

Comparação do metabolismo interespecies dos principais anticonvulsivantes usados na prática clínica

Interspecies metabolism comparison from the most used anticonvulsants in clinical practice

Cristiane de Andrade¹, Sandra Elisa Haas^{1,2}, Teresa Dalla Costa¹ & Bibiana Verlindo de Araujo^{1*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

² Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Pampa, Brasil.

RESUMO

A realização de estudos pré-clínicos para investigação da metabolização de drogas antes da primeira utilização em humanos é considerada de fundamental importância para antecipar possíveis metabólitos tóxicos e interações medicamentosas na etapa clínica. Entretanto os tipos de metabólitos formados e as quantidades dos mesmos nos estudos pré-clínicos nem sempre são os mesmos observados em humanos, devido à diferença na composição do sistema enzimático em diferentes espécies animais, principalmente na composição do citocromo P450 (CYP 450). Os anticonvulsivantes, devido às suas propriedades farmacocinéticas, foram selecionados para esse estudo de revisão que compara o metabolismo em animais e humanos de fármacos muito utilizados na clínica como fenobarbital, carbamazepina, fenitoína e ácido valpróico com o objetivo de determinar se os estudos clínicos foram capazes de prever os metabólitos tóxicos e/ou reativos formados e qual a espécie animal que mostrou melhor relação com os resultados em humanos. Os resultados apresentados mostraram que, embora semelhanças qualitativas e quantitativas em relação aos metabólitos formados em animais e humanos foram observadas com alguns dos fármacos estudados, como fenitoína, ácido valpróico e carbamazepina, não foi possível estabelecer um consenso sobre qual a espécie capaz de prever a metabolização humana dessa classe de fármacos.

PALAVRAS-CHAVE: Farmacocinética, Roedores, Coelhos, Sistema Enzimático do Citocromo P-450.

ABSTRACT

The pre-clinical investigation of drug metabolism before the first use in humans is considered to have fundamental importance to anticipate potential drug interactions and toxic metabolites in clinical phase. However, the metabolites formed and their quantities are not always the same as those observed in humans due to difference in the enzyme system in different animal species, mainly at Cytochrome P450 (CYP 450). Anticonvulsants, due to their pharmacokinetic properties, were selected for this review that compares the metabolism in animals and humans of drugs widely used in clinic, such as phenobarbital, carbamazepine, phenytoin and valproic acid aiming to determine whether the pre-clinical studies were able to predict the toxic and/or reactive metabolites formed and which animal species predict their pharmacokinetics observed in humans better. The results showed that, although both qualitative and quantitative similarities in relation to metabolites formed in animals and humans have been observed for some of the drugs studied, such as phenytoin, valproic acid and carbamazepine, it was not possible to establish a consensus on which species can be able to predict the human metabolism to this class of drugs, in particular.

KEY-WORDS: Pharmacokinetics, Rodentia, Rabbits, Cytochrome P-450 Enzyme System.

***Autor Correspondente:** Araujo, Bibiana Verlindo - Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Faculdade de Farmácia - Av. Ipiranga 2752, Sala 407 - CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brasil - Tel.: +55 51 3308 5418; Fax: +55 51 3308 5437. E-mail: bibiana.araujo@ufrgs.br

1. INTRODUÇÃO

O conhecimento do metabolismo de um fármaco em desenvolvimento é necessário antes da primeira administração em humanos. Para isso são conduzidos estudos pré-clínicos *in vitro* e *in vivo* visando prever o metabolismo na etapa clínica na tentativa de antecipar a formação de metabólitos reativos ou tóxicos. A seleção das espécies animais para esses estudos pré-clínicos não é consenso, mas geralmente são utilizados animais que possuam características metabólicas semelhantes aos humanos, avaliando-se os processos metabólicos e as enzimas envolvidas na biotransformação (Schwartz & Pateman, 2004).

As espécies usualmente utilizadas em estudos pré-clínicos são camundongos, ratos, cães, coelhos e macacos. Entretanto, o metabolismo de fármacos nessas espécies nem sempre representa as mesmas etapas metabólicas envolvidas na biotransformação humana. Comparações do perfil metabólico de um fármaco inter-espécies exige criteriosa avaliação das rotas de metabolização em cada espécie selecionada e de sua possível correlação com a metabolização em humanos (Gehlhaus *et al.*, 2007).

Estima-se que mais de 50% dos fármacos são biotransformados primeiramente pelo citocromo P450 (CYP 450). O CYP 450 é uma família de enzimas que realiza reações de biotransformação de xenobióticos classificadas como reações de Fase I, que compreendem processos de oxidação, redução e hidrólise (Schwartz & Pateman, 2004). A nomenclatura para classificação da superfamília CYP 450 foi desenvolvida com base na seqüência de aminoácidos de cada isoforma, independente da reação catalisada pela enzima e dessa forma isoformas com mais de 40% de homologia na seqüência gênica, pertencem à mesma família (p. ex. CYP 1, CYP 2, CYP 3) e as isoformas com mais de 60% de homologia na seqüência são classificadas como pertencentes a mesma subfamília (p. ex. CYP 2A, CYP 2B). Para cada enzima da subfamília, são atribuídos números para identificar cada enzima (p. ex. CYP 2A1, CYP 2A2) (Schwartz & Pateman, 2004).

Em humanos as isoformas do CYP 450 são as responsáveis por 90% do metabolismo dos fármacos atualmente no mercado, destacando-se as subfamílias 3A4, 2D6, 2C9, 2C19, 2E1 e 1A2 (Shear & Spilberg, 1988). Em outras espécies animais, entretanto, não são observadas as mesmas enzimas predominando na biotransformação de fármacos. Em ratos, por exemplo, as enzimas participantes em maior extensão pertencem as subfamílias 1A1, 1A2, 2A1, 2B1, 2B2, 2C11, 2D1, 2E1 e 3A1, já em cães, as enzimas CYP1A, 2B11, 2C21, 2D e 3A12 representam a maior contribuição. Pode-se observar que a enzima em comum entre humanos, ratos e cães, pertence à família CYP1A, entretanto sua contribuição no metabolismo humano não é majoritária (Schwartz & Pateman, 2004b).

