis. Por outro lado, cápsulas mastigáveis, comprimidos, suspensões injetáveis são preparadas a partir do sal. A diferença de 8% entre uma e outra forma deve ser levada em conta, quando se altera o modo de administração.

A fenitoína é um ácido orgânico fraco, pouco solúvel em água. Sua constante de dissociação aparente ou pKa, que representa o pH no qual metade do fármaco é ionizada, é de 8.06 (78) . Sua solubilidade no plasma a 37 °C é de 75µg/ml, em parte devido à ligação protéica. De modo geral, concentrações altas de fenitoína requerem soluções fortemente alcalinas para se solubilizarem. Por exemplo, em meio com pH=5.4 a solubilidade é de 19.4µg/ml (25.4 °C) , com pH=7.4 a solubilidade é de 20.5 (25.2 °C) , com pH=9.1 (tampão borato) a solubilidade é de 165 µg/ml, e com pH=10, 1.520µg/ml.

A fenitoína sódica não é recomendada como um padrão analítico devido ao seu conteúdo variável de água, e à sua conversão parcial a ácido livre , quando exposta ao dióxido de carbono.

Figura 2

Principais Vias da Biotransformação da Carbamazepina



1.3.2. Carbamazepina

A carbamazepina é um derivado do iminostilbene. Sua fórmula química é descrita como 5-carbamil-5H-dibenzo (b,f) azepine-5-carboxamide. Tem um peso molecular de 236.26. É um composto cristalino branco com um ponto de fusão entre 190 e 193 oC. Seu comportamento é de uma substância lipofílica neutra. Dissolve-se em etanol, clorofórmio, diclorometano e outros solventes, mas é virtualmente insolúvel na água. Sua solubilidade em tampão fosfato, pH 7.4, é 72µg/ml. O espectro ultravioleta da CBZ apresenta um pico maior em torno de 220nm e outro menor em 288 a 290 nm. Quando analisada por técnicas de difração por Raio-X, suas características aproximam-na muito dos fármacos psicoativos tricíclicos, especialmente da imipramina. A dupla ligação entre os carbonos 10 e 11 é instável e proporciona um sítio de ação para a enzima de biotransformação na etapa de "epoxidação".

1.4. Propriedades Farmacológicas

1.4.1. Fenitoína

A fenitoína atua sobretudo no SNC. Tem ação em todos os tipos de epilepsia, exceto nas crises de ausência. Não causa depressão no SNC. Suas propriedades mais facilmente demonstráveis são a capacidade de limitar o desenvolvimento máximo das crises e a de reduzir a difusão do processo comicial a partir do foco ativo, de onde vem sua utilidade clínica. Embora possa induzir a remissão total das crises tônico-clônicas generalizadas, a fenitoína não elimina totalmente a aura sensitiva, nem outros sinais prodromicos (93) . Diferentemente do fenobarbital, a fenitoína não eleva o limiar das crises induzidas por drogas convulsivantes como estriçnina, picrotoxina, ou pentilenotetrazol. Sua capacidade de elevar o limiar das crises induzidas por eletrochoque é limitada.

1.4.2. Carbamazepina

Apesar dos efeitos farmacológicos da carbamazepina no homem e nos animais se parecerem em muitos aspectos aos da fenitoína, ambos os fármacos apresentam também importantes diferenças. A CBZ tem maior ação sobre descargas induzidas por estímulos nas amígdalas de ratas (1) , e bloqueia melhor as convulsões induzidas por pentilenotetrazol (115) . Produziu respostas terapêuticas em pacientes maníaco-depressivos, inclusive alguns nos quais a terapia com lítio não surtira efeito (102) . A carbamazepina possui efeitos antidiuréticos que, às vezes, se associam com concentrações plasmáticas diminuídas de ADH (103) . As doses terapêuticas de carbamazepina aumentam a frequência das descargas dos neurônios adrenérgicos (89) . A capacidade de aumentar as descargas dos neurônios adrenérgicos contribui para a ação antiepilética da droga.

1.5. Farmacocinética, Farmacodinâmica e Metabolismo da Fenitoína e da Carbamazepina

1.5.1. Fenitoína

A biotransformação da fenitoína cujo esquema é mostrado na fig. 1 obedece à cinética de MICHAELIS-MENTEN, ou seja, os órgãos metabolizadores removem um percentual constante do fármaco que os alcançam em determinado tempo mas, a partir de certa quantidade de fármaco ingerido, sobrevem o fenômeno de saturação enzimática, e o percentual do substrato metabolizado decrescerá com o aumento da concentração do mesmo. (Um dos exemplos mais expressivos de saturação enzimática é, justamente, o da fenitoína). Esta característica tem, ao menos, duas implicações importantes: 1. Com o sistema saturado, o percentual de metabolização por unidade de tempo e a taxa de eliminação decrescem ao elevar-se a concentração sérica. Interrompida a administração, a fase de eliminação será não-linear, e a meia vida diminuirá com o decréscimo nas concentrações; 2. Com uma relação entre concentração sérica no "estado de equilíbrio" e dose administrada não-linear, uma alteração na dose produz uma alteração desproporcionalmente grande na concentração sérica e no efeito farmacológico. O limite no qual a relação dose-concentração se altera apresenta ampla variação inter-individual, e o efeito do aumento da dose na concentração sérica torna-se difícil de ser previsto em cada paciente, passando de níveis subterapêuticos para níveis tóxicos com pequenas variações de dose. A inibição por retro-alimentação observada em animais não confirmou-se em nossa espécie (quanto à fenitoína).

A pouca hidrossolubilidade da fenitoína influi em suas características farmacocinéticas, pois altera a absorção intestinal, que é lenta, às vezes variável e incompleta. MELIKAN e cols. encontraram diferenças de biodisponibilidade significativas entre os preparados para uso oral (78).

A concentração plasmática máxima após dose única produz-se após três a doze horas. A absorção lenta sob medicação crônica atenua as flutuações de concentração do fármaco entre as doses. A ligação com proteínas plasmáticas (principalmente albumina) está em torno de 90%. Uma fração maior do que 10% de fármaco livre é encontrada em neonatos, em pacientes com hipoalbuminemia, e em urêmicos (103). A proporção entre fármaco livre e fármaco conjugado apresenta-se constante em todos os tecidos, inclusive o nervoso. Somente a fração plasmática livre alcança o líquido céfalo raquidiano.

A faixa terapêutica situa-se entre 10 e 20 mg/l. A correlação entre a concentração plasmática e os efeitos clínicos é considerada boa. Segundo RALL e SCHLEIFFER (103), os primeiros efeitos tóxicos (nistagmo) manifestam-se a partir de concentrações plasmáticas de 20 µg/ml. A ataxia manifesta-se a partir de 30 µg/ml e a letargia a partir de 40 µg/ml.

Porter chama a atenção para o fato de que existem muitas exceções quanto à faixa terapêutica (a qual deve ser usada apenas como orientação geral). Alguns pacientes toleram concentrações plasmáticas acima de 20 µg/ml e até mesmo necessitam das mesmas para o controle de suas crises (100).

Em nossa prática laboratorial, tivemos oportunidade de confirmar o acerto das ponderações de PORTER, quanto a esse particular, conforme adiante será discutido.

Menos do que 5% da fenitoína se excreta intacta na urina. O restante é metabolizado principalmente pelo sistema microsomal hepático (microsomo P450). Em experimentos com dose única, 60 a 70% do

fármaco são convertidos no derivado parahidroxifenílico, que é inativo. O restante do fármaco é convertido em dihidroxicatecol, seu derivado 3-metoxi, e o dihidrodiol. Os metabólitos se excretam inicialmente na biliar e a seguir pela urina, grande parte em forma de glucurônido.

A meia vida plasmática varia entre 6 e 24 horas. Em concentrações menores do que 10 µg/ml a eliminação é exponencial ou de primeira ordem, e em concentrações maiores, a eliminação passa a depender da dose, o que caracteriza o fenômeno da cinética de saturação (103).

1.5.2. Carbamazepina

A biotransformação da carbamazepina mostrada esquematicamente na fig. 2 obedece a uma cinética de primeira ordem. Seu perfil farmacocinético é fortemente influenciado por sua solubilidade limitada em água, o que a torna de absorção lenta e até certo ponto irregular por via oral, e por sua capacidade de auto indução enzimática, que reduz sua meia vida depois de certo tempo de uso. As concentrações plasmáticas máximas ocorrem após 4 a 8 horas a ingestão de dose única, podendo retardar-se até vinte e quatro horas. A ligação com proteínas plasmáticas situa-se em torno de 75% nas concentrações usuais plasmáticas, e a concentração no LCR corresponde aproximadamente à concentração do fármaco livre no plasma (17 a 31% da concentração plasmática). A proporção de epoxicarbamazepina no LCR situa-se entre 45 e 55% da concentração plasmática (MORSELLI e cols., 89, citado por ROGAWSKY e PORTER) (81).

LAWLESS e cols. (69) encontraram uma variação da ordem de 4 vezes na fração livre da carbamazepina plasmática, com uma média em torno de 25% de CBZ livre, resultado coerente com os demais autores. Eles sugerem que esta variação de percentual de CBZ livre explica alguns dos casos em que não há correlação entre níveis de CBZ terapêuticos e remissão dos sintomas e que por isso a determinação do percentual de CBZ plasmática livre deve tornar-se rotineira, pois representaria um avanço na monitorização terapêutica.

No homem, a via metabólica predominante leva à formação do composto 10,11-epóxi-carbamazepina, que é biologicamente ativo tanto no homem quanto nos animais. Desse composto formam-se compostos inativos, excretados pela urina em forma de glucurônidos. Menos de 3% são excretados na urina na forma original ou epóxi.

Em ensaios de dose única, a meia vida plasmática média é de 36 horas, oscilando de 20 a 50 horas. Em monoterapias de longa duração, a meia vida cai para 16 horas (10 a 20 horas) e em politerapias, pode cair ainda mais (9 a 10 hs). A vida média da 10,11-epoxi é mais curta do que a do composto original.

1.6. Fatores que Influenciam o Metabolismo da Fenitona e da Carbamazepina

1.6.1 Ligados à idade

As reações de fase I realizam-se mais lentamente no recém-nascido, especialmente se prematuro. No recém nascido a termo, o conjunto de enzimas do citocromo P450 apresenta, aproximadamente, metade da atividade apresentada no adulto. Porém como o sistema P450 apresenta vários citocromos diferentes, a medição do conteúdo total do citocromo P450 não permite prever a taxa com que cada um deles é metabolizado. Além disso, as atividades enzimáticas envolvendo diferentes substratos não são influenciadas pela idade gestacional de forma equitativa e não seguem igual padrão de maturação (43).

A biotransformação "in vivo" é afetada também por outros fatores tais como fluxo sanguíneo hepático, taxa de ligação protéica plasmática e presença de indutores e inibidores endógenos, os quais podem estar alterados no neonato (66). Um exemplo típico da diferença metabólica entre adultos e recém nascidos é constituído pela teofilina. Recém-nascidos prematuros são incapazes de desmetilar a teofilina em 3-metilxantina (desmetilação normal em bebês, crianças e adultos) mas são capazes de n-metilar a teofilina para cafeína (bebês, crianças e adultos são incapazes). A cafeína, por sua vez, é metabolizada de forma lenta nesses prematuros, resultando num acúmulo clinicamente significativo.

Quanto aos anti-epiléticos, sua biotransformação está reduzida nos recém-nascidos. Quando houver contato com os fármacos por via transplacentária, a taxa metabólica estará mais alta nos futuros bebês, pois ocorre indução enzimática na vida intrauterina (43).

A capacidade de biotransformação aumenta gradualmente durante várias semanas até vários anos, alcançando níveis frequentemente mais altos do que os observados em adultos, para a maior parte dos fármacos.

A fenitoína e a carbamazepina tem seu metabolismo acelerado na infância, explicando, assim, porque as crianças de 1 a 6 anos requerem doses maiores destes fármacos. (43)

Os níveis de fenitoína sérica tendem a ser mais altos na velhice (52). Contudo em pacientes idosos com hipoalbuminemia, o "clearance" da fenitoína pode estar acelerado, provavelmente devido ao grau mais baixo de ligação protéica plasmática facilitar a captação na célula hepática (96). A cinética de uma única dose de carbamazepina não se altera na velhice (72), mas não podemos inferir desses dados o comportamento desse fármaco em tratamentos de longa duração.

A maioria das reações de fase 2 ocorre mais lentamente no recém nascido, especialmente se prematuro (43). O bloqueio na capacidade de conjugação afeta particularmente a etapa de glucuronização, enquanto a conjugação de sulfato pode ocorrer numa taxa relativamente eficiente.

Os sistemas enzimáticos responsáveis pela conjugação maturam em tempos diferentes. A maturação se processa mais lentamente para a conjugação glucurônica, comparada com outros. O desenvolvimento da capacidade de glucuronização varia dependendo do substrato que está sendo investigado, devido à heterogeneidade da UDP- glucuronil transferase. Os valores para adultos da atividade de glucuronização são usualmente atingidos na idade de três anos (43). Ainda são limitadas as informações sobre a eficiência das

reações de fase 2 em pacientes de idade mais avançada, contudo a idade parece afetar menos a capacidade de conjugação glucurônica do que a capacidade de oxidação (26) .

1.6.2 Fatores ligados ao Sexo

Em alguns animais há acentuadas diferenças ligadas ao sexo, na taxa de metabolismo dos fármacos. No homem, tais diferenças são menores e menos importantes . O sexo pode também modular a resposta a uma variedade de fatores que afetam o metabolismo dos fármacos. o decréscimo no índice de oxidação de vários fármacos na velhice, p. ex., é muito mais acentuado no homem do que na mulher. (96)

1.6.3. Gravidez

Quanto à gravidez, vários fatores afetam a taxa de metabolismo dos fármacos. Eles incluem mudanças hormonais, aumento na temperatura corporal, influência do feto e da placenta no metabolismo dos fármacos, alterações na ligação protéica no plasma e na hemodinâmica que influi na liberação do fármaco para o sítio de metabolização. Não há um padrão único de metabolização nas gestantes (44) . Alguns fármacos têm seu metabolismo reduzido (teofilina, p.ex.) e outros inalterado (propranolol, p. ex.) . A biotransformação da fenitoína e da carbamazepina acelera-se na gestante, reduzindo-se o nível sérico (5,44,53) .

