V. DISCUSSÃO

A epilepsia é uma das desordens neurológicas mais comuns, com uma prevalência mundial estimada em 50 milhões de doentes. O objectivo último da terapia antiepiléptica é direccionar o alvo das acções para a causa fundamental da epilepsia e prevenir a manifestação da síndrome epiléptica.

O sucesso da terapêutica antiepiléptica depende do tipo de convulsão e da severidade da síndrome epiléptica e, para cada caso, deve ser estabelecida uma terapia apropriada. As metas da terapêutica antiepiléptica podem ser consideradas a três níveis: controlo das convulsões, controlo da epilepsia e por último, a inversão do processo epileptogénico, ou seja, a "a cura da epilepsia" (PERUCA, 2002; STEINHOFF, 2003).

A terapêutica farmacológica permite um controlo das convulsões em cerca de 70% dos doentes, sendo os restantes 30% "difíceis de tratar" ou refractários à terapêutica tradicional (PERUCA, 2002; BIALER, 2002; WHITE, 2003).

Para minorar estas limitações, e como resultado do avanço da ciência em distintas áreas, o conhecimento dos mecanismos que contribuem para o início e propagação da actividade epiléptica coincidiu com o desenvolvimento de novos FAEs num passado recente a que se deu o nome de "Década do Cérebro" (PERUCA, 2002; STEINHOFF, 2003; FERRENDLY, 1995, 1999).

É de consenso geral que os doentes epilépticos deverão ser tratados com um único fármaco anticonvulsivante sempre que possível e na mínima dose eficaz (THOMSON, 1992; FERRENDELLI, 1999); porém nem sempre os resultados são os melhores, levando deste modo a uma terapia de associação de fármacos através da designada "politerapia racional", a qual surge como uma alternativa para o tratamento dos doentes refractários uma vez que as

possíveis associações podem constituir uma solução benéfica para estas situações de difícil tratamento (DECKERS, 2003).

A politerapia pode abordar a síndrome epiléptica em várias "frentes" usando fármacos com mecanismos de acção diversos permitindo actuar no controlo das convulsões a vários níveis: iniciação, propagação e manutenção; pode igualmente diminuir as probabilidades de ocorrência de efeitos adversos graves aquando da utilização do fármaco em monoterapia na dose máxima terapêutica tolerada. Então, para que se possa tirar o máximo partido da politerapia há que considerar a possibilidade da ocorrência de complexas interacções farmacológicas e/ou efeitos adversos graves, evitando que tal aconteça (FERRENDELLI, 1999).

A lamotrigina é um antiepiléptico de nova geração que apresenta um vasto espectro de eficácia, sendo bem tolerada pelos doentes.

A oxcarbazepina, é igualmente um fármaco antiepiléptico de segunda geração derivado da carbamazepina, tendo contudo um perfil farmacocinético menos complexo que esta (TECOMA, 1999; CLEMENS, 2004). A vasta utilização da carbamazepina na prática clínica em monoterapia e o comprometimento do seu uso em politerapia, devido ao seu comportamento farmacocinético (potencial de interacção elevado), levou-nos a considerar que as características da oxcarbazepina (potencial de interacção baixo) e a similaridade destes dois fármacos poderiam ser exploradas usando a oxcarbazepina em politerapia em vez da carbamazepina (PERUCCA, 1995; PATSALOS, 2002). O perfil metabólico da oxcarbazepina sugere que esta poderá originar menos interacções farmacológicas no homem em comparação com a carbamazepina (MATAR, 1999; LUSZCZKI, 2003a,d; CLEMENS, 2004).

Após consulta bibliográfica, este trabalho parece constituir a primeira

tentativa da avaliação da interacção da combinação entre a lamotrigina e a oxcarbazepina através teste do electrochoque máximo.

Por outro lado, a associação entre a lamotrigina e a oxcarbazepina é uma das cinco mais frequentemente utilizadas na prática clínica (SCHMIDT, 2002a).

O objectivo a que nos propusemos foi então proceder à avaliação da interacção da lamotrigina com a oxcarbazepina, uma vez que a interacção entre FAEs da nova geração não está ainda convenientemente explorada (CZUCZWAR, 2002; DECKERS, 2002).

Depois da pesquisa bibliográfica dos vários métodos disponíveis para induzir experimentalmente o complexo fenómeno que é a epilepsia e que simultaneamente permita o estudo da combinação dos fármacos, devidamente referenciados na introdução deste trabalho, optámos pelo teste do electrochoque máximo (DECKERS, 2000).

A escolha do modelo a ser seleccionado teria que respeitar, por um lado, o compromisso entre as características de um modelo ideal e, por outro, a necessidade de ser um modelo largamente validado e que pudesse ser tecnicamente exequível com os meios ao nosso dispor (LÖSCHER E SCHMIDT, 1988; WHITE, 2003).

Somos da opinião que este modelo experimental satisfaz os requisitos anteriormente mencionados. É, desde o seu aparecimento e desenvolvimento levado a cabo por Toman *et al.* (1946), um teste padrão no *screening* de potenciais novos antiepilépticos, continuando até aos nossos dias a ser considerado um dos primeiros testes a que se deve submeter qualquer potencial antiepiléptico; é um teste rápido, simples de executar, económico e em que quase todos os fármacos antiepilépticos *standard* e os de nova geração são efectivos; o *end-point* escolhido (abolição da *extensão tónica dos*

membros posteriores) é facilmente reconhecido e verifica-se uma elevada correlação entre a capacidade