Apesar de distribuídos em diversos órgãos e tecidos por todo organismo, como membranas do trato gastrointestinal, pulmão, rins e pele, as reações de metabolização realizadas pelo CYP 450 ocorrem principalmente no fígado, órgão que possui maior quantidade enzimática. Desse modo, a maior parte dos estudos em modelos animais, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, utiliza o fígado e suas enzimas para prever o comportamento do fármaco em estudo. As técnicas *in vitro* com homogeneizados de tecidos animais possui boa probabilidade de previsão das rotas metabólicas em humanos. Do mesmo modo, homogeneizados de fígado humano ou culturas de tecidos hepáticos humanos também são utilizadas. Os homogeneizados hepáticos são uma rica fonte enzimática, uma vez que as enzimas do CYP 450 estão ligadas à membrana do retículo endoplasmático, podendo-se obter fontes enriquecidas de enzimas microsossomais através de centrifugação seletiva do homogeneizado celular (Somers, Mutch & Woondrooffe, 2004). Como a fração microsossomal não possui sulfotransferases, acetiltransferases e glutatona transferases, que são enzimas presentes no fígado, podem-se utilizar também nos estudos *in vitro* frações microsossomais suplementadas com co-fatores, na tentativa de aproximar os experimentos *in vitro* da situação de metabolismo *in vivo* (Gehlhaus *et al.*, 2007).

A biotransformação hepática representa a principal via de inativação e eliminação de fármacos. Na maioria das biotransformações de Fase I, o metabólito torna-se mais polar que o fármaco original, sendo eliminado mais rapidamente através da urina. Com a maioria dos fármacos a biotransformação resulta em uma molécula com maior polaridade, farmacologicamente inativa, entretanto, com algumas substâncias, a metabolização pode gerar compostos com atividade farmacológica ou tóxica. Pode-se citar como exemplo a codeína, biotransformada em morfina, e o paracetamol, que gera o metabólito reativo ímina-N-acetil-p-benzoquinona, responsável por necrose hepática (Shargel, Wu-Pong & Yu, 2005).

Os fármacos anticonvulsivantes, de maneira geral, possuem uma farmacocinética diferenciada, podendo ser caracterizada por meia-vida de eliminação curta, farmacocinética não-linear e formação de metabólitos reativos. Também são capazes de causar auto-indução ou auto-inibição enzimática, o que pode alterar, as concentrações plasmáticas, metabolismo e excreção de outros fármacos administrados concomitantemente. Os anticonvulsivantes são metabolizados preferencialmente por oxidação pelo CYP 450 hepático e eliminados geralmente na forma conjugada, podendo também ser excretados de modo inalterado na urina (Benedetti, 2000; Ketter, Frye & Locatelli, 1999; Ravindranath, 1998).

Na presente revisão, foram incluídos os 4 anticonvulsivantes mais utilizados na prática clínica e avaliada a capacidade de previsão dos ensaios pré-clínicos em relação ao padrão de formação de metabólitos em humanos, na tentativa de elucidar qual das espécies pré-clínicas utilizadas teria o maior poder preditivo. Os fármacos escolhidos foram a fenitoína, o ácido valpróico, a carbamazepina e o fenobarbital.

Para essa revisão, foram utilizados artigos obtidos nas bases de dados Pubmed e ISI Web of Knowledge, utilizando as palavras chaves: *anticonvulsants metabolism*, *carbamazepine metabolism*, *difference human rat*, *phenytoin metabolism*, *valproic acid metabolism*, *phenobarbital metabolism*. Foram selecionados para a revisão os artigos que apresentavam essas palavras chaves no título e/ou no *abstract* e que estavam disponíveis na íntegra, de forma gratuita, nas bases de dados consultadas. Referências de alguns artigos selecionados como indicado também foram utilizadas.

2. Metabolização da Fenitoína

A fenitoína (5,5-difenil-hidantoína) é um fármaco anticonvulsivante utilizado no tratamento de todas as crises de epilepsia, exceto crises de ausência, não causando depressão geral no sistema nervoso central. Menos de 5% do fármaco é eliminado na urina e nas fezes de forma íntegra. O metabolismo desse anticonvulsivante ocorre principalmente no retículo endoplasmático de células hepáticas, pelas enzimas do CYP 450 (Schwartz & Pateman, 2004). O metabólito 5-(4'-hidroxifenil)-5-fenil-hidantoína (4'-HFFH), inativo, é majoritário em humanos. Segundo Munns *et al.*, (1997) e Komatsu *et al.*, (2000), a fenitoína é metabolizada primeiramente em 4'-HFFH e 5-(3'-dihidroxifenil)-5-fenil-hidantoína (3'-HFFH). Esses dois compostos geram um catecol, 5-(3',4'-dihidroxifenil)-5-fenil-hidantoína (3',4'-HFFH), após uma semi-quinona, a qual é convertida em uma quinona (Figura 1).

A fenitoína está associada com diversos casos de hipersensibilidade, como *rash* cutâneo, febre, hepatite, nefrite, e necrose epidérmica tóxica. Esses efeitos adversos, que ocorrem entre 5 a 10% dos pacientes tratados, estão associados com a formação dos metabólitos, os quais se ligam covalentemente a proteínas celulares formando compostos imunogênicos, iniciando uma resposta auto-imune e inflamatória (Cuttle *et al.*, 2000; Munns *et al.*, 1997; Shear & Spilberg, 1988). Os possíveis responsáveis por essa reação são os metabólitos quinona e semi-quinona formados na última etapa da biotransformação (Kubow & Wells, 1989; Munns *et al.*, 1997; Shaisho *et al.*, 2001).