1.6.3. Doenças hepáticas e renais

Nas enfermidades hepáticas a alteração hepatocelular leva à redução da atividade enzimática. Por outro lado, a redução concomitante da ligação protéica aumenta a quantidade de fármaco livre para metabolização, efeito que contrabalança a diminuição da atividade enzimática. O predomínio de uma ou outra tendência depende do tipo e grau da enfermidade, além de outros fatores (idade, grau de hipoalbuminemia etc.) (138) . No caso da fenitoína, por exemplo, o aumento da eliminação metabólica observado na uremia não pode ser explicado somente pela redução do percentual de ligação plasmática. Além disso, outras condições patológicas interferem na eliminação dos fármacos (por exemplo, as disfunções tireoideanas) e podem ocorrer concomitantemente.

1.6.4 Indução enzimática

Desde 1956, com os estudos de CONNEY e cols., e REMMER e cols. (16,107) , acumulam-se observações sobre fármacos capazes de estimular a produção das enzimas conhecidas com citocromo P450, tanto no fígado quanto em outros órgãos.

Um dos exemplos marcantes é, justamente, o da carbamazepina, cuja ampla variação da vida média comparando-se ingestão de dose única e doses múltiplas deve-se à indução enzimática. Esse estímulo afeta em especial as mono-oxigenases e os aspectos principais são: 1. Demonstra-se a indução enzimática apenas "in vivo"; a mesma requer síntese proteica "de novo"; e decorre certo tempo entre o efeito e a exposição ao indutor. A indução difere portanto do aumento instantâneo de velocidade de reação causada por alguns

produtos como o metirapone (este ocorre também "in vitro", não requer síntese de novas enzimas) . 2. Indutores particulares induzem formas particulares do citocromo P450, e, assim, podem ter efeitos muito diferentes no metabolismo de substratos específicos. 3. Morfologicamente, as induções enzimáticas associam-se com uma proliferação do retículo endoplasmático liso e, em algumas espécies, hipertrofia hepática.

O conjunto de enzimas induzidas pelo fenobarbital é codificado por genes do cromossomo 19 humano (96) , e ao menos algumas delas relacionam-se com os efeitos da interação medicamentosa deste com a carbamazepina (diminui o nível plasmático desta, sem afetar a resposta terapêutica) e com a fenitoína (efeito imprevisível) (33) . O fenobarbital parece ser isento de efeitos estimulantes sobre as mono-oxigenases placentárias. Ainda que o estímulo do fenobarbital sobre as enzimas microssomais seja conhecido há três décadas , o mecanismo responsável pelo mesmo não está totalmente elucidado. Sabe-se que o fenobarbital induz um RNA de 2 kilobases e que o mecanismo não requer um receptor específico.

1.6.4.1. Indução por tabagismo

No ser humano, o tabagismo induz a oxidação de alguns fármacos, tais como o diazepam, desmetildiazepam, fenacetina, antipirina, teofilina, propranolol, mas não afeta outros com a meperidina, nortriptilina, etanol, fenitoína, fenobarbital e carbamazepina. (6,57,83) .

1.6.4.2. Indução de enzimas de conjugação

Similarmente ao citocromo P450, algumas das enzimas de conjugação estão sujeitas à indução. O fenobarbital induz as transferases reduzidas do glutation, cuja significância biológica prende-se ao seu papel na eliminação dos metabólitos das reações de fase I, tais como os epóxidos. Induz ainda o aumento da UDP-GT bilirrubina, efeito responsável pelo decréscimo da bilirrubina não conjugada sérica em pacientes sob uso de anticonvulsivantes indutores enzimáticos (116) .

1.6.5 Inibição enzimática

As enzimas metabolizadoras podem ser inibidas por vários mecanismos. O mais comum é a competição com outros substratos (87) . Como os indutores, os inibidores usualmente interferem apenas com um número limitado de isozimas e assim são usados como discriminadores entre diferentes formas enzimáticas. A maioria dos exemplos de interações que resultam em inibições envolve fármacos que exibem cinética de saturação em doses terapêuticas , como a fenitoína.

A lista dos fármacos descritos como inibidores do metabolismo da fenitoína é expressiva e inclui: dicumarol, disulfiram, metosuximida, imipramina, clorpromazina, metilfenidato, clorfenamina, propoxifene, fenilbutazona, cloranfenicol, isoniazida, trimetropim, várias sulfonamidas, ácido valproico, cimetidina etc.

Devido à natureza saturável do metabolismo da fenitoína, mesmo um grau moderado de inibição enzimática pode resultar numa acentuada elevação na concentração da fenitoína sérica, e torna-se provável uma intoxicação.

Usualmente, após a adição dos agentes interferentes a fenitoína sérica eleva-se rapidamente, mas há exceções. No caso do sultiame, um período de 10 a 20 dias transcorre antes da interação manifestar-se, sugerindo que uma inibição não competitiva possa estar ocorrendo.

Outros fármacos antiepilépticos também estão sujeitos à inibição. Os exemplos importantes incluem a inibição do metabolismo do fenobarbital pelo ácido valpróico e a da carbamazepina pelo propoxifeno (22). Há também interações envolvendo inibição de enzimas não oxidativas. Um exemplo importante é a inibição da epóxide hidrolase pela valpromida, a amida derivada do ácido valpróico (98). Se a valpromida for adicionada ao regime terapêutico dos pacientes estabilizados na terapia com carbamazepina, a inibição resultante da epóxide hidrolase conduz a uma menor metabolização do epoxi-10,11-carbamazepina, que acumula-se e produz toxicidade. Também o ácido valpróico leva ao aumento do nível de epoxi-10,11-carbamazepina, mas menos acentuadamente (97).

Outro grupo de enzimas importantes na inativação e detoxicação é o das enzimas de conjugação. A inibição das GHS-transferases, das UDP-glucuronil transferases e das sulfotransferases reforçam a suscetibilidade aos efeitos tóxicos dos intermediários de compostos tais como o benzopirene (11).

1.6.6. Indução e inibição enzimáticas conjugadas

Os fenômenos de indução e inibição podem ocorrer simultaneamente. A capacidade de um dado composto de agir como indutor e inibidor simultaneamente explica a natureza aparentemente contraditória de algumas interações medicamentosas. O fenobarbital, p.ex., pode diminuir ou aumentar a concentração sérica da fenitoína dependendo de a estimulação ou inibição do metabolismo da fenitoína prevalecer num dado paciente. No caso do etanol, a inibição é usualmente observada após uma ingestão aguda, enquanto que a indução prevalece no alcólatra crônico.

1.6.7. Ligação protéica plasmática e fluxo sanguíneo

A taxa de biotransformação "in vivo" é determinada pela atividade enzimática e também pela taxa de liberação dos compostos para o sítio de metabolismo. Daí a importância do percentual de ligação plasmática e do fluxo sanguíneo para o órgão metabolizador.

No caso da fenitoína e da carbamazepina, apenas as moléculas livres podem ser metabolizadas e um aumento da ligação protéica restringe a quantidade disponível para a metabolização.

1.6.8. Fatores Genéticos

Como mencionamos na introdução, à medida em que se acumulam os estudos em torno das variações inter-étnicas no metabolismo dos fármacos, as evidências de que tais variações podem ser genéticas grandes é cada vez maior.

VESELL (128) publicou um heredograma que incluiu metabolizadores lentos de fenitoína, já renunciado por HOPPER (51) que apresenta dados de 97 adultos ingerindo fenitoína e em estado de equilíbrio em relação ao fármaco. Esse estudo mostrou uma variação no nível plasmático da ordem de 50 vezes. Embora em seus dados estejam presentes outras fontes de variação metabólica, além da genética, os mesmos deixam claro que é grande o número de metabolizadores lentos. KUTT e cols. (66), por sua vez descreveram um defeito geneticamente transmitido na capacidade de parahidroxilar a fenitoína.

O fenótipo "metabolização lenta" da fenitoína pode ser considerado um polimorfismo, já que a frequência de indivíduos nessa categoria tem sido estimada em 1/500, o que corresponde a uma frequência gênica de 4,47% (54,126).

De modo geral, percebe-se que quando a herança é monogênica, há maior facilidade de detecção e estudo analítico (distribuição bimodal se houver dominância e trimodal se houver codominância) do que quando a herança é poligênica e a variação é gradual (distribuição unimodal).

Os estudos familiares sugerem que o mecanismo de herança envolvido é mais frequentemente poligênico (128). Em muitos casos, o modelo que melhor explica certos padrões de herdabilidade é um sistema "misto" poligênico-monogênico, onde um gene principal tem sua ação modulada por outros genes. Um exemplo de aplicação deste modelo é o complexo padrão de herança da esquizofrenia.

Para ilustrar as nuances do equilíbrio que um organismo precisa alcançar, citamos a 5-hidroxitriptamina, a dopamina e a noradrenalina. Se aumentadas as suas concentrações plasmáticas, aumenta o limiar de desencadeamento das convulsões. Ao aumentar a concentração cerebral de 5-HT, p. ex. administrando seu precursor, o 5-hidroxitriptofano, a ação dos anticonvulsivantes torna-se potencializada (37). Por outro lado, o aumento das concentrações de 5-HT está correlacionado com a esquizofrenia e já foi determinado em pacientes crônicos (24).

Uma das linhas de pesquisa que investigam as bases genéticas que predispõe um indivíduo para a esquizofrenia aborda a diferença individual para a metabolização do triptofano, o precursor alimentar do 5-HT. Fica portanto claro como são interligados os mecanismos de gênese de enfermidades aparentemente tão diferentes, e o complexo balanceamento necessário para regê-los. Quanto à epileptogênese, p. ex., já foram associados mais de 100 caracteres mendelianos ao risco aumentado de convulsões (37). Além disso, desordens convulsivas aparentemente idênticas podem ocorrer tanto em presença quanto na ausência de um suposto defeito metabólico herdado. Quanto à ação dos anticonvulsivantes, tanto Gillies e cols. quanto Porter (37,100) enfatizam que nem todos os pacientes requerem o nível plasmático usualmente aceito como "faixa

terapêutica" para o controle de suas crises, o que provavelmente representa outra forma de variabilidade genética, desta vez a nível de receptores ou de ligação protéica.

Outro exemplo dessas interligações refere-se à isoniazida (tuberculostático de emprego corrente) : o mecanismo de ação principal dos anticonvulsivantes relaciona-se com o aumento de eficiência do complexo receptor GABA, conforme anteriormente comentado. A isoniazida diminui o nível de GABA circulante, o que não influi muito em indivíduos normais. Mas os acetiladores lentos da isoniazida (herança monogênica) sob uso do fármaco tomam-se mais propensos às crises epileptogênicas. (37)

Objetivos

2. Objetivos

Tendo os anticonvulsivantes faixa terapêutica estreita, torna-se importante de sua monitorização terapêutica e controle das variáveis que influem nos níveis plasmáticos destes fármacos. Por isso, nossos objetivos foram:

2.1. Estabelecimento e padronização de um método preciso e prático para mensuração plasmática dos anticonvulsivantes mais utilizados no HC.

2.2. Avaliação do nível plasmático dos anticonvulsivantes carbamazepina e fenitoína nos usuários do fármaco atendidos no Ambulatório de Epilepsia do Departamento de Neurologia- HC-UNICAMP

2.3. Avaliação da influência genética sobre a biodisponibilidade da carbamazepina e da fenitoína numa população de pacientes epiléticos em tratamento.

Casuística, Material e Método

3. Casuística, Material e Método

3.1. Pacientes

Os pacientes estudados foram atendidos em sua maioria no ambulatório de epilepsia supervisionado pelo Departamento de Neurologia da F.C.M. da UNICAMP. Algumas amostras foram encaminhadas de outros centros de atendimento (por ex., São João da Boa Vista) .

Para a abordagem inicial, cujo objetivo era uma visão global dos níveis séricos dos fármacos antiepiléticos, todas as amostras dosadas foram consideradas. A seguir, agrupamos os pacientes em usuários sob monoterapia de CBZ, DPH e FB e usuários sob politerapia.

Cada paciente ficou representado por apenas uma amostra (mantivemos aquela cuja ficha foi preenchida de forma mais completa) , excluindo as demais. A seguir, aplicamos os critérios de exclusão e inclusão descritos abaixo. No programa estatístico utilizado (microstat) , foram sendo excluídas das análises específicas os pacientes cujas fichas não continham determinados dados. Submetemos ao microstat somente os usuários sob monoterapia de DPH e CBZ em condições de estado de equilíbrio em relação ao fármaco. O programa utilizado permitiu-nos realizar, por regressão linear (fenitoína) e múltipla (carbamazepina) , o ajustamento das doses à média dos pesos dos pacientes.

Os pacientes com mais de uma dosagem em diferentes consultas ao longo do tempo foram agrupados para uma análise da variação dos seus níveis plasmáticos, a qual foi incluída no apêndice.

O número total de amostras dosadas foi 925, assim distribuídas: em 44 amostras (4,8%) não encontramos quantidades mensuráveis de nenhum dos três anticonvulsivantes; 192 amostras dosadas eram de pacientes sob politerapia (20,8%) e 733 amostras eram de pacientes sob monoterapia (79,2%) . Das amostras de pacientes sob monoterapia, 421 eram amostras de usuários de CBZ (57,4%) , 216 eram amostras de usuários de DPH e 96 de FB (13,1%) .