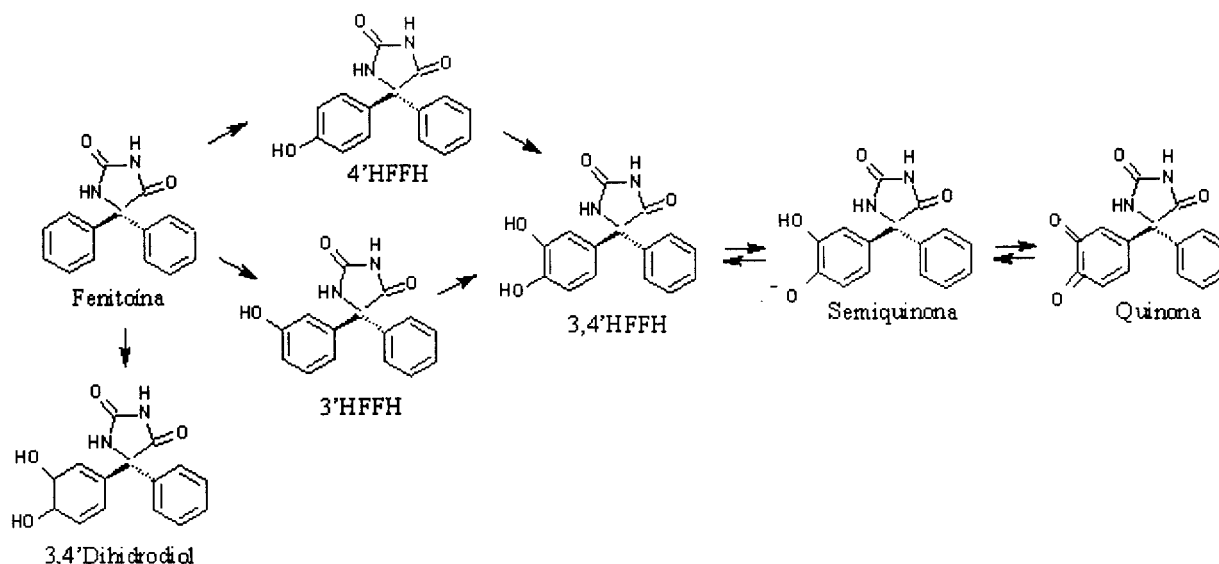


Figura 1. Biotransformação da fenitoína em humanos (Adaptado de Komatsu *et al.*, 2000 e Munns *et al.*, 1997).

O estudo das enzimas do CYP 450 envolvidas no metabolismo da fenitoína em humanos foi realizado por Cuttle *et al.*, (2000). Enzimas recombinantes humanas foram inseridas em cultura de *Escherichia coli* e incubadas com o fármaco. Essa

reação, acompanhada por imunofluorescência, possibilitou observar que a biotransformação da fenitoína em 4'-HFFH se deve ao CYP2C (majoritariamente subfamília 2C9), enquanto que a biotransformação da 4'-HFFH em 3,4'-HFFH seria devido ao envolvimento das enzimas CYP2C19 e CYP3A (Cuttle *et al.*, 2000; Komatsu *et al.*, 2000).

Yamazaki *et al.*, (2001) estudaram a biotransformação da fenitoína em fígados de ratos *Wistar*. Após a excisão dos órgãos, esses foram incubados com o fármaco juntamente com onze diferentes enzimas recombinantes, candidatas à relação com o metabolismo da fenitoína. Após 30 minutos de incubação a mistura foi analisada. Observou-se o envolvimento majoritário da CYP2C6, seguido pela CYP2C11 na formação de 3'-HFFH e 4'-HFFH. A formação da 3,4'-HFFH ocorreu predominantemente por ação da CYP2C11, seguida pela CYP2C6.

De maneira geral, CYP2C9 e CYP3A4 atuam na biotransformação da fenitoína em humanos, sendo que em ratos estão envolvidas as isoformas CYP2C6 e CYP2C11. Pode-se observar a presença de uma isoenzima pertencente à mesma família entre essas espécies, indicando semelhança em uma das enzimas envolvidas, para a formação do metabólito 4'-HFFH.

Yamazaki *et al.*, (2001) e Komatsu *et al.*, (2000) mostraram quantitativamente a diferença na formação dos metabólitos incubando fenitoína com microsomas hepáticos de ratos e humanos. Em ratos o metabólito formado em maior quantidade foi o 3,4'-HFFH, seguido pelo 3'-HFFH e 4'-HFFH. Para esse último metabólito, a constante de velocidade de reação (K_m) foi igual 60 ± 8 mM e a velocidade máxima de metabolização ($V_{m\acute{a}x}$) foi de 202 ± 12 pmol/min/mg de proteína microsomal [33]. Em humanos, para o mesmo metabólito, que nessa espécie é majoritário, os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ obtidos foram de 9 ± 5 mM e 12 ± 1 pmol/min/mg de proteína microsomal.

Comparando-se as duas espécies pode-se observar que a velocidade de formação dos metabólitos foi significativamente maior em ratos, o que pode ser atribuído ao metabolismo acelerado em roedores em comparação com humanos. Sabe-se, por exemplo, que o fluxo sanguíneo hepático decresce quando se compara camundongos, ratos e humanos, reduzindo-se de 90, para 55, para 21 mL/min/kg, respectivamente, enquanto o tempo de filtração glomerular reduz-se de 14 para 9, para 1,8 mL/min/kg, respectivamente. Esses valores indicam uma velocidade de biotransformação e excreção de xenobióticos mais acelerada em roedores, o que é esperado em função do ciclo vital de cada espécie (Pateman & Schwartz, 2004).

Os resultados observados por Yamazaki *et al.*, (2001) e Komatsu *et al.*, (2000) corroboram os resultados publicados por Riley *et al.*, (1988), que avaliaram o metabolismo do fármaco utilizando microsomas hepáticos de humanos e de camundongos no qual observou-se uma maior velocidade de metabolização do fármaco nos microsomas de camundongos, com a formação de metabólito reativo, o que não foi observado em humanos. A não detecção do metabólito reativo na fração microsomal humana, provavelmente a quinona ou a semi-quinona obtidas nas últimas etapas da biotransformação do fármaco, pode estar relacionada com a menor velocidade na biotransformação da fenitoína em microsomas humanos.