Das amostras de pacientes sob politerapia submetidos à análise, 50 eram de CBZ + DPH (25,5%) , 47 eram de CBZ + FB (24%) e 35 de DPH + FB (18,2%) . As demais amostras (32,3%) eram de associações de um dos três anticonvulsivantes medidos com outro não medido (p.ex.: ác. valproico, benzodiazepínico) ou com outro medicamento qualquer.

3.1.1. Critérios de inclusão dos pacientes na amostra

Somente foram incluídos pacientes maiores de 6 anos porque aqueles com idade menor que essa apresentam diferenças significativas na velocidade de metabolização (96) .

Outra exigência foi a de que a relação peso-altura não tivesse desvio da média superior a 15%.

3.1.2. Critérios de exclusão

Foram excluídos os pacientes sob politerapia, com enfermidades hepáticas ou que pudessem intervir no metabolismo do fármaco focado, e as mulheres grávidas. Também foram excluídos pacientes alcoólatras (consumo de mais de 4 unidades de álcool por dia, sendo uma unidade de álcool=1/2 garrafa de cerveja ou um copo de vinho= aproximadamente 30 ml de álcool etílico) e aqueles com nível plasmático muito próximo de zero ou indicando claramente a não aderência ao tratamento.

3.2. Descrição dos usuários de Fenitoína

A amostra compôs-se de 83 homens e 63 mulheres, cujas idades variaram entre 9 e 86 anos, com média de 32,3 e desvio padrão de 13,4 anos (n=128) , e pesos entre 26 e 96 Kg, com média de 61,7 Kg e desvio padrão de 13,2 Kg (n=105) .

A dose diária total oscilou entre 100 e 550 mg, com média de 323,2 mg e desvio padrão de 86,1 mg (n=146) , o que proporcionou valores de níveis plasmáticos entre 1,1 µg/ml e 71 µg/ml, com média de 17,6 µg/ml e desvio padrão de 15,1 µg/ml (n=146) .

Levando em conta o tempo médio para o medicamento atingir o estado de equilíbrio, consideramos como pacientes com crises controladas aqueles com mais do que seis semanas sem episódios convulsivos. Dentro desse critério, 66 pacientes declararam estarem as crises sob controle e 75 declararam ainda apresentar crises, com intervalos entre as mesmas variável.

O intervalo entre a ingestão do medicamento e a coleta da amostra para dosagem variou entre 30 minutos e 25 horas, com média de 6,8 horas e desvio padrão de 5,3 horas (n=89).

3.3. Descrição dos usuários de Carbamazepina

A amostra compôs-se de 123 homens e 194 mulheres (n=317), com idades entre 6 e 74 anos, média de 29,4 anos e desvio padrão de 12,3 anos (n=276). Seus pesos variaram entre 25,5 e 113 Kg, com média de 61,7 Kg e desvio padrão de 15,1 Kg.

As doses diárias totais variaram de 100 a 2000 mg, com média de 954,1 mg e desvio padrão de 398,7 mg (n=300), as quais produziram níveis plasmáticos entre 1,1 e 21 µg/ml, com média de 9,3 µg/ml e desvio padrão de 3,9 µg/ml.

Dos pacientes estudados, 124 declararam terem as crises sob controle e 184 declararam terem tido crises há menos do que seis semanas (crises não controladas) (n=308)

O intervalo médio entre a ingestão da última dose e a coleta das amostras apresentou o valor de 6,6 horas, com desvio padrão de 5,0 horas, mínimo de 30 minutos e máximo de 23 horas (n=202).

3.4. Dosagem de anticonvulsivantes através de HPLC

Todo método cromatográfico requer uma adequação *in situ* quanto a particularidades tais como composição da fase móvel, escolha da coluna, extração da amostra, escolha do comprimento de onda para leitura etc. Em nosso caso, tal assertiva foi ainda mais verdadeira, pois optamos por um método que fosse adequado para medir simultaneamente a carbamazepina, a fenitoína e o fenobarbital. O comprimento de onda escolhido, p. ex., foi um compromisso entre os comprimentos de onda ideais para cada anticonvulsivante caso fossem analisados em separado. Os outros detalhes também foram equacionados dessa forma.

A composição da fase móvel baseou-se em trabalho de Kabra e cols. (58), e o método de extração foi-nos transmitido por Nello Leone, do Hospital Regina Margherita, de Turim, Italia em comunicação pessoal.

3.3 Coleta

A coleta de sangue foi realizada nos horários normais do ambulatório de epilepsia (período da tarde), tendo em vista as facilidades tanto para os pacientes quanto para o serviço de atendimento.

O sangue foi coletado em tubos tipo *vacutainer* contendo EDTA a 15% (0.05ml; 0.34 mol).

As amostras foram levadas ao laboratório à temperatura ambiente e centrifugadas a 1700 gravidades durante 5 minutos, sendo o plasma congelado a -20°C até o momento da análise.

3.4 Extração

Após o descongelamento, adicionou-se em um tubo de vidro de aproximadamente 3 ml, 150 μl de plasma (dos valores da curva padrão, dos valores I,II e III do controle de qualidade externo e dos pacientes), 50 μl de MPPH e 600 μl de acetonitrila. Misturou-se em *vortex* durante 60 segundos. A seguir, adicionou-se 200 μl de solução saturada de NaCl/KH₂PO₄ 4/1. Submeteu-se novamente ao *vortex*, por 60 segundos, e em seguida centrifugou-se a 1700 gravidades, por 5 minutos. Transferiu-se 300 μl de sobrenadante para outro tubo de vidro e secou-se sob fluxo de nitrogênio a aproximadamente 37°C . No momento da injeção, ressuspendeu-se em 100 μl da fase móvel e a seguir injetou-se na válvula de amostragem (*loop*) de volume fixo igual a 20 μl .

3.5 Condições Cromatográficas

Fase móvel:

KH₂PO₄ 0.005M, pH4.5/ METANOL/ ACETONITRILA: 55/20/25

(Após o preparo, submetida ao ultrassom por 10 min. para degaseificação)

Fluxo: 1.5 ml/minuto

Comprimento de onda para leitura (detector U.V marca Dupont, modelo 8800, de onda variável) :215 nm

Sensibilidade: 0.100 - 0.200 AUF

Coluna: Michrosorb (sílica) C18, tamanho médio das partículas: 10 micras, fase reversa, 25 cm x 1.8 mm

Précoluna: mesmo material, 40 x 4 mm

Sistema: Isocrático (uma só fase móvel, em oposição ao sistema de gradiente, onde mais de uma composição de fase móvel é utilizada alternadamente para separação dos componentes da mistura)

Bomba: Waters, modelo: M45

Registrador gráfico: Bryans Southern, modelo 28000, tipo potenciométrico, regulado em 10mV, em 5mm/min

A sensibilidade obtida por este método foi de Pb:2.5 $\mu\text{g/ml}$; dph:1.0 $\mu\text{g/ml}$; cbz:1.0 $\mu\text{g/ml}$

Tempos de retenção: Pb: 5 min; dph: 8min; cbz: 9.8 min.

(Para cada "corrida" de amostras para leitura era construída uma nova curva padrão com todos os valores da mesma e com os valores do controle de qualidade externo)

Laboratório produtor do controle de qualidade externo:

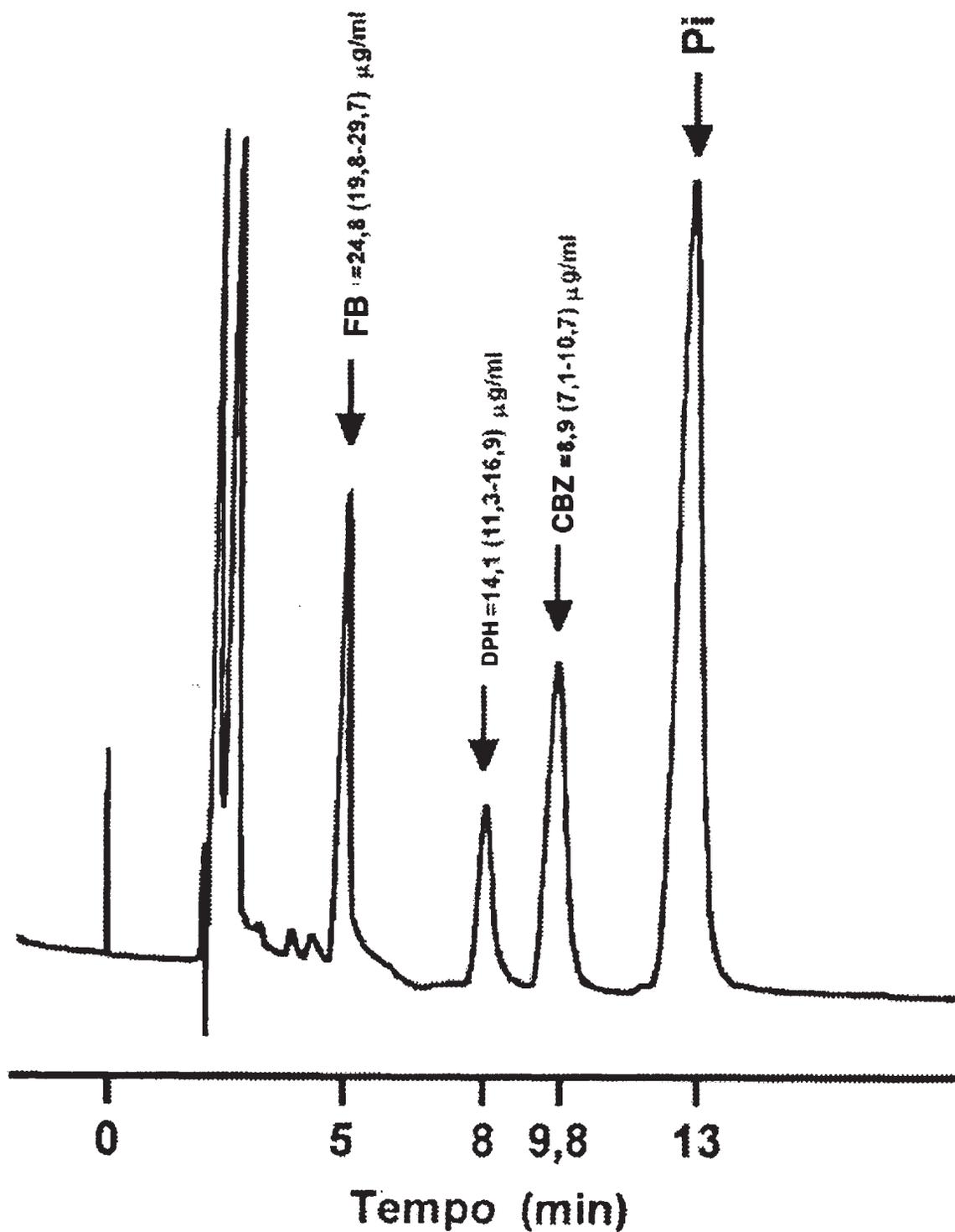
Biorad- ECS DIVISION- 3700 East Miraloma Avenue Anaheim, California 92806

O cálculo dos valores em $\mu\text{g/ml}$ a partir das alturas dos picos nos cromatogramas está descrito no apêndice

O cromatograma obtido sob as condições acima é mostrado na fig.3.

Figura 3

Cromatograma do Femobarbital, Fenitoína, Carbamazepina e Padrão Interno através de HPLC



RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Introdução

A apresentação dos resultados divide-se em dois ítems principais: o primeiro corresponde aos pacientes sob monoterapia de fenitoína e o segundo aos pacientes sob monoterapia de carbamazepina.

Antes de iniciarmos a análise estatística das duas amostras principais, agrupamos os dados de todas as amostras medidas, mesmo as excluídas da análise principal, segundo a FT, com o intuito de obter uma visão geral. Dividimos os grupos de pacientes com níveis plasmáticos fora da FT, em subgrupos com desvios maiores e menores do que 30% dos níveis considerados como terapêuticos. Esta opção representa um esforço para quantificar melhor a importância dos desvios registrados, uma vez que níveis plasmáticos próximos à FT têm um significado clínico diferente dos níveis distantes da FT.

Carbamazepina

287 pacientes com nível plasmático na FT (68,1%)

41 pacientes com nível abaixo da FT

15: desvio maior do que 30% (3,6%)

12: desvio menor do que 30% (2,9%)

14: sem nível mensurável (3,3%)

93 pacientes com nível acima da FT:

25: desvio maior do que 30% (5,9%)

68: desvio menor do que 30% (16,2%)

Fenitoína

67 pacientes com nível plasmático na FT (28,4%)

85 com nível abaixo da FT:

54: desvio maior do que 30% (22,9%)

10: desvio menor do que 30% (12,7%)

21: sem nível mensurável (8,9%)

64 pacientes com nível acima da FT:

45 com desvio maior do que 30% (19,1%)

19 com desvio menor do que 30% (8,1%)

(Obs: Os perfis das amostras de usuários de fenobarbital e dos pacientes sob politerapia estão apresentados no apêndice.)