Em relação à biotransformação da fenitoína em roedores e humanos pode-se concluir que os mesmos metabólitos são formados, por isoformas do CYP 450 distintas, com maior velocidade de formação em roedores. Essa diferença na velocidade de formação entre as espécies animais resulta em uma quantidade diferenciada de cada metabólito formado para um mesmo tempo de reação. No entanto, os resultados obtidos *in vitro* com microsomas de roedores foram capazes de prever a formação de espécie metabólica reativa, a qual só foi observada em humanos com o uso crônico do fármaco, fenômeno provavelmente relacionado a indução enzimática proporcionada pela fenitoína. A análise deste conjunto de dados indica que para a fenitoína, os estudos pré-clínicos são capazes de antecipar a formação de metabólitos reativos responsáveis pelas reações de hipersensibilidade em humanos, mesmo com a enzima responsável pela formação do metabólito sendo diferente entre as espécies.

3. Metabolização do Ácido Valpróico

O ácido valpróico (AV) é um fármaco anticonvulsivante com atividade antiepiléptica utilizado no tratamento de vários tipos de crise, ocasionando pouca sedação. Quimicamente é um ácido graxo de cadeia ramificada (Rall & Scheleifer, 1990). O AV é majoritariamente eliminado na forma de seus metabólitos na urina e nas fezes, sendo pequena a quantidade excretada de forma inalterada na urina. Em doses terapêuticas, a maior parte do AV é convertida no éster do ácido glicurônico, uma parte é biotransformada através de metabolismo mitocondrial (β ou ω -oxidação), provavelmente através do sistema enzimático mitocondrial endógeno de biotransformação de ácidos graxos (Levy, Wilensky & Anderson, 1992; Rall & Scheleifer, 1990). Outro mecanismo, provavelmente envolvendo o CYP 450, produz os metabólitos 3-OH-ácido valpróico (3-OH-AV), 4-OH-ácido valpróico (4-OH-AV), 5-OH-ácido valpróico (5-OH-AV), ácido 2-propil-2-pentenóico (2-en-AV), ácido 3-propil-2-pentenóico (3-en-AV), além do metabólito relacionado com hepatotoxicidade, o ácido 4-propil-2-pentenóico (4-en-AV), cujas estruturas são mostradas na Figura 2 (Rettie *et al.*, 1987; Rettie *et al.*, 1988; Schwartz & Pateman, 2004).

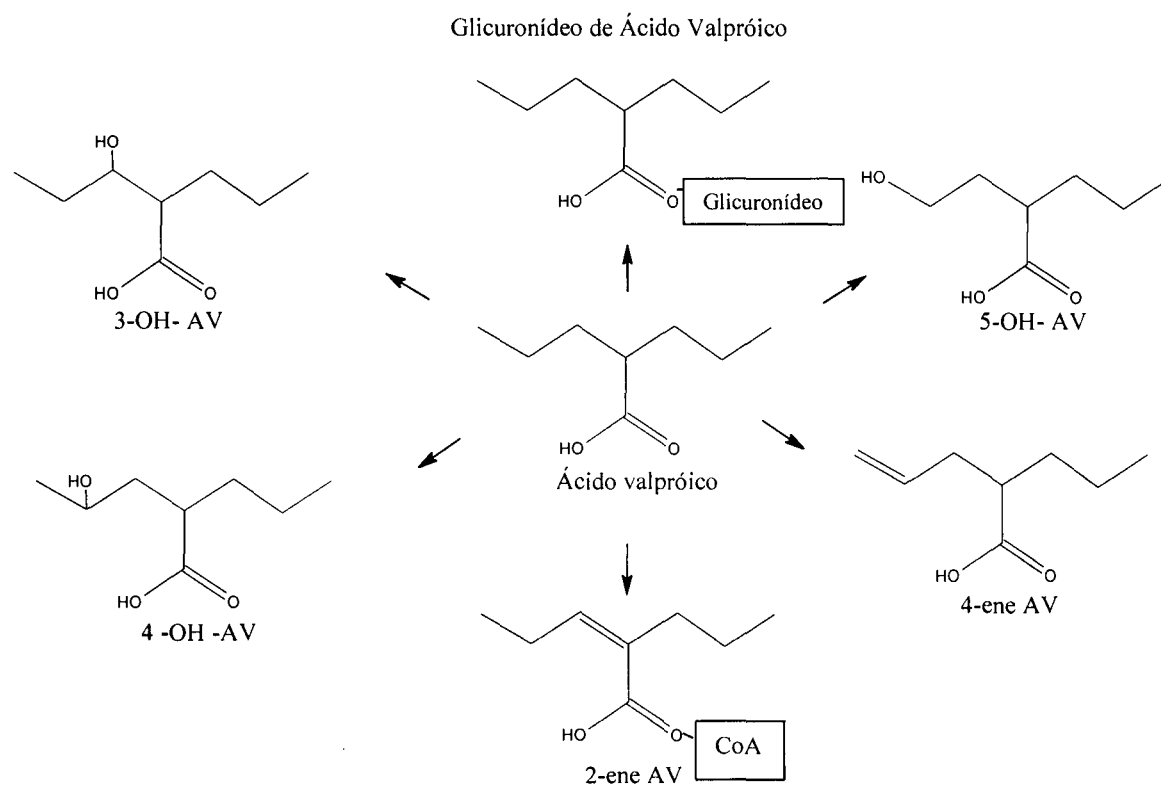


Figura 2. Biotransformação do ácido valpróico em humanos (Adaptado de Levy, Wilensky & Anderson, 1992).

O ácido 2-propil-2-pentenóico ou ácido 2-en-pentenóico possui potência semelhante ao ácido valpróico, acumulando-se no cérebro durante o tratamento prolongado do fármaco e atuando no acúmulo de GABA no sistema nervoso central. Desse modo, observa-se ação anticonvulsivante do AV mesmo quando não são detectadas concentrações plasmáticas do fármaco, provavelmente por ação desse metabólito em nível central (Ravindranath *et al.*, 1998).

Rettie *et al.*, (1987) identificaram metabólitos do AV a partir de experimentos em hepatócitos de ratos incubando microsomas hepáticos com o fármaco por 20 minutos. Os autores observaram a formação de 4-OH-AV na concentração de 8746 ± 893 pmol/nmol de CYP 450, 5-OH-AV na concentração de 771 ± 36 pmol/nmol de CYP 450, 4-en-AV na concentração de 84 ± 8 pmol/nmol de citocromo CYP 450, sendo que o 3-OH-AV não foi detectado pelo método. Experimento semelhante foi realizado com microsomas humanos por Sadeque *et al.*, (1997), obtendo-se formação de 4-OH-AV (1390 ± 76 pmol/nmol de CYP 450), 5-OH-AV (723 ± 80 pmol/nmol de CYP 450) e 4-en-AV ($78 \pm 8,6$ pmol/nmol de CYP 450). A presença de outros metabólitos não foi investigada (Rettie *et al.*, 1987). Embora as quantidades absolutas encontradas em ratos sejam maiores que a humana para o metabólito 4-OH-AV, devido a fatores anteriormente comentados, para os metabólitos 5-OH-AV e 4-en-AV a mesma quantidade formada foi encontrada entre as espécies. A formação do metabólito hepatotóxico 4-en-AV poderia ter sido predita com o estudo pré-clínico da espécie roedora. A mesma ordem de formação também é observada em termos de quantidade de cada metabólito formado entre humanos e ratos (4-OH-AV > 5-OH-AV > 4-en-AV).

Rettie *et al.*, (1988) também avaliaram a formação do metabólito hepatotóxico 4-en-AV em microsomas hepáticos de ratos machos *Sprague-Dawley*, de camundongos fêmeas da espécie BALB-C, de coelhos fêmeas da espécie *New Zealand White* e de humanos, incubando-se o fármaco por 15 minutos. A quantidade de metabólito formada em coelhos foi de $44,2 \pm 2,7$ pmol/nmol CYP 450, em camundongos foi $18,3 \pm 3,1$ pmol/nmol CYP 450, em humanos $24,6 \pm 7,7$ pmol/nmol CYP 450 e em ratos foi $12,8 \pm 1,0$ pmol/nmol CYP 450. Pode-se observar a quantidade de 4-en-AV formado foi próxima entre camundongos e humanos, indicando que para esse metabólito, os estudos com hepatócitos de camundongos foram capazes de produzir o mesmo metabólito obtido em reações na presença de hepatócitos humanos e em quantidades semelhantes.

Fisher *et al.*, (1998) estudaram o metabolismo do ácido valpróico em microsomas hepáticos de ratos fêmea da espécie *Sprague-Dawley*, em microsomas de humanos e de coelhos da espécie *New Zealand White*. Após a incubação dos microsomas com a substância pregnenolona-16- α -carbonitrila-PCN (indutora de CYP3A) em ratos, foram detectados os metabólitos 3-OH-AV (maior quantidade), 4-OH- e 5-OH-AV, 3-en-AV e 4-en-AV. Não ocorreu formação significativa de 3-en-AV e 4-en-AV em microsomas hepáticos de humanos e de coelhos e em microsomas de fígado de coelhos induzidos com rifampicina (indutor de CYP3A). A formação de 3-en-AV em ratos da espécie *Sprague-Dawley* indica o envolvimento da CYP3A na rota de metabolização do ácido valpróico nessa espécie animal.

Com o intuito de confirmar a participação da isoenzima no metabolismo do ácido valpróico, a CYP3A1 dos ratos foi inserida em baculovírus e incubada com AV. Observou-se a formação dos metabólitos 3-OH-AV ($19,3 \pm 1,5$ nmol/nmol/h), 4-OH-AV ($4,3 \pm 1,0$ nmol/nmol/h), 5-OH-AV ($0,76 \pm 0,04$ nmol/nmol/h), 3-en-AV ($0,38 \pm 0,04$ nmol/nmol/h) e 4-en-AV ($0,12 \pm 0,01$ nmol/nmol/h), confirmando os dados observados nos microsomas e mostrando o envolvimento específico da CYP3A1 nessa biotransformação.

Sadeque *et al.*, (1997) avaliaram as enzimas envolvidas na biotransformação do AV no seu metabólito 4-en-AV em humanos. As enzimas recombinantes CYP1A2, CYP2C8, CYP2C9, CYP2E1, CYP3A4 e CYP3A5 foram inseridas em cultura de células hepáticas HepG2 e incubadas com o fármaco. As enzimas que formaram quantidade detectável do metabólito reativo foram as CYP2C9 e CYP2A6. Na biotransformação do ácido valpróico foram verificadas semelhanças em relação à proporção dos metabólitos formados entre humanos e roedores. Quanto à enzima responsável pela formação do 4-en-AV, não foi observada semelhança. Em humanos, identificaram-se as isoformas CYP2C9 e CYP2A6, enquanto que em ratos, a CYP3A1 está envolvida (Fischer *et al.*, 1998). Em relação ao tempo de formação do metabólito reativo, os autores relatam que há maior velocidade em coelhos, seguida pelos camundongos, humanos e ratos. O conjunto desses dados indicam que as espécies roedoras são mais apropriadas para estudos de metabolismo desse fármaco, mesmo que a enzima metabolizadora seja diferente e as velocidades de formação sejam distintas entre as espécies.

4. Metabolização da Carbamazepina

A carbamazepina (CBZ) é um fármaco anticonvulsivante utilizado no tratamento da neuralgia do trigêmeo, crises tônico-clônicas generalizadas e em crises parciais ou complexas (Rall & Schleifer, 1990).

A biotransformação em humanos é catalisada pela CYP3A4 e em menor extensão pelo CYP2C8 resultando principalmente no seu metabólito ativo 10,11-epóxido-CBZ. Esse composto é tão ativo quanto o fármaco e está relacionado com casos de toxicidade durante o tratamento. O 10,11-epóxido-CBZ é metabolizado em moléculas inativas (33 metabólitos já foram identificados), que são eliminadas principalmente na urina na forma de glicuronídeos (Figura 3) (Egnell, Houston & Boyer 2003; Levy, Wilensky & Anderson, 1992; Rall & Schleifer, 1990).