4.2. FENITOÍNA

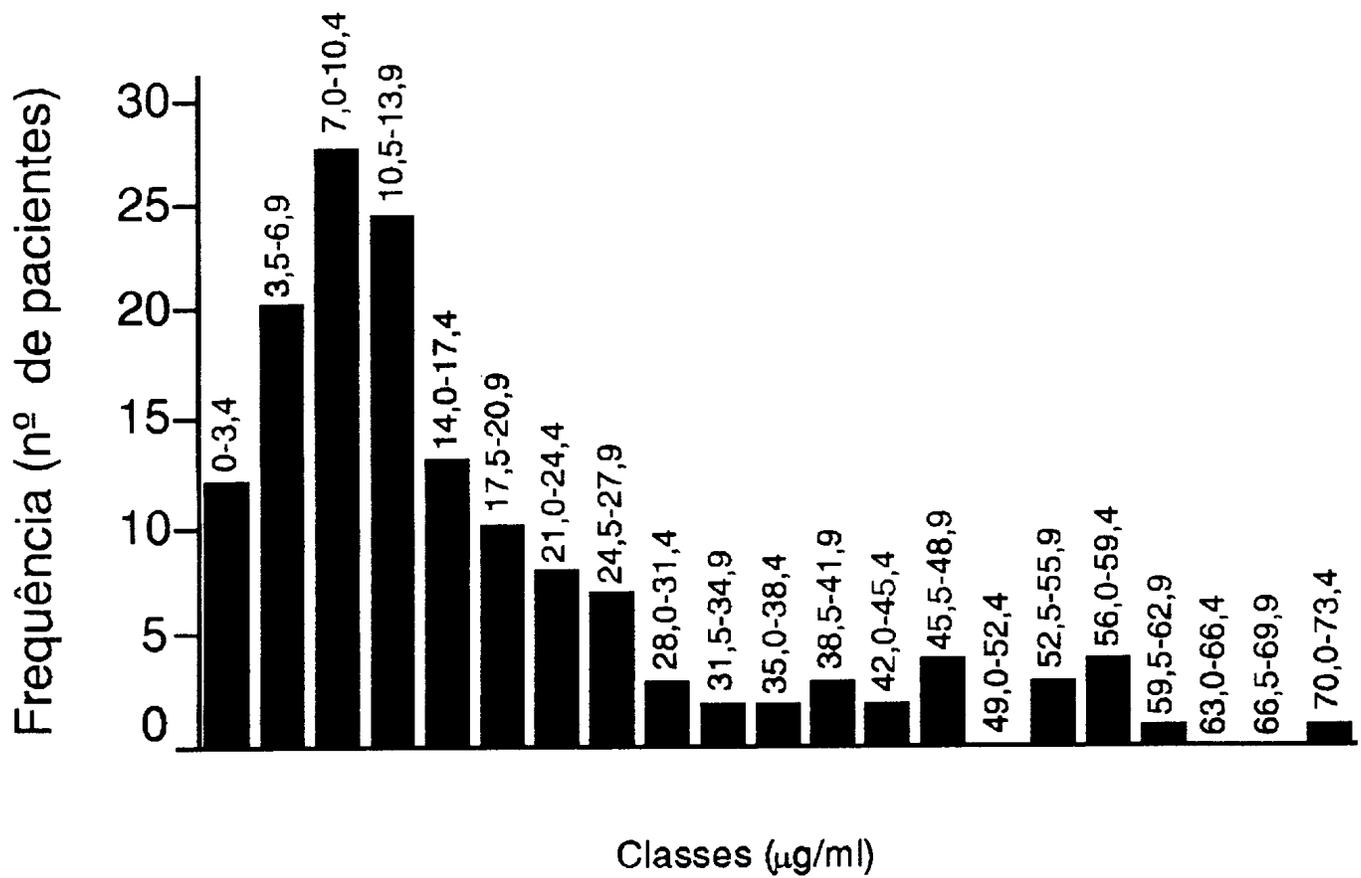
O intervalo entre a ingestão do medicamento e a coleta para dosagem variou entre 30 minutos e 25 horas, com média de 6,8 horas e desvio padrão de 5,3 horas, e não apresentou correlação significativa com o nível plasmático, conforme a tabela nº 1. (n=89)

O número de pacientes analisados foi de 146, e para a análise de correlações foram estudados somente os pacientes cujas fichas foram totalmente preenchidas, perfazendo um total de 62 pacientes. (considerando também os critérios de inclusão e exclusão listados em "materiais e métodos")

A figura nº 4 mostra a distribuição da fenitoína nos 146 pacientes estudados.

Figura 4

**Distribuição dos Níveis Plasmáticos de Fenitoína
(Não Corrigidos para Dose/Kg/Dia)**



B. Distribuição dos níveis plasmáticos

classe	frequência	%
0 - 3,4 µg/ml	12	8,22
3,5 - 6,9	20	13,70
7,0 -10,4	27	18,49
10,5-13,9	24	16,44
14,0-17,4	13	8,90
17,5-20,9	10	6,85
21,0-24,4	8	5,48
24,5-27,9	7	4,79
28,0-31,4	3	2,05
31,5-34,9	2	1,37
35,0-38,4	2	1,37
38,5-41,9	3	2,05
42,0-45,4	2	1,37
45,5-48,9	4	2,74
49,0-52,4	0	0
52,5-55,9	3	2,05
56,0-59,4	4	2,74
59,5-62,9	1	0,68
63,0-66,4	0	0
66,5-69,9	0	0
70,0-73,4	1	0,68
TOTAL	146	100%

A tabela nº 1 apresenta os coeficientes de correlação das variáveis estudadas nos 62 pacientes que apresentaram informações completas.

Tabela n° 1: Matriz de correlação simples entre as variáveis estudadas. (n=62, rc = 0,25) .

	idade	peso	sexo	dos/d	nível pl.	conc.	conf.	iudc
idade	1,0							
peso	0,24	1,0						
sexo	-0,18	0,24	1,0					
dos/d	0,09	-0,01	-0,01	1,0				
nv.pl	0,19	-0,05	-0,09	0,38	1,0			
cntr.	-0,05	-0,12	-0,27	0,38	0,25	1,0		
conf.	0,13	-0,13	0,10	0,11	0,31	-0,05	1,0	
iudc	0,30	-0,13	-0,30	-0,07	0,10	0,13	0,09	1,0
ds/kg	-0,09	-0,59	-0,19	0,79	0,33	0,41	0,15	0,03

Obs:

dos/d = dose por dia
 nv.p1 = nível plasmático
 cntr = controle das crises
 conf = confiabilidade
 iudc = intervalo entre última dose e coleta da amostra
 ds/kg = dose por kilograma

Essa tabela confirma a correlação mais importante entre o nível plasmático e a dose diária por kg de peso. Fez-se então necessário estabelecer a equação de ajuste dos níveis plasmáticos, para a média dessa última variável.

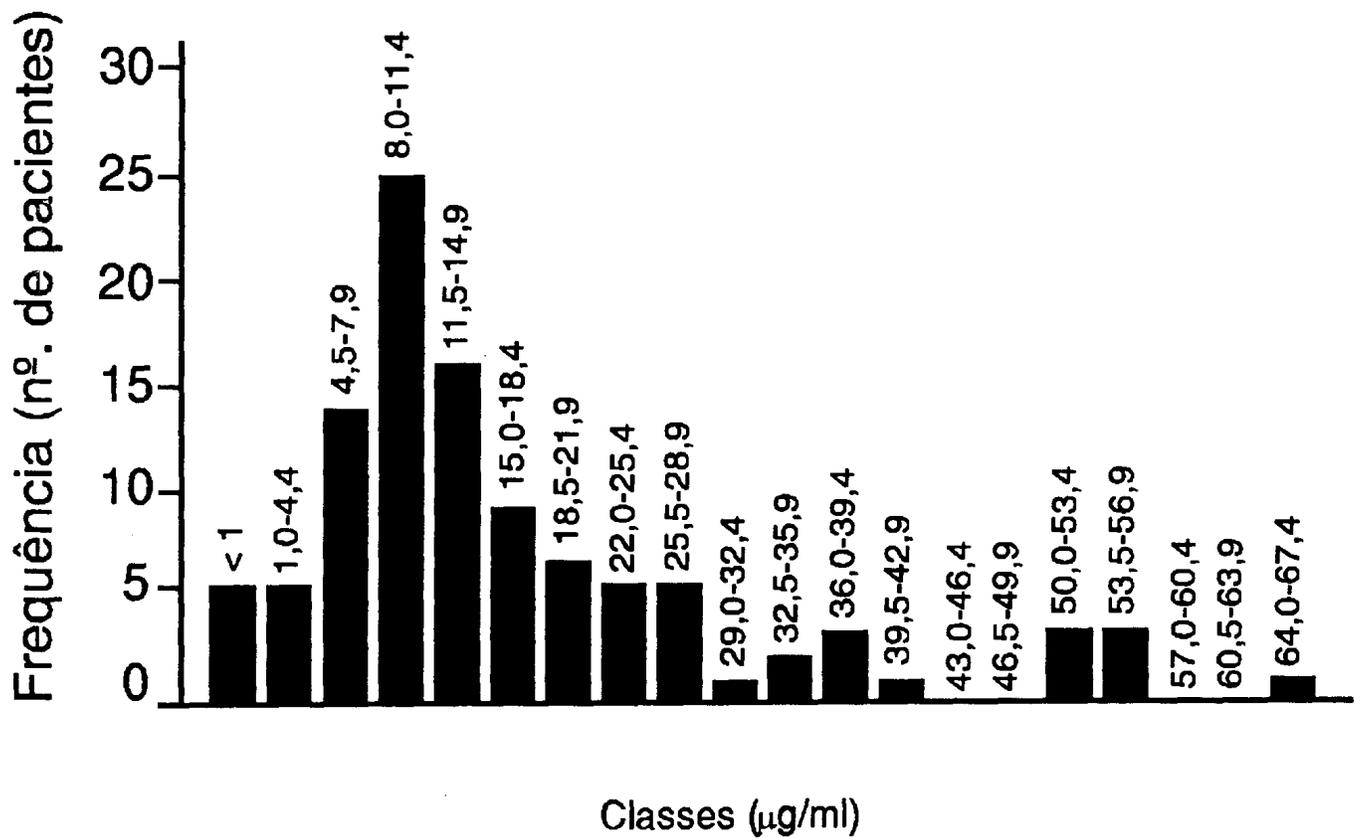
O ajustamento foi obtido por intermédio de:

$$Y(a) = Y + 2,3991 (X_m - X),$$

onde Y (a) é o nível ajustado, Y é o nível medido, X_m é a média das doses por kg e X é a dose por kg do paciente estudado.

Com base nos dados ajustados, a distribuição das concentrações plasmáticas da fenitoína passa a apresentar a forma mostrada na figura n° 5 (n=104) :

Figura 5
Distribuição dos Níveis Plasmáticos de Fenitoína
(Corrigidos para Dose/Kg/Dia)



classe	frequência	%
< 1 µg/ml	5	4,81
1,0 - 4,4	5	4,81
4,5 - 7,9	14	13,46
8,0 -11,4	25	24,04
11,5-14,9	16	15,38
15,0-18,4	9	8,65
18,5-21,9	6	5,77
22,0-25,4	5	4,81
25,5-28,9	5	4,81
29,0-32,4	1	0,96
32,5-35,9	2	1,92
36,0-39,4	3	2,88
39,5-42,9	1	0,96
43,0-46,4	0	00
46,5-49,9	0	00
50,0-53,4	3	2,88
53,5-56,9	3	2,88
57,0-60,4	0	00
60,5-63,9	0	00
64,0-67,4	1	0,96
TOTAL	104	100%

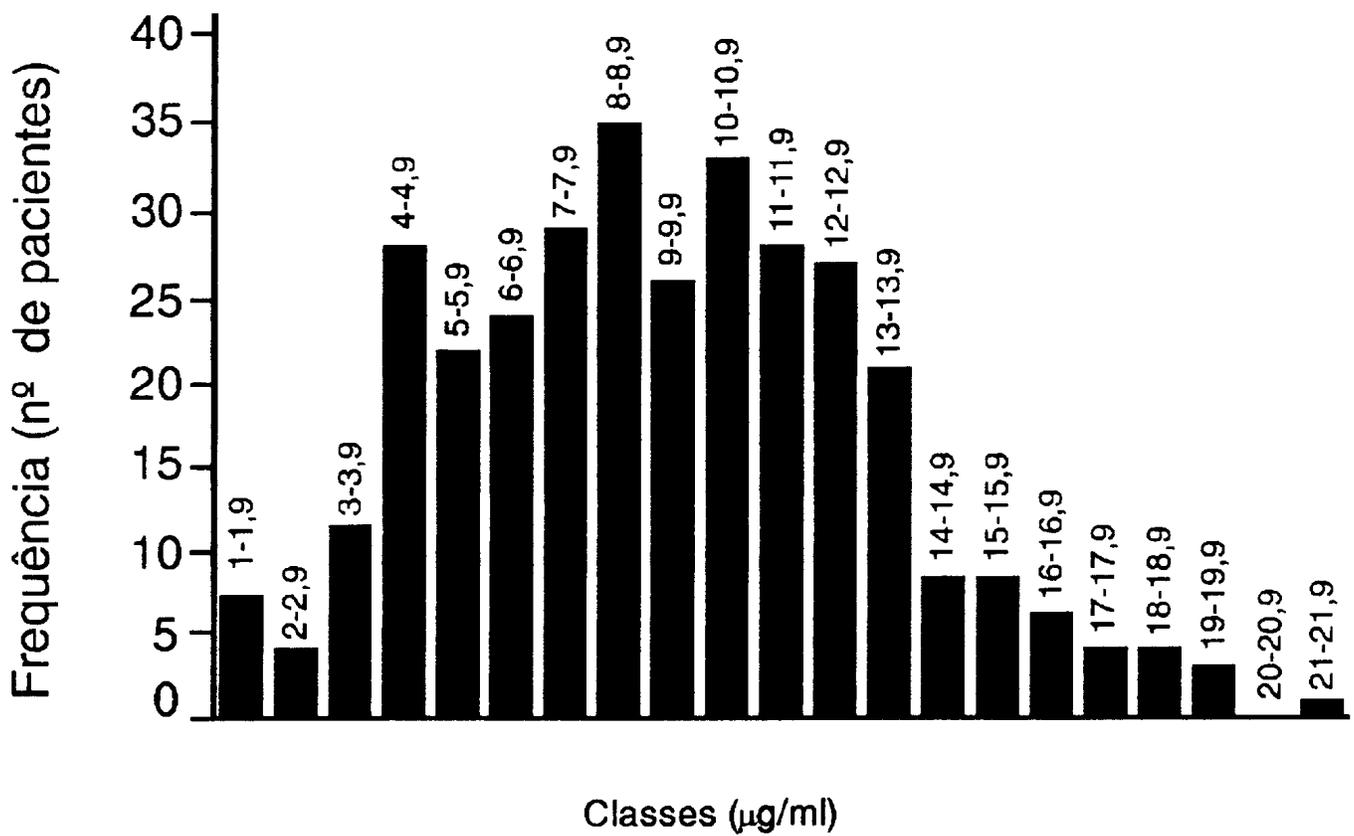
2. CARBAMAZEPINA

O intervalo médio entre a ingestão da última dose e a coleta das amostras apresentou o valor de 6,6 hs, com desvio padrão de 5.0 hs, mínimo de 30 minutos e máximo de 23 hs. Submetidos os dados à análise de correlações, o intervalo apresentou-se como significativo. (n=202)

A figura nº6 representa a distribuição de carbamazepina nos 317 pacientes estudados.