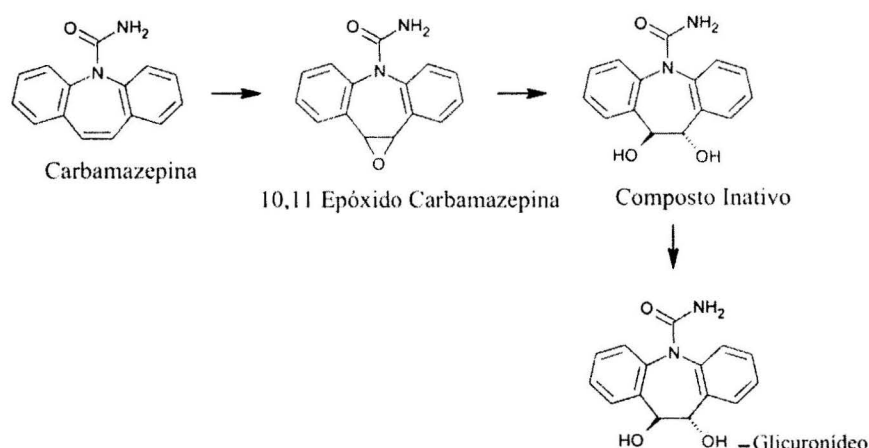


Figura 3. Biotransformação da carbamazepina em humanos (Adaptado de Levy, Wilensky & Anderson, 1992).

O metabolismo da CBZ em microsomas hepáticos de coelhos da espécie *New Zealand White* foi estudada por Mesdjian *et al.*, (1999). A avaliação da influência de diferentes indutores das enzimas CYP 450 na biotransformação do fármaco: troleandomicina, eritromicina e rifampicina (indutores de CYP3A), fenobarbital (indutor de CYP2B), 3-metilcolantreno (indutor de CYP1A1) demonstrou que após incubação dos microsomas com os indutores, apenas os indutores da subfamília CYP3A aumentaram o nível de formação do metabólito ativo.

Em experimento semelhante, mas com incubação concomitante do fármaco e substratos das enzimas CYP2D6 (debrisoquina), CYP1A (teofilina), CYP2C (hexobarbital) e CYP2E (anilina, dietil diclorocarbamato) não foi observada inibição do metabolismo da CBZ. Os inibidores da CYP3A (eritromicina, troleandomicina e nifedipino) inibiram a formação do epóxido. Posteriormente, incubou-se os microsomas com CBZ e um anticorpo da enzima CYP3A6. Observou-se inibição na formação do epóxido, indicando ser essa enzima a responsável pela formação do 10,11-epóxido-CBZ em coelhos. Desse modo, tanto em humanos como em coelhos a subfamília CYP3A está envolvida na metabolização da CBZ, sendo que a isoforma ativa em coelhos é a CYP3A6 e em humano, a CYP3A4.

Tateishi *et al.*, (1999) avaliaram o metabolismo da CBZ em ratos *Sprague-Dawley* submetidos ao tratamento com o fármaco durante 7 dias. Após o tratamento, os fígados foram removidos e as frações microsomais analisadas. Foram analisadas a indução das isoformas CYP1A, 2B, 2C6, 2C11, 2E1, e 3A2 por *Western blot*, *Northern blot* e imunoensaio. De maneira geral, todas as enzimas mostraram indução na presença de CBZ após o período de tratamento, com exceção da CYP2E1. Na análise dos RNAm, a enzima que apresentou maior aumento foi a CYP2B RNAm (quantidade 10 vezes maior em comparação com as outras enzimas estudadas). A indução em maior extensão pela CYP2B em ratos indica sua participação no metabolismo do fármaco, ao contrário do observado em coelhos e humanos, que realizam a biotransformação da carbamazepina através de enzimas da subfamília CYP3A.

Masubuchi *et al.*, (2001) incubaram microsomas hepáticos de ratos Wistar com carbamazepina e substâncias metabolizadas por isoformas específicas do CYP 450, no intuito de elucidar as enzimas envolvidas na biotransformação desse fármaco. Incubando-se carbamazepina e bunitrolol (metabolizado por CYP2D), observou-se inibição competitiva no metabolismo do bunitrolol, indicando que a metabolização da carbamazepina nesses animais ocorreria devido a alguma isoforma do CYP2D. Realizando-se o mesmo experimento com microsomas hepáticos humanos, mas incubando-se a carbamazepina com propranolol (metabolizado por CYP2D6) ou com N-desisopropilpropranolol (metabolizado por CYP1A2), observou-se inibição significativa no metabolismo do N-desisopropilpropranolol, indicando que a carbamazepina seria metabolizada pela CYP1A2. Nesse estudo, não se observou relação entre as isoenzimas envolvidas na metabolização da carbamazepina entre essas duas espécies indicando que o rato não é a espécie mais adequada para estudos pré-clínicos de metabolização desse fármaco.

Em ratos *Sprague-Dawley*, foi citada anteriormente a participação da CYP2B, em contraste com o envolvimento da CYP2D6 no metabolismo da carbamazepina em ratos Wistar. Essa diferença na enzima envolvida pode ser esperada, já que há relatos que mostram diferença no peso, tempo de vida e existência de tumores entre as duas espécies de ratos (Kishida *et al.*, 2008).

Os resultados desses estudos com diferentes espécies animais indicam que, de maneira geral, o coelho foi a espécie animal com maior semelhança metabólica com humanos, visto que em ambos há metabolismo via CYP3A. Ambas as espécies de ratos citadas não apresentaram semelhança no CYP metabolizador do fármaco e em relação a principal isoforma ativa em humanos (CYP3A4), apesar de ser a espécie animal mais utilizada em fase pré-clínica de desenvolvimento de fármacos.

5. Metabolização do Fenobarbital

O fenobarbital possui baixa toxicidade, custo e apresenta uma boa resposta clínica no tratamento da epilepsia (Rall & Schleifer, 1990). Em humanos é metabolizado através de p-hidroxilação no anel fenólico gerando seu principal metabólito, o derivado p-hidroxifenílico, que é inativo. Uma fração significativa do metabólito p-hidroxilado sofre glicuronidação. Essas duas vias de metabolização somam de 30 a 50% da dose administrada do fármaco. Outros metabólitos incluem a formação de dihidrodiol e hidroxilação alifática na cadeia etila (Figura 4).