Figura 6

**Distribuição dos Níveis Plasmáticos de Carbamazepina
(Não Corrigidos para Dose/Kg/Dia)**



B. Distribuição dos Níveis Plasmáticos

classes	freq.	%
1-1,9 µg/ml	7	2,19
2-2,9	4	1,25
3-3,9	11	3,45
4-4,9	27	8,46
5-5,9	21	6,58
6-6,9	23	7,21
7-7,9	28	8,78
8-8,9	34	10,66
9-9,9	25	7,84
10-10,9	32	10,03
11-11,9	27	8,46
12-12,9	26	8,15
13-13,9	20	6,27
14-14,9	8	2,51
15-15,9	8	2,51
16-16,9	6	1,88
17-17,9	4	1,25
18-18,9	4	1,25
19-19,9	3	0,94
20-20,9	0	0
21-21,9	1	0,31
TOTAL	319	100%

A tabela nº2 apresenta os coeficientes de correlação das variáveis estudadas nos 133 pacientes cujas fichas continham todas as informações necessárias.

Tabela nº2: matriz de correlação simples entre as variáveis estudadas (n=133, rc = 0,17)

	idade	peso	sexo	dos/d	nível pl.	conc.	conf.	iudc
idade	1,0							
peso	0,45	1,0						
sexo	0,09	0,34	1,0					
dos/d	0,22	0,34	0,24	1,0				
nv.pl	0,15	0,25	0,11	0,62	1,0			
cntr.	0,07	0,03	0,09	0,45	0,33	1,0		
conf.	0,17	0,10	-0,05	0,05	-0,03	0,18	1,0	
iudc	-0,05	-0,04	-0,10	-0,31	-0,48	-0,27	0,01	1,0
ds/kg	-0,06	-0,25	0,03	0,80	0,45	0,43	-0,02	-0,27

D. Distribuição de níveis plasmáticos ajustados

Segundo a análise de correlações, o intervalo entre ingestão da última dose e a coleta da amostra apresentou-se significativo (n=202).

Estabelecida a correlação entre o nível plasmático e a dose diária por kg, e entre o nível plasmático e o intervalo entre coleta da amostra e última dose de CBZ ingerida, procuramos a equação de ajuste dos níveis plasmáticos, como se todos os pacientes houvessem ingerido a mesma dose diária, com um mesmo intervalo entre coleta e ingestão da última dose. Isso foi feito a partir de:

$$Y(a) = Y + 0,2292 (15,1156 - X) - 0,2587 (6,6632 - iudc)$$

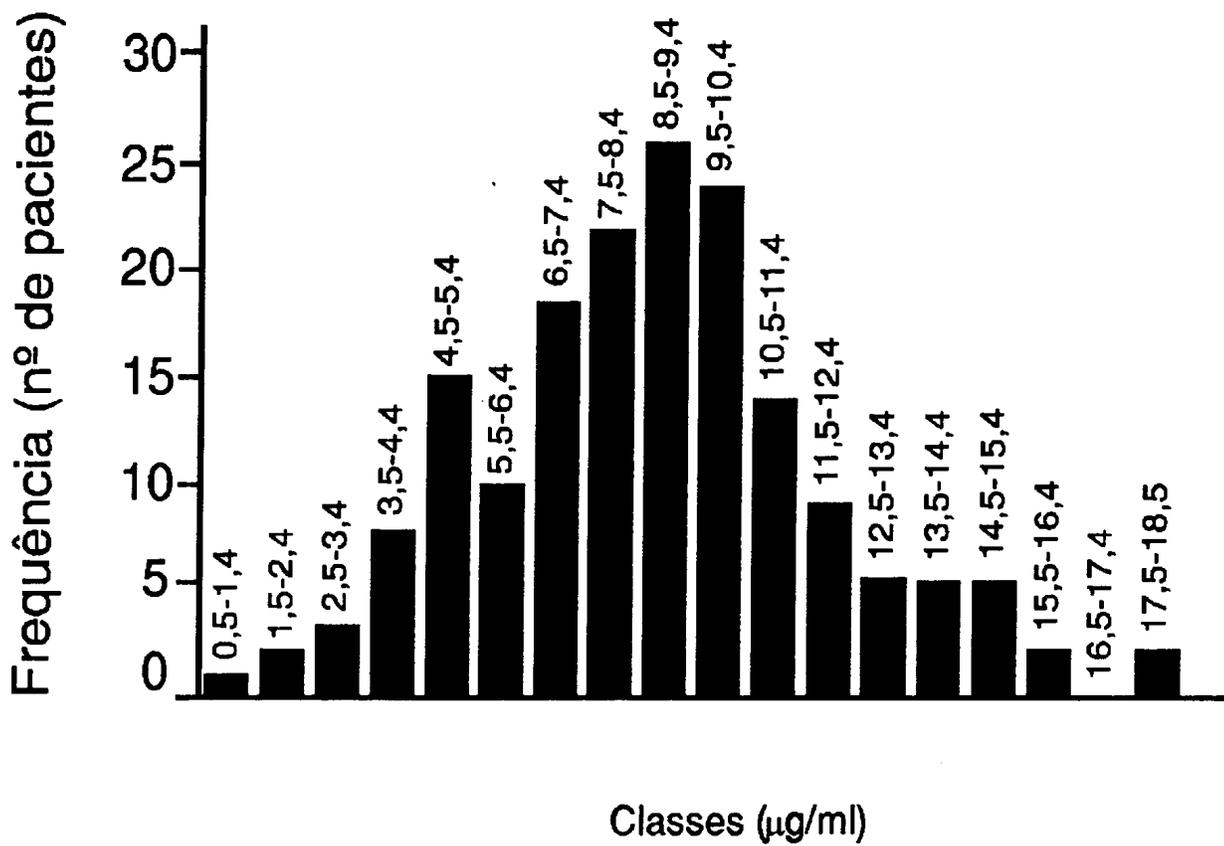
Onde Y (a) é o valor ajustado, Y é o valor medido, x é a dose/kg do paciente e iudc é o intervalo entre última dose ingerida e coleta da amostra

Definidos os níveis plasmáticos ajustados, obtivemos a distribuição da fig. 7 (n=170) :

classe	freq.	%
0,5-1,4	1	0,59
1,5-2,4	2	1,18
2,5-3,4	3	1,76
3,5-4,4	7	4,12
4,5-5,4	15	8,82
5,5-6,4	10	5,88
6,5-7,4	18	10,59
7,5-8,4	22	12,94
8,5-9,4	26	15,29
9,5-10,4	24	14,12
10,5-11,4	14	8,24
11,5-12,4	9	5,29
12,5-13,4	5	2,94
13,5-14,4	5	2,94
14,5-15,4	5	2,94
15,5-16,4	2	1,18
16,5-17,4	0	0
17,5-18,5	2	1,18
TOTAL	170	100%

Figura 7

**Distribuição dos Níveis Plasmáticos de Carbamazepina
(Corrigidos para Dose/Kg/Dia)**



DISCUSSÃO

5.DISSCUSSÃO

5.1.1. Fenitoína

Os resultados das dosagens dos pacientes usuários de fenitoína, sob regime de monoterapia, apresentam uma alta proporção de valores fora da faixa terapêutica usualmente aceita.

Ao compararmos, por exemplo, os percentuais de pacientes cujos níveis plasmáticos encontram-se dentro da faixa terapêutica da DPH e da CBZ, constatamos que o percentual de valores dentro da FT da fenitoína corresponde a aproximadamente metade do valor percentual da carbamazepina. Este dado indica que, de modo geral, há uma dificuldade maior para obter, com a fenitoína, os níveis definidos como terapêuticos, isto é entre 10 e 20 µg/ml.

Esse fato pode ser explicado, em parte, pela farmacocinética peculiar da fenitoína, a qual constitui, como vimos no capítulo introdutório, um dos melhores exemplos de cinética de saturação enzimática.

Outra fonte de desvios da FT pode ser originada pela variabilidade fenotípica da sua metabolização, conforme também já documentamos no capítulo introdutório. A distribuição dos níveis dos pacientes aqui estudados é sugestiva da importância dessa variabilidade (fig. 5) .

De fato, ao ajustarmos os níveis plasmáticos da fenitoína à dose ingerida (como se todos os usuários tivessem ingerido a mesma dose por kg de peso), constatamos que 58,7% apresentariam níveis entre 8 e 25,5µg/ml. Dos demais, 23,1% apresentam níveis abaixo de 8 ug/ml e 18,2% acima de 25,5µg/ml.

Realizando o mesmo cálculo com a CBZ, encontramos 88,2% de dosagens entre 3,5 e 13,5%, sendo a FT de 4-12 µg/ml.

Quanto ao grupo de usuários de DPH com níveis plasmáticos acima da FT, 7 (6,73%) dos mesmos formam um subgrupo com níveis bem acima, configurando uma distribuição com aspecto bimodal. Esse subgrupo sugere fortemente a presença do fenótipo "metabolizador lento", o qual pode ser devido tanto à expressão de uma herança monogênica quanto à expressão de uma combinação de fatores genéticos e não genéticos, conforme já discutimos (distúrbio hepático, condições nutricionais com reflexo no percentual de ligação protéica da droga, etc..) porém dependente de um fator principal.

A distribuição que observamos é, porém, compatível com o padrão de herança autossômica recessiva. A incidência de metabolizadores lentos de fenitoína na população em geral é estimada em 1 para cada 500 pessoas. (54,126). Segundo Inaba, o modo de transmissão ainda não está bem esclarecido (54), mas trabalhando com a hipótese de que a transmissão seja recessiva, conforme também sugerem os estudos de Veronese e cols. (126), a frequência gênica seria da ordem de 4,47% (se os homozigotos forem encontrados na proporção de 1/500), e a frequência esperada de heterozigotos, por sua vez, seria de 8,54%. Em nossa amostra, encontramos 6,73% de pacientes com níveis plasmáticos mais altos, formando um subgrupo compatível com o estado heterozigoto. De fato, ao compararmos a frequência de heterozigotos esperada, segundo o equilíbrio de Hardy-Weimberg, e a que observamos, constatamos que nossa amostra não difere significativamente da frequência esperada ($X^2 = 0,4377$; G.L. = 1; $0,30 < p < 0,50$). Veronese observou, em uma amostra de 106 indivíduos, que os pais de metabolizadores lentos previamente detectados localizavam-se, quanto aos índices de metabolismo, na extremidade inferior (menor velocidade metabólica) de uma curva unimodal, sugerindo claramente uma influência dos gens com efeito recessivo, em heterozigose, sobre a velocidade de metabolização (126).

Ao estabelecermos os critérios de inclusão e de exclusão de pacientes na amostra, procuramos minimizar os efeitos dos fatores não genéticos. Porém, as características de uma amostra de ambulatório não nos permitem um controle absoluto sobre as variáveis. Assim, pudemos detectar um "fenótipo metabolizador lento" num grupo de usuários que, se submetidos a uma análise com condições experimentais mais rigorosas, com internação e inclusão de outros consanguíneos, p. ex., é provável que pelo menos uma parcela desses usuários tenha seu "fenótipo metabolizador lento", explicado pela herança genética, a qual tem se mostrado em alguns casos monogênica (66).

As condições experimentais para detecção dos metabolizadores lentos incluem investigação dos níveis de glicemia, uréia, creatinina, SGOT, SGPT, fosfatase alcalina, Gama GT, bilirrubinas, Na, K, Cl, ácido úrico, proteínas totais e albumina, urina I e hemograma, antes e depois da ingestão do medicamento e coletas das amostras, para verificar se as condições clínicas e principalmente a função hepática dos propósitos e de seus parentes estão dentro dos limites aceitos como normais.

O protocolo deve ainda, obviamente, respeitar os princípios éticos propostos pela OMS para experimentos dessa natureza, conforme a declaração de Helsinque (1965) e as revisões de Tóquio (1975) e Veneza (1983).

Para que as comparações das curvas de metabolização do propósito com as dos seus familiares sejam fidedignas, é necessário que o propósito esteja isento de qualquer medicação durante o tempo que o organismo necessita para eliminá-las totalmente. Assim, p. ex., se forem necessárias 2 semanas para eliminação de um fármaco, durante esse tempo o paciente não deve ingeri-lo para poder submeter-se a uma investigação de curva de eliminação metabólica.

Assim, o propósito só poderia participar se estivesse livre de crises para ter sua medicação suspensa previamente (geralmente é aceito o período mínimo de dois anos sem crises para suspensão da medicação).

Sob outro aspecto, vale lembrar que a convocação de familiares e sua internação para investigação é onerosa e nem sempre encontra a anuência dos mesmos.

Talvez o somatório dessas dificuldades explique a relativa escassez de estudos dessa natureza citados na literatura.

De qualquer forma, se a opção para investigar metabolizadores lentos recair sobre o estudo das curvas de farmacocinética, o método ideal é o que investiga simultaneamente o nível plasmático do fármaco e o nível do seu principal metabólito (5- (4-hidroxifenil) 5-fenilhidantoína conhecido como p-HPPH) na urina, como por exemplo o método proposto por Maya e cols. (76).