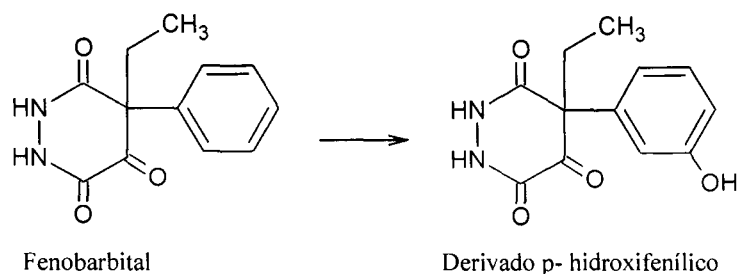


Figura 4. Metabolização do fenobarbital em humanos (Adaptado de Shaisho, Tanaka & Nakahara, 2001).

Para avaliar a atividade enzimática do fármaco em humanos, incubou-se testosterona com hepatócitos e também com porções de fígado. As atividades de testosterona 16 β e 6 β -hidroxilação foram determinadas como indicadores da atividade das enzimas CYP2B6 e CYP3A4, respectivamente. Ambas enzimas apresentaram indução tanto em hepatócitos como nas porções de fígado. Quanto à indução gênica, os genes responsáveis pela expressão dessas mesmas enzimas sofreram maior indução com o fenobarbital, indicando que elas influenciam o metabolismo do fármaco em humanos (Martin *et al.*, 2003).

Martignoni *et al.*, (2006) avaliaram o efeito do fenobarbital na expressão gênica das enzimas metabolizadoras em camundongos da espécie CD-1. Após tratamento por 3 dias com o fármaco, os fígados foram excisados e fatias do tecido foram incubadas a fim de se obter cultura de células dos órgãos. Após 24 horas de cultura, os RNAs das células foram retirados, amplificados por PCR e analisados. Foram analisados os genes: *cyp1a1*, *cyp1a2*, *cyp3a11* e *cyp2b10*. Observou-se aumento significativo da expressão gênica da enzima CYP2B10 e da CYP3A11 em menor extensão, indicando serem essas enzimas as responsáveis pelo metabolismo do fenobarbital em camundongos.

O metabolismo do fenobarbital foi avaliado por Makino *et al.*, (2009) em cães da raça *Beagle*. Nesse ensaio os animais foram tratados durante 14 dias com o fármaco, sacrificados e tiveram seus fígados removidos para análise genômica e proteômica. Foi observada a indução e expressão dos genes *cyp2B* e *3A* e através da análise por *Western-blot*, observou-se reação significativa entre os anticorpos anti-CYP2B11 e 3A12 e os microsomas, indicando serem essas as enzimas responsáveis pela biotransformação do fenobarbital em cães.

Quanto às diferenças de metabolização do fenobarbital entre as espécies investigadas, observa-se que as subfamílias envolvidas na biotransformação do fármaco são as mesmas para todas as espécies animais avaliadas (CYP2B e 3A). Apesar de não haver dados de literatura indicando a proporção de cada metabólito formada em cada espécie, os mesmos metabólitos são formados, com a participação das mesmas isoformas de CYP 450, indicado que qualquer das espécies estudadas (camundongos e cães) seria adequada para a previsão dos metabólitos do fármaco esperados em humanos.

6. CONCLUSÕES

Estudos pré-clínicos são necessários para a previsão do metabolismo de fármacos em humanos, entretanto, a seleção adequada da espécie animal para o estudo de metabolização pré-clínica deve ser criteriosa. Quando a espécie animal adequada é selecionada, os metabólitos que possuem potencial tóxico podem ser antecipados na fase pré-clínica, como observado para a fenitoína. A escolha incorreta da espécie animal, por outro lado, pode levar a previsões inadequadas em relação ao tipo de metabólito ou suas quantidades formadas. Para os fármacos anticonvulsivantes, embora semelhanças qualitativas e quantitativas tenham sido observadas em metabólitos formados entre as espécies animais e em humanos para o ácido valpróico e para a carbamazepina, não se pode estabelecer um consenso sobre qual a espécie mais adequada para prever metabólitos em humanos. Como alternativa ao uso de animais na etapa pré-clínica, a realização de estudos *in vitro* com tecidos humanos tem se mostrado promissora devido a previsibilidade dos resultados em relação a situação de uso do medicamento.

7. REFERÊNCIAS

- Benedetti MS. Enzyme induction and inhibition by new antiepileptic drugs: a review of human studies. *Fundam Clin Pharmacol.* 14(4):301-319, 2000.
- Cuttle L, Munns AJ, Hogg NA, Scott JR, Hooper WD, Dickinson RG, Gillam EM. Phenytoin metabolism by human cytochrome P450: involvement of P450 3A and 2C forms in secondary metabolism and drug-protein adduct formation. *Drug Metab Dispos.* 28(8):945-950, 2000.
- Egnell AC, Houston B, Boyer S. In vivo CYP3A4 heteroactivation is a possible mechanism for the drug interaction between felbamate and carbamazepine. *J Pharmacol Exp Ther.* 305(3):1251-1262, 2003.
- Fisher MB, Thompson SJ, Ribeiro V, Lechner MC, Rettie AE. P450-catalyzed in-chain desaturation of valproic acid: isoform selectivity and mechanism of formation of Delta 3-valproic acid generated by baculovirus-expressed CYP3A1. *Arch Biochem Biophys.* 356(1):63-70, 1998.
- Gehlhaus M, Schmitt N, Volk B, Meyer RP. Antiepileptic drugs affect neuronal androgen signaling via a cytochrome P450-dependent pathway. *J Pharmacol Exp Ther.* 322(2):550-559, 2007.
- Jurima-Romet M, Abbott FS, Tang W, Huang HS, Whitehouse LW. Cytotoxicity of unsaturated metabolites of valproic acid and protection by vitamins C and E in glutathione-depleted rat hepatocytes. *Toxicology* 112(1):69-85, 1996.
- Ketter TA, Frye MA, Corá-Locatelli G, Kimbrell TA, Post RM. Metabolism and excretion of mood stabilizers and new anticonvulsants. *Cell Mol Neurobiol.* 19(4):511-532, 1999.
- Kishida T, Muto S, Hayashi M, Tsutsui M, Tanaka S, Murakami M, Kuroda J. Strain differences in hepatic cytochrome P450 1A and 3A expression between Sprague-Dawley and Wistar rats. *J Toxicol Sci.* 33(4):447-457, 2008.
- Komatsu T, Yamazaki H, Asahi S, Gillam EM, Guengerich FP, Nakajima M, Yokoi T. Formation of a dihydroxy metabolite of phenytoin in human liver microsomes/cytosol: roles of cytochromes P450 2C9, 2C19, and 3A4. *Drug Metab Dispos.* 28(11):1361-368, 2000.
- Kubow S, Wells PG. In vitro bioactivation of phenytoin to a reactive free radical intermediate by prostaglandin synthetase, horseradish peroxidase, and thyroid peroxidase. *Mol Pharmacol.* 35(4):504-511, 1989.
- Levy RH, Wilensky AJ, Anderson GD. Carbamazepine, Valproic Acid, Phenobarbital, and Ethosuximide. In: Applied Pharmacokinetics: Principles of Therapeutic Drug Monitoring. 3. ed. Vancouver: Applied Therapeutics, p. 26.2-26.9, 1992.
- Makino T, Kinoshita J, Arakawa S, Ito K, Ando Y, Yamoto T, Teranishi M, Sanbuissho A, Nakayama H. Comprehensive analysis of hepatic gene and protein expression profiles on phenobarbital- or clofibrate-induced hepatic hypertrophy in dogs. *J Toxicol Sci.* 34(6):647-661, 2009.
- Martin H, Sarsat JP, de Waziers I, Housset C, Balladur P, Beaune P, Albaladejo V, Lerche-Langrand C. Induction of cytochrome P450 2B6 and 3A4 expression by phenobarbital and cyclophosphamide in cultured human liver slices. *Pharm Res.* 20(4):557-568, 2003.
- Martignoni M, de Kanter R, Grossi P, Saturno G, Barbaria E, Monshouwer M. An in vivo and in vitro comparison of CYP gene induction in mice using liver slices and quantitative RT-PCR. *Toxicol In Vitro.* 20(1):125-131, 2006.
- Mesdjian E, Séré E, Charvet B, Mirrione A, Bourgarel-Rey V, Desobry A, Barra Y. Metabolism of carbamazepine by CYP3A6: a model for in vitro drug interactions studies. *Life Sci.* 64(10):827-835, 1999.
- Masubuchi Y, Nakano T, Ose A, Horie T. Differential selectivity in carbamazepine-induced inactivation of cytochrome P450 enzymes in rat and human liver. *Arch Toxicol.* 75(9):538-543, 2001.
- Munns AJ, De Voss JJ, Hooper WD, Dickinson RG, Gillam EM. Bioactivation of phenytoin by human cytochrome P450: characterization of the mechanism and targets of covalent adduct formation. *Chem Res Toxicol.* 10(9):1049-1058, 1997.
- Rall TW, Schleifer LS. Drogas eficazes no tratamento das Epilepsias. In: Goodman & Gilman. Oitava Edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, p. 288- 304, 1990.
- Rettie AE, Boberg M, Rettenmeier AW, Baillie T. Cytochrome P-450-catalyzed desaturation of valproic acid in vitro. Species differences, induction effects, and mechanistic studies. *J Biol Chem.* 253(27):13733-13738, 1988.

- Rettie AE, Rettenmeier AW, Howald WN, Baillie TA. Cytochrome P-450--catalyzed formation of delta 4-VPA, a toxic metabolite of valproic acid. *Science* 235(4791):890-893, 1987.
- Riley RJ, Maggs JL, Lambert C, Kitteringham NR, Park BK. An in vitro study of the microsomal metabolism and cellular toxicity of phenytoin, sorbinil and mianserin. *Br J Clin Pharmacol.* 26(5):577-88,1988.
- Sadeque AJ, Fisher MB, Korzekwa KR, Gonzalez FJ, Rettie AE. Human CYP2C9 and CYP2A6 mediate formation of the hepatotoxin 4-ene-valproic acid. *J Pharmacol Exp Ther.* 283(2):698-703,1997.
- Schwartz S, Pateman T. Pre-clinical pharmacokinetics. *In: Evans G. A handbook of bioanalysis and drug metabolism.* 1. Ed. Boca Raton : CRC Press, 2004, Capítulo 7, p. 113-131.
- Schwartz S, Pateman T. Phase I Metabolism. *In: Evans G. A handbook of bioanalysis and drug metabolism.* 1. Ed. Boca Raton : CRC Press, 2004b, Capítulo 13, p. 208-221.
- Saisho K, Tanaka E, Nakahara Y. Hair analysis for pharmaceutical drugs. I. Effective extraction and determination of phenobarbital, phenytoin and their major metabolites in rat and human hair. *Biol Pharm Bull.* 24(1):59-64, 2001.
- Shargel L, Wu-Pong S, Yu A. Hepatic Elimination of drugs. *In: Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics.* Fifth Edition. New York: McGraw-Hill, 2005, Capítulo 11, p. 303-353.
- Shear NH, Spielberg SP. Anticonvulsant hypersensitivity syndrome. In vitro assessment of risk. *J Clin Invest.* 82(6):1826-1832, 1988.
- Somers G, Mutch R, Woondrooffe A. *In vitro* techniques for investigating drug metabolism. *In: Evans G. A handbook of bioanalysis and drug metabolism.* Boca Raton: CRC Press, 2004, Capítulo 15, p. 244-266.
- Tateishi T, Asoh M, Nakura H, Watanabe M, Tanaka M, Kumai T, Kobayashi S. Carbamazepine induces multiple cytochrome P450 subfamilies in rats. *Chem Biol Interact.* 12;117 (3):257-68, 1999.
- Yamazaki H, Komatsu T, Takemoto K, Saeki M, Minami Y, Kawaguchi Y, Shimada N, Nakajima M, Yokoi T. Decreases in phenytoin hydroxylation activities catalyzed by liver microsomal cytochrome P450 enzymes in phenytoin-treated rats. *Drug Metab Dispos.* 29 (4 Pt 1):427-34, 2001.