Outra abordagem seria a investigação da atividade enzimática do citocromo P450, responsável especificamente pela metabolização da fenitoína, através de uma coleta simples de sangue (ou urina), sem necessidade de internação.

Os trabalhos já publicados sobre o assunto evidenciam que, até o momento, já foram realizados muitos avanços no estudo dos marcadores metabólicos que auxiliam na determinação dos metabolizadores lentos de drogas como a mefenitoína (142) cuja estrutura é muito semelhante à da fenitoína. Segundo esses autores, a hidroxilação da mefenitoína é catalizada pela enzima citocromo P450 CYP2PC19. A propósito, Inaba (54) comenta que os polimorfismos da metabolização da fenitoína e mefenitoína são estreitamente correlacionados. É provável, portanto, que num futuro próximo, estejam disponíveis métodos cromatográficos capazes de identificar na urina os marcadores metabólicos do citocromo P450, como demonstraram Xie e cols., para a fenitoína.

Por outro lado, Veronese e cols. (127) evidenciaram que o principal passo metabólico da fenitoína (4-hidroxilação) e da tolbutamida (metilhidroxilação) é catalizado pelas mesmas isoenzimas P450. Os autores estudaram a cinética da hidroxilação da tolbutamida e da fenitoína em 7 variantes das enzimas

CYP2C e concluíram que as variantes 2C9 e 2C10 são as principais responsáveis pela 4-hidroxilação da fenitoína. O conhecimento exato das variantes enzimáticas responsáveis pela metabolização da fenitoína é mais um passo importante já realizado para o desenvolvimento de um teste que detecte a presença dessas variantes do citocromo P450 com auxílio de genética molecular e marcadores de DNA específicos.

Há, porém, uma implicação de interesse imediato nos dados até aqui obtidos, e que independe da resultante "fenótipo metabolizador lento" ser devida à maior ou menor influência genética: trata-se da atenção que o clínico deve ter para com um percentual grande de usuários que, ainda que tomados os cuidados na dose, estarão, por diversos fatores, com seus níveis plasmáticos acentuadamente deslocados da FT. Alguns destes apresentam níveis acima da FT, com remissão dos sintomas e ausência de efeitos colaterais adversos. Outros, porém, apresentam os efeitos colaterais. Dos que apresentam subníveis, alguns têm remissão dos sintomas e outros não. Tal variabilidade está descrita na literatura e, uma vez constatada, deve ser levada em conta. Sua importância reflete-se também na magnitude dos possíveis efeitos teratogênicos, conforme o metabolismo for mais rápido ou mais lento, como demonstram Van Dicke e cols. (125).

Com relação aos pacientes com níveis plasmáticos abaixo da FT, Eadie, num estudo retrospectivo de 25 anos de prática de monitorização terapêutica realizado em Brisbane, Austrália (27), observou que uma parte dos usuários alcança a remissão dos sintomas mesmo com níveis até quatro vezes menores do que o mínimo aceito como faixa terapêutica, reforçando as ponderações de Porter quanto à flexibilidade do conceito de FT (100). Eadie concluiu também que a monitorização terapêutica tem mais influência nos percentuais de cura da epilepsia quando instituída já nos primeiros seis meses de tratamento.

5.1.2. Carbamazepina

Dentre os usuários de cbz, detectamos 2 pacientes que, após a correção do nível plasmático pela dose por kg de peso e pelo intervalo entre a ingestão e a coleta da amostra, apresentaram níveis acima da FT (entre 17.5 e 18.5 mg/ml) e formaram um grupo isolado da curva de distribuição normal. Por serem menos sugestivos do que o grupo da DPH, evitamos caracterizar a distribuição como "bimodal", mas tais pacientes merecem atenção especial, tanto do ponto de vista clínico como do ponto de vista de investigação das causas do fenótipo "metabolizador lento". A herança da capacidade de metabolização da carbamazepina tem sido descrita na literatura até o momento, como poligênica e a distribuição dos seus níveis plasmáticos como unimodal. Além disso, do ponto de vista clínico, é importante conhecer numa amostra de população tomada ao acaso, qual a incidência de "metabolizadores lentos", mesmo dentro de uma distribuição unimodal. Por exemplo, além dos 2 pacientes acima mencionados, detectamos mais 12 pacientes com níveis entre 13.5 e 16.5 µg/ml, os quais somados representam um percentual de 8.2%. Além destes, detectamos um grupo que, após correção da dose por kg, apresentou níveis baixos, sugerindo um metabolismo mais acelerado, o que do ponto de vista clínico também é relevante.

A literatura descreve a carbamazepina como um exemplo de autoindução enzimática. É previsível, portanto, que em usuários mais antigos encontremos metabolizadores mais rápidos. Em que medida isto acontece e em que proporção o fenômeno pode ser decisivo na reincidência ou não das convulsões pareceram-nos serem as questões sobre as quais ainda é necessário maior investigação.

No presente trabalho abstinemo-nos de analisar e interpretar as correlações entre níveis plasmáticos e remissão das convulsões ou aparecimento de efeitos colaterais, mesmo cômicos de sua importância.

Justificamos esta medida com a observação de que em nossa amostra, a confiabilidade das informações necessita de maior investigação prévia quanto a itens mais subjetivos como surgimento de efeitos colaterais, cuja descrição e averiguação é mais complexa do que a averiguação de estar ou não ingerindo medicação ou ter ou não doenças concomitantes, por exemplo.

Ao revisarmos a literatura, encontramos uma descrição de 4 pacientes com hipersensibilidade à carbamazepina, observados por Alldredge e cols. (2) . Destes, 3 tiveram seus sintomas exacerbados com a substituição da carbamazepina por outro antiepilético com anel aromático em sua estrutura química, mas toleraram bem a substituição pelo ácido valproico, e seus sintomas de hipersensibilidade regrediram. Esse trabalho indica que existe também uma outra forma de variabilidade genética, que se expressa através de um fenômeno imunológico, o qual mostrou-se menos específico, uma vez que todos os antiepiléticos com anel aromático em sua estrutura induziram à mesma reação de hipersensibilidade. Alldredge não comenta, no entanto, se esses quatro pacientes hipersensíveis apresentaram também o metabolismo dos fármacos com velocidade diferente do normal.

5.3 Conclusão

Quanto à implantação do método de dosagem utilizado (HPLC) , o mesmo mostrou-se satisfatório tanto do ponto de vista da viabilidade econômica quanto da confiabilidade dos resultados. Consolidou-se a partir dele um serviço de dosagens de rotina, voltado para o Ambulatório de Epilepsia, antes inexistente na UNICAMP.

Além disso, os resultados que encontramos permitem concluir que:

a. Os usuários de DPH requerem um controle sistemático de seus níveis plasmáticos, tanto devido aos casos de não aderência, como ao grande número de níveis plasmáticos deslocados da FT.

b. Dentre os usuários com níveis deslocados da FT, 6,7% conferem à curva de distribuição de níveis plasmáticos um aspecto sugestivo de bimodalidade (seus níveis plasmáticos estão acentuadamente mais altos) e portanto merecem uma investigação mais aprofundada quanto à possibilidade de apresentarem metabolismo mais lento devido a causas principalmente genéticas.

c. O mesmo cuidado é necessário para os usuários de CBZ, pois ainda que com um percentual maior de níveis plasmáticos dentro da FT, também possuem numerosos casos de não aderência e níveis deslocados da FT, embora, nesse caso, não tenhamos encontrado evidências sugestivas de bimodalidade na distribuição.

APÊNDICE

6. APÊNDICE

A. Cálculo da dosagem a partir das alturas dos picos obtidos por HPLC (Exemplo numérico)

1º Passo: medida das alturas dos picos (centímetros) e cálculo das razões

Amostra	Alt.FB	Raz. Alt.	DPH	Raz.	Alt.CBZ	Raz.	Alt. PI
A	0,5	0,041	0,2	0,016	0,3	0,025	12,0
B	1,1	0,107	0,3	0,029	0,6	0,058	10,2
C	3,3	0,300	1,0	0,090	1,8	0,163	11,0
D	5,5	0,567	1,6	0,165	3,0	0,310	9,7
E	12,9	1,612	3,0	0,375	7,4	0,925	8,0
CQ.II	8,0	0,727	2,7	0,245	2,9	0,264	11,0
PAC.1	9,8	1,342	--	0,6	0,082	7,3	
PAC.2	--	2,3	0,24	2 3,7	0,389	9,5	
PAC.3	--	--	2,7	0,350	7,7		

Obs: as razões são obtidas pela divisão da altura do pico do anticonvulsivante a ser medido pela altura do pico do padrão interna (PI)

2º passo: Cálculo de um "fator médio", resultado da divisão dos valores conhecidos da curva padrão pelas razões obtidas

Valores da curva padrão ($\mu\text{g/ml}$)

	FB	DPH	CBZ
A	2	1	1
B	4	2	2
C	12	6	6
D	20	10	10
E	40	20	20

fatores obtidos

	FB	DPH	CBZ
A	48,78	62,50	40,00
B	37,38	68,97	34,48
C	40,00	66,66	36,80
D	35,77	60,66	32,25
E	24,80	53,33	21,26
média	37,24	62,41	33,03

3º passo: calcular as concentrações do controle de qualidade externo obtidas, e determinar se estão dentro dos limites aceitáveis.

(concentração = fator médio x razão)

conc. de FB (CQ II) obtida = $37,24 \times 0,727 = 27,1$

(valor fornecido pelo laboratório produtor = $24,8 \pm 4,9$)

conc. de DPH (CQ II) obtida = $62,41 \times 0,245 = 15,3$

(valor fornecido pelo laborat. produtor = $14,1 \pm 2,8$)

conc. de CBZ (CQ II) obtida = $33,03 \times 0,264 = 8,7$

(valor fornecido pelo laborat. produtor = $8,9 \pm 1,8$)

4º passo: Como os valores obtidos estão dentro dos limites aceitos pelo laboratório produtor como satisfatórios, realizamos a última etapa ou seja, a obtenção dos valores dos níveis plasmáticos dos pacientes.

Pac.1

$$\text{conc. de FB} = 37,24 \times 1,342 = 50,0$$

$$\text{conc. de CBZ} = 33,03 \times 0,082 = 2,7$$

Pac.2

$$\text{conc. de DPH} = 62,41 \times 0,242 = 15,1$$

$$\text{conc. de CBZ} = 33,03 \times 0,389 = 12,8$$

Pac. 3

$$\text{conc. de CBZ} = 33,03 \times 0,350 = 11,6$$

B.Resultados

B.1. Totais de amostras analisadas

Fenobarbital:	96
Fenitoína:	216
Carbamazepina:	421
Politerapia:	192
Total geral:	925

B.2. Fenobarbital (FB) (FT: 10-30 ug/ml)

1. sem nível mensurável:	4	(4,16%)
2. até 7µg/ml:	8	(8,33%)
3. 7,1 a 9,9 µg/ml:	10	(10,42%)
4. 10 a 30 µg/ml (F.T) :	59	(61,46%)
5. 30,1 a 38,9 µg/ml:	7	(7,29%)
6. 39 µg/ml em diante:	8	(8,33%)

B.3. Fenitoína (FT: 10 a 20 µg/ml)

1. sem nível mensurável:	21	(8,89%)
2. até 7µg/ml:	54	(22,88%)
3. 7,1 a 9,9 µg/ml:	10	(12,71%)
4. 10 a 20 µg/ml:	67	(28,38%)
5. 20,1 a 26 µg/ml:	19	(8,05%)
6. acima de 26,1 µg/ml:	45	(19,07%)

B.4. Carbamazepina (FT: 4 a 12 µg/ml)

1. sem nível mensurável:	14	(3,33%)
2. 1 a 2,8% µg/ml:	15	(3,56%)
3. 2,9 a 3,9 µg/ml:	12	(2,85%)
4. 4 a 12 µg/ml:	287	(68,11%)
5. 12,1 a 15,6 µg/ml:	68	(16,15%)
6. acima de 15,6 µg/ml:	25	(5,94%)

B.5. Politerapia

Total geral de análises de pacientes sob politerapia: 192

Total de análises com 2 anticonvulsivantes medidos: 132

B.5.1. Pacientes sob uso de Carbamazepina e Fenitoína: 50

Ambos na F.T.:	10	(20%)
CBZ ou DPH na F.t.:	26	(52%)
Nehum na F.T.:	14	(28%)

B.5.2. Pacientes sob uso de Carbamazepina e Fenobarbital: 47

Ambos na F.T.:	10	(21,28%)
CBZ ou FB na F.T.:	21	(44,68%)
Nenhum na F.T.:	16	(34,04%)

B.5.3. Pacientes sob uso de Fenitoína e Fenobarbital: 35

Ambos na F.T.:	6	(17,14%)
FNT ou FB na F.T.:	19	(54,28%)
Nenhum na F.T.:	10	(28,57%)

Somando-se as três combinações:

Ambos na F.T.:	26	(19,7%)
Apenas um na F.T.:	66	(50%)
Nenhum na F.T.:	40	(30,30%)

B.5.4 Desvios maiores do que 30%:

CBZ: 18 (12,41% de 145) , assim distribuidos:

sem nível mensurável:	6
abaixo da F.T.:	8
acima da F.T.;	4

DPH: 46 (42,82% de 110) , assim distribuidos:

sem nível mensurável:	8
abaixo da F.T.:	23
acima da F.T.:	15

FB: 32 (39,02% de 82) , assim distribuídos:

sem nível mensurável:	10
abaixo da F.T.:	9
acima da F.T.:	13

B.5.5. Total de pacientes apresentando níveis não mensuráveis:

a. em ambos os fármacos:	5	(3,79% de 132)
b. em apenas um:	2	(9,10% de 132)

Obs.: Do grupo de 60 análises de pacientes sob politerapia que não foi estudado, 7 apresentaram níveis plasmáticos dos três anticonvulsivantes medidos (um dos três anticonvulsivantes sem prescrição médica) , alguns tinham associado um dos três anticonvulsivantes medidos com outro não medido (ácido valpróico ou benzodiazepínico) e os demais apresentavam associados anticonvulsivantes com complexos vitamínicos, antibióticos, diuréticos, etc..

B.6. Pacientes com mais de uma dosagem de anticonvulsivante ao longo do tempo (n=64) (foram considerados os casos em que não houve troca de medicamento ou de dosagem, pois não os submetemos à equação de ajuste, foram descartados os casos com aparecimento de patologias concomitantes ou acréscimo de medicação, e aqueles com resultado igual a zero e m uma das medidas)

B.6.1. Ambas as dosagens "concordantes" (se a primeira dosagem apresentou-se abaixo da Ft, a segunda também apresentou-se, e assim por diante) : 81%

B.6.2. Dosagens com uma "discordância" de até 30% (se a primeira apresentou-se p. ex. no limite mínimo da FT, a segunda apresentou-se até 30% abaixo, e assim por diante) : 11%

B.6.3. Dosagens com "discordância" maior do que 30%: 8%

Ou seja, ao analisarmos o resultado de um paciente dentro das condições expostas acima, temos em torno de 90% de segurança de que o resultado é constante ou pelo menos pouco variável ao longo do tempo.

Referências Bibliográficas

7.Referências Bibliográficas

1. Albright, P.S. (1983) : Effects of carbamazepine, clonazepam and phenytoin on seizure threshold in amygdala and cortex. *Exp. Neurol.* 79:11-17
2. Alldredge, B.K., Knutsen, A.P., Ferriero, D. (1994) : Antiepileptic drug hypersensitivity syndrome - in vitro and clinical observations. *Pediatric Neurology*, 10:169-171
3. Ashley, J.J. and Levy, G. (1972) : Inhibition of diphenylhydantoin elimination by its major metabolite. *res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol. Ther.*, 4:297-306
4. Assael, B.M. (1982) : Pharmacokinetics and drug distribution during postnatal development. *Pharmacol. Ther.*, 18:159-197
5. Aranda, J.V., Louridas, A.T., Vitullo, B.B., Thom,P., Aldrige,A., and Haber,R. (1979) ; Metabolism of theophylline to caffeine in human fetal liver. *Science*, 206:1319-1321
6. Benetello, P.,Furlanut, M., Pasqui, L., Camillo, L., Perlotto, N. and Testa, G. (1987) : Absence of effect of cigarette smoking on serum concentrations of some anticonvulsivants in epileptic patients. *Clinical Pharmacokinetics*, 12:302-304
7. Booker, H.E., and Darcey, B. (1973) : Serum concentrations of free diphenylhydantoin and their relationship to clinical intoxication. *Epilepsia*, 14: 177-184

8. Booker, H.E. (1975): Idiosyncratic reactions to the antiepileptic drugs. *Epilepsia*, 16:171-181
9. Borondy, P., Chang, T. and Glazko, A.J. (1972): Inhibition of diphenyl-hidantoin hydroxylation by 5-p-hydroxyphenyl-5phenyl-hydantoin. *Fed. Proceed.*, 31:582
10. Brodie, M.J., Howden, C.W., Birnie, G.G. (1989) : Drug metabolism in liver disease. *Pharmac. Ther.* 40: 439-474
11. Burke, M.D., Vadi, H., Jernstrom, B. and Orrenius, S. (1977) : Metabolism of Benzo (a) pyrene with isolated hepatocytes and the formation and degradation of DNA binding derivatives. *J. Biol. Chem.*, 252: 6424-6431
12. Carl, G.F., Gill, MW., and Schatz, R.A. (1988) : Effect of chronic primidone treatment on folate dependent one carbon metabolism in the rat. *Biochem. Pharmacol.*, 36:2139-2144
13. Cereghino, J.J., Brock, J.T., Van Meter, J.C., Penry, J.K., Smith, L.D., And White, B.G. (1974): Carbamazepine for epilepsy. A controlled prospective evaluation. *Neurology*, 24: 401-410
14. Cheung, W.Y. (1980): Calmodulin role in cellular regulation. *Science*, 207:19-27
15. Clapper, M.L. and Klein, N.W. (1986) : Identification of a teratogenic drug-protein complex in sera of phenytoin-treated monkeys. *Epilepsia*, 27:685-696
16. Conney, A.H., Miller, E.C. and Miller, J.A. (1956): The metabolism of metylated aminoazodyes. Evidence for induction of enzyme synthesis in the rat by 3-methylcholanthrene. *Cancer Res.*, 16:450-459
17. Courtney, K.R. (1975) :Mechanism of frequency-dependent inhibition of sodium currents in mielinated nerve by the lidocaine derivative GEA 968. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 195:225-236
18. Cresteil, T., Beaune, P., Kremers, P., Celier, C., Guengerich, F.P. and Leroux, J. (1985) : Immunoquantification of epoxide hydrolase and cytochrome P450 isozymes in fetal and adult liver microsomes. *Eur. J. Biochem.*, 151:345-350
19. Cristiansen, C., Kristensen, M., and Rodbro, P. (1972): Latent osteomalacia in epileptic patients on anticonvulsivants. *Brit. Med. J.*, 3: 738-739
20. Crowder, J.M., and Beradford, H.F. (1987): Common anticonvulsants inhibit Ca²⁺ uptake and aminoacid neurotransmitter release in vitro. *Epilepsia*. 28:378-382
21. Dale, H. (1935): Pharmacology and nerve-endings. *Proc. R. Soc. Med. (London)* . 28:319-332
22. Dam, M., Kristensen, C.B., Hansen, B.S. and Christiansen, J. (1977) : Interaction between carbamazepina and propoxiphene in man. *Acta Neurol. Scand.*, 56:633-647
23. Delgado-Escueta, A.V. and Horan, M.P. (1980) : Phenytoin: Biochemical membrane studies. *Adv. Neurol.*, 27:377-398

24. De Lisi, L.E., Neckers, L.M., Weinberger, D.R., Wyatt, R.J. (1981) : Increase Whole Blood Serotonin Concentrations in Chronic Schizophrenic Patients. *Arch. Gen. Psychiatry*, 38:647-650
25. De Weer, P. (1980): Phenytoin: Blockage of resting sodium channels. *Adv. Neurol.*, 27:353-361
26. Dodson, W.E. (1984): Antiepileptic drugs utilisation in pediatrics patients. *Epilepsia*, 25 (s.2):132-133
27. Eadie, M.J. (1994): Plasma antiepileptic drug monitoring in neurological practice: A 25 year experience. *Therapeutic drug monitoring* 16:458-468
28. Eccles, J.C. (1976): From electrical to chemical transmission in the central nervous system. The closing address of the Sir Henry Dale Centennial Symposium. *Notes Rec. R. Soc Lond.* 30:219-230
29. Fatt, P., and Katz, B. (1951): An analysis of the end-plate potential recorded with an intra-celular electrode. *J. Physiol. (Lond)* . 115:320-370
30. Ferrendelli, J.A. (1980): Cyclic nucleotide regulation in the brain. *Adv. Neurol.*, 27:429-433.
31. Ferrendelli, J.A., and Daniels-McQueen, S. (1982): Comparative actions of phenytoin and other anticonvulsant drugs on potassium- and veratridine-stimulated calcium uptake in synaptosomes. *J. Pharm. Exp. Ther.*, 220:29-34
32. Festoff, B.W. and Appel, S.H. (1968): Effect of diphenylhydantoin on synaptosome sodium-potassium ATPase. *J. Clin. Invest.*, 47:2752-2758
33. Fonseca, A.L. (1991): *Interações Medicamentosas*. Editora Public. Cientificas. Rio de Janeiro, 440pp
34. Fromm, G.H., and Killian, J.M. (1967): Effect of some anticonvulsant drugs on the spinal trigeminal nucleus. *Neurology*, 17:275-280
35. Furshpan, E.J., and Potter, D.D. (1959): Transmission at the giant motor synapses of the crayfish. *J. Physiol. (London)* . 145:289-325
36. Gastaut, H. (1973): *Dictionary of Epilepsy*. Geneva: World Health Organization. 75pp
37. Gillies, H.C., Rogers, H.J., Spector, R.G., Trounce, J.R. (1986): *A textbook of clinical pharmacology*, 2a. edição, Hodder and Stoughton Ltd., Great Britain, 274-275
38. Glazko, A.J. (1972): Diphenylhydantoin. *Pharmacology*, 8:163-177
39. Greenblatt, D.J., Sellers, E.M., and Shader, R.I. (1983): Drug disposition in old age. *New Engl. J. Med.*, 306:1081-1088.
40. Hahn, T.J. (1976): Bone complications of anticonvulsants. *Drugs*, 12: 201-211
41. Hauptmann, A. (1912): Luminal bei epilepsie: *Munch. Med. Wochenschr.* 59:1907-1909
42. Hauser, W.A. (1978): Epidemiology of epilepsy. *Adv. Neurol.* 19:313-339.

43. Hayes, M.J.L., Langman, M.J.S., and Short, A.H. (1975): Changes in drug metabolism with increasing age. II. Phenytoin clearance and protein binding. *Brit. J. Clin. Pharmacol.*, 2:73-79
44. Hernandez-Peon, R. (1965): Central action of G32883 upon transmission of trigeminal pain impulses. *Med. Pharmacol. Exp. (Basel)*, 12:73-80
45. Hershkowitz, N., and Raines, A. (1978): Effects of carbamazepine on muscle spindle discharges. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 204:581-591
46. Hockings, N., Pall, A., Moody, J., Davidson, A.V.M., and Davidson, D.L.W. (1986): The effect of age on carbamazepine pharmacokinetics and adverse effects. *Brit. J. Clin. Pharmacol.*, 22:725-728
47. Hommes, O.R. (1981): Excitatory properties of folates derivatives. In: *advances in epileptology: 12th Epilepsy International symposium*, editado por M. Dam, L. Gram, and J.K. Penry, pp. 641-651. Raven Press, New York
48. Hommes, O.R., Hollinger, J.L., Jansen, M.J.T., Schoofs, V.D., Wiel, T., and Kok, J.C.N. (1979): Folic Acid in Neurology, Psychiatry and Internal Medicine, editado por M.I. Botez and E.H. Reynolds, pp. 285-316. Raven Press, New York
49. Honda, H., and allen, M. (1973): The effect of an iminostilbene derivative on peripheral nerve. *J. Med. Assoc. Ga.*, 62:38-42
50. Hood, T.W., Siegfried, J., and Haas, H.L. (1983): Analysis of carbamazepine actions in hippocampal slices of the rat. *Cell Molec. Neurobiol.*, 3:213-222
51. Hooper, W.D. (1974): Plasma Diphenylhydantoin levels in australian adults. *Aust. N.Z.J. Med.*, 4:449
52. Houghton, G.W., and Richens, A. (1975): Effect of age, weight and sex on serum phenytoin concentration in epileptic patients. *Brit. J. Clin. Pharmacol.*, 2:251-256.
53. Idle, J.R., and Smith, R.L. (1979): Polymorphism of oxidation at carbon centers of drugs and their clinical significance. *Drug Metab. Rev.* 9:301-317
54. Inaba, T. (1990): Phenytoin: Pharmacogenetic polymorfism of 4'-hydroxilation. *Pharmacol. Ther.* 46: (341-347)
55. Iivanainen, M., Viukari, M. and Helle, E. P. (1977): Cerebellar atrophy in phenytoin-treated mentally retarded epileptics. *Epilepsia*, 18:375-386
56. Jacqz, E., Hall, S.D., Branch, R.A., and Wilkinson, G.R. (1986): Polymorphic metabolism of mephenytoin in man: Pharmacokinetic interaction with a co-regulated substrate, mephobarbital. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 39:646-653
57. Jusko, W.J. (1978): Role of tobacco smoking in pharmacokinetics. *J. Pharmacokin. Biopharm.*, 6:7-29.

58. Kabra, P.M., Stafford, B.E., and Marton, L.J. (1977): Simultaneous measurement of phenobarbital, phenytoin, primidone, ethosuximide, and carbamazepine in serum by HPLC. *Clin. Chem.* 23:1284-1288
59. Kalow, W. (1987): Genetic variation in the human hepatic cytochrome P-450 system. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 31:663-641
60. Kalow, W. (1991): Interethnic variation of drug metabolism: *Tips*, vol.12: 102-107
61. Kandel, E.R. and Schwartz, J.H. in: *Principles of Neural Science*, Ed. Elsevier, N.Y., p.124
62. Kauffman, F.C. and Thurman, R.G. (1980): Factors regulating drug metabolism in intact hepatocytes. *Pharmacol. Rev.*, vol. 31 (4): 229-251
63. Kohler, H.G. (1966): Haemorrhage in the newborn of epileptic mothers. *Lancet*, 1:267
64. Krause, K., Berlitz, P., and Schmidt-Gayk, H. (1983) in *Chronic Toxicity of Antiepileptic Drugs*, editado por J. Oxley, d. Janz e H Meinardi, pp193-200, Raven-Press, New York
65. Krupp, P. (1969): The effect of tegretol on some elementary neuronal mechanisms. *Headache*, 9:42-46
66. Kutt, H., Wolk, M., Scherman, R. and McDowell, F. (1964): Insufficient para-hydroxylation as a cause of diphenylhydantoin toxicity. *Neurology*, 14:542-548
67. Kupfer, A. Patthwardhan, R., Ward, S., Scenker, S., Preisig, R., and Branch, R.A. (1984) ; Stereoselective metabolism and pharmacogenetic control of 5-phenyl-5-ethylhydantoin in humans. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 230:28-33
68. Lascelles, P. T., Kocen, R.S. and Reynolds, E.H. (1970): The distribution of plasma phenytoin levels in epileptic patients. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, 33: 501-505
69. Lawless, L.M., DeMonaco, H.J., and Muido, L.R. (1982): Protein binding in epileptic patients. *Neurology (Ny)* . 32:415-418
70. Levy, R.H., and Yerby, M.S. (1985): Effects of pregnancy on antiepileptic drug utilisation. *Epilepsia*, 26 (Suppl.1): 552-557
71. Linde, J., Hansen, J.M., Siersback-Nielsen, K., and Fuglsang-Fredriksen, V. (1971): Bone density in patients receiving long-term anticonvulsant therapy. *Acta Neurol. Scand.*, 47:650-651.
72. Loi, C.M., and Vestal, R.E. (1988): Drug metabolism in the elderly. *Pharmacol. Ther.*, 36:131-149
73. Macdonald, R.L. and McLean, M.J. (1986): Anticonvulsant Drugs: Mechanisms of action. *Advances in Neurology*, citado por De Lorenzo in *Antiepileptic Drugs*, 3^o ed. p. 143, Raven Press, New York.
74. Marangos, P.J., Post, R.M., Patel, J., Zander, K., Parma, A. and Weiss, S. (1983): Specific and potent interactions of carbamazepine with brain adenosine receptors. *Eur. J. Pharmacol.*, 93:175-182

75. Martz, F., Faillinger, C. and Blake, D.A. (1977): Phenytoin teratogenesis: Correlation between embryopathic effect and covalent binding of putative arene oxide metabolite in gestational tissue. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 203: 231-239.
76. Maya, M.T., Farinha, A.R., Lucas, A.M., Morais, J.A. (1992): Sensitive method for the determination of phenytoin in plasma, and phenytoin and 5- (4hydroxyphenyl) -5-phenyl-hydantoin in urine by high-performance liquid chromatography: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 10:1001-1006
77. McLean, M.J., and Macdonald, R.L. (1986b): Carbamazepine and 10, 11-epoxycarbamazepine produce use- and voltage-dependent limitation of rapidly firing action potentials of hippocampal neurons in cell culture. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 228:727-738
78. Melikian, A.P., Straughn, A.B., Slywka, G.W.A., Whyatt,P.L., and Meyer, M.C. (1977): Bioavailability of 11 phenytoin products. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 5:133-146
79. Merlis,J.K. (1970): Proposal for an international classification of the epilepsies. *Epilepsia.* 11:114-119
80. Merritt, H.H., and Putnam, T.J. (1938a): A new series of anticonvulsant drugs tested by experiments on animals. *Arch. Neurol. Psychiatry*, 39:1003-1015
81. Morselli, P.L., Franco-Morselli, R., and Bossi, L. (1980): Clinical pharmacokinetics in newborns and infants. *clinical Pharmacokinetics*, 5:485-527
82. Motulsky, A. (1957): Drug reactions, enzymes and biochemical genetics. *JAMA*, 165:853
83. Mucklow, J.C. (1988): Environmental factors affecting drug metabolism. *Pharmacol. Ther.*, 36:105-117.
84. Nebert, D.W., And Gonzalez, F.J. (1985): Cytochrome P450 gene expression and regulation. *Trends Pharmacol. Sci.* 6:160-164.
85. Nebert, D.W. and Gonzalez, F.J. (1988): P450 genes: Structure, evaluation and regulation. *Ann. Rev. Biochem.*, 56:945-993.
86. Nebert, D.W. and Jaiswal, A.K. (1987): Human drug metabolism polymorphism: use of recombinant DNA techniques. *Pharmacol. Ther.*, 33:11-17
87. Netter, K.J. (1987): Mechanisms of monooxygenase induction and inhibition. *Pharmacol. Ther.*, 33:1-9
88. Offermann,G. (1983): Chronic antiepileptic drug treatment and disorders of mineral metabolism. IN: *Chronic Toxicity of Antiepileptic Drugs*, edited by J. Oxley, D. Janz, and H. Meinardi, pp 175-184, Raven Press, New York
89. Olpe, H.R., and Jones, R.S.G. (1983): The action of anticonvulsant drugs on the firing of locus coeruleus neurons: selective, activating effect of carbamazepine. *Eur. J.Pharmacol.* 91:107-110
90. Oxley,J. Janz, D. and Meinardi, H.,eds. (1983): *Chronic Toxicity of Antiepileptic drugs*. Raven Press, New York

91. Parker, W.A. and Shearer, C.A. (1979): Phenytoin hepatotoxicity: A case report and review. *Neurology (Minneap.)*, 2:175-178
92. Patel, H., and Crichton, J.V. (1968): The neurological hazards of diphenylhydantoin in childhood. *J. Pediatr.*, 73: 676-684
93. Pelkonen, O., Vahakangas, K., Karki, N.T., and Sotaniemi, E.A. (1984): Genetic and environmental regulation of aryl hydrocarbon hydroxylase in man: Studies with liver, lung, placenta and lymphocytes. *Toxicol. Pathol.*, 12:256-260.
94. Perucca, E. (1987): Drug metabolism in pregnancy and childhood. *Pharmacol. Ther.*, 34:129-143.
95. Perucca, E. and Richens, A. (1985): Clinical pharmacokinetics of antiepileptic drugs. In: *Antiepileptic drugs, Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 74, edited by D. Janz, and H.H. Frey, pp. 661-723. Springer-Verlag, Berlin.
96. Perucca, E., and Richens, A (1989): Biotransformation. In: *Antiepileptic Drugs*, 3rd ed., Raven Press Ltd. New York. pp 23-48
97. Pisani, F., Fazio, A., Oteri, G., Ruello, C., Gitto, C., Russo, F., and Perucca, E. (1986): Sodium valproate and valpromide: Differential interactions with carbamazepine in epileptic patients. *Epilepsia*, 27:548-552
98. Pisani, F., Fazio, A., Oteri, G., Spina, E., Perucca, E. and Bertilsson, L. (1988): Effect of valpromide on the pharmacokinetics of carbamazepine-10,11-epoxide. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 25:611-613
99. Porot, A. (1967): *Diccionario de Psiquiatria*. Editorial Labor. Barcelona. 608 pp
100. Porter, R.J. (1984): *Epilepsy: 100 Elementary Principles*. W.B. Saunders Company Ltd., London. 165pp
101. Porter, R.J. and Rogawski, M.A. (1990): Antiepileptic drugs: Pharmacol. mechanisms and clinical efficacy with consideration of promising developmental stage compounds. *Pharmacol. Rev.* vol. 42(3):223-286
102. Post, R.M., Uhde, T.W., Rubinow, D.R., Ballenger, J.C., and Gold, P.W. (1983): Biochemical effects of carbamazepine: relationship to its mechanisms of action in affective illness. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 7:263-271
103. Rall, T.W. and Schleifer, L.S. (1980): In: *Goodman and Gilman: The Pharmacological Basis of Therapeutics (7. ed.)* Mac Millan Publishing co. inc., p.432
104. Ramon y Cajal, S. (1894): *La fine structure des centres nerveux*. *Proc. R. Soc. Lond.* 55:444-468
105. Ramon y Cajal, S. (1911): *Histologie du Systeme Nerveux de L'homme et des Vertebres*. Vol. 2. L. Azoulay (trans) Paris: Maloine. Republicado: 1955. Madrid: Instituto Ramon y Cajal
106. Rasmussen, P. and Rushede, J (1970): Facial pain treated with carbamazepine. *Acta Neurol. Scand.*, 46: 385-408

107. Remmer, H. (1959): Der beschleunigt Abbau von Pharmaka in den Lebermikrosomen unter den Einfluss von Luminal. Naunyn Schmiedebeftig sArch Exp. Path Pharmac., 235:279-290
108. Reynolds, E. H. (1967): Effects of folic acid on the mental state and fit frequency of drug-treated epileptic patients. Lancet, 1:1086-1088
109. Reynolds, E.H. (1983): Chronic Toxicity of Antiepileptic Drugs, edited by J. Oxley, D. Janz, and H. Meinardi, pp 91-100. Raven Press, New York
110. Reynolds, E. H. (1975): Chronic antiepileptic toxicity: A review. Epilepsia, 16: 319-352
111. Reynolds, E.H. (1983): Mental effects of antiepileptic medication. A review. Epilepsia, 24:(S.2):85-95
112. Rodin, E.A., Rim, C.S., and Rennick, P.M., (1974): The effects of carbamazepine on patients with psychomotor epilepsy: Results of a double blind study. Epilepsia, 15: 547-561
113. Saltzstein, S.L., and Ackerman, L. V. (1959):Lymphadenopathy induced by anticonvulsant drugs and mimicking clinically and pathologically malignant lymphomas. Cancer, 12: 164-182
114. Schmucker, D.L. (1985): Aging and drugdisposition: An update, Pharmacol. Rev., 37:133-148
115. Schmutz, M. (1985): Carbamazepine. In: Antiepileptic Drugs. Handbook of Experimental Pharmacology. Vol 74. Springer-Verlag. Berlin. pp479-506
116. Scott, A.K., Jeffers, T.A., Petrie, J.C. and Gilbert, J.C. (1979): Serum bilirubin and enzyme induction. Brit. Med. J., 2:310
117. Sherrington, C.S. (1947): The integrative action of the nervous system. 2nd. ed. New Haven, Yale University Press
118. Simonsen, J., Zander Olsen, P. Kuhl, V., Lund, M., and Wendelboe, J. (1976): A comparative controlled study between carbamazepine and diphenylhydantoin in psychomotor epilepsy. Epilepsia 17:169-176
119. Skerritt, J.H., Davies,L.P., and Johnston, G.R. (1983): Interactions of the anticonvulsant carbamazepine with adenosine receptors: 1. Neurochemical studies and 2. Pharmacological studies. Epilepsia, 24:642-650
120. Schmidt, R.P. and Wilder, J. (1968): Epilepsy: Contemporary Neurology Series. Davis, Philadelphia
121. Schwarz, J.R. and Vogel, W. (1977): Diphenylhydantoin: Excitability reducing action in single myelinated nerve fibers. Europ. J. Pharmacol., 44:241-249
122. Smith, K. L., and Swann, J.W. (1985): Does carbamazepine act via an adenosine receptor? Epilepsia, 26:524
123. Spielberg, S.P., Gordon, G.B., Blake, D.A., Goldstein, D.A. and Herlong, H.F. (1981): Predisposition to phenytoin hepatotoxicity assessed in vitro. New England J. Med., 305: 722-727

124. Toman, J.E.P. (1952): Neuropharmacology of peripheral nerve. *Pharmacol. Rev.*, 4:168-218
125. Van Dyke, D.C., Berg, M.J., Olson, C.H. (1991): Differences in phenytoin biotransformation and susceptibility to congenital malformations: A review. *Diep. Ann. Pharmacother.* 25:987-992
126. Veronese, M.E., Miners, J.O., Rees, D.L.P., Birkett, D.J. (1993): Tolbutemide hydroxylation in humans: lack of bimodality in 106 healthy subjects. *Pharmacogenetics.* 3:86-93
127. Veronese, M.E., Doecke, C.J., Mackenzie, P.I., McManus, M.E., Miners, J.O., Rees, D.L.P., Gasser, R., Meyer, U.A., Birkett, D.J. (1993): Site-directed mutation studies of human liver cytochrome P-450 isoenzymes in the CYP2C subfamily. *Biochem. J.* 289:533-538
128. Vesel, E.S. (1978): Intraspecies differences in frequency of genes directly affecting drug disposition: The individual factor in drug response. *Pharmacological Reviews* (30) 4:555-563
129. Vesel, E.S.: Factors causing interindividual variations of drug concentrations in blood. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 16 (1): 135-148
130. Vogel, F. (1959): Moderne Probleme der Humangenetik. *Ergeb. Inn. Med. Kinderheilk.* 12:52-125
131. Wang, P.P., Beaune, P., Kaminsky, L.S., Dannan, G.A., Kadlubar, F.F., Larrey, D. and Guengerich, F.P. (1983): Purification and characterization of six cytochromes P-450 isozymes from humane liver microsomes. *Biochemistry*, 22:5375-5383
132. Ward, S.A., Goto, F., Nakamura, K., Jacqz, E., Branch, R.A. and Wilkinson, G.R. (1987): S-mephenitoil hydroxylation is inherited as an autosomal recessive trait in Japanese families. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 42:96-99
133. Weir, R.L., Padgett, W., Daly, J.W., and Adderson, S.M. (1984): Interaction of anticonvulsant drugs with adenosine receptors in the central nervous system. *Epilepsia*, 25:492-498
134. Weiss, S.R.B., Post, R.M., Marangos, P.J., and Patel, J. (1985): Adenosine antagonists, lack of effect on the inhibition of kindled seizures in rats by carbamazepine. *Neuropharmacol.*, 24:535-638
135. Welch, R.M. (1979): Toxicological implications of drug metabolism. *Pharmacol. Rev.* 30 (4): 457-467
136. Wilensky, A.J. and Lowden, J.A. (1972): The inhibitor effect of diphenylhydantoin and microsomal ATPases. *Life Sci.*, 11:319-327
137. Wilkinson, G.R. (1975): Drug disposition and liver disease. *Drug Metab. Rev.*, 4:139-175
138. Wilkinson, G.R. (1987): Clearance approaches in pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 39 (1): 1-47
139. Willow, M., Kuenzel, E.A., and Caterall, W.A. (1984): Inhibition of voltage-sensitive sodium channels in neuroblastoma cells and synaptosomes by diphenylhydantoin and carbamazepine. *Molec. Pharmacol.*, 25:228-234

140. Woodbury, D.M. (1955): Effect of diphenylhydantoin on electrolytes and on sodium turnover in brain and other tissues of normal, hypernatremic and postictal rats. *J.Pharmacol. Exp. Ther.*, 115:74-95
141. Woodbury, D.M. (1980): Proposed mechanisms of anticonvulsant action. *Adv. Neurol.*, 27:447-471
142. Xie, H.G., Huang, S.L., Zhou, H.H. (1995): High-performance liquid chromatographic determination of urinary 4'-hydroxymephenytoin, a metabolic marker for the hepatic enzyme CYP2C19, in humans. *Journal of Chromatography B-Biomedical Applications* 668(1):125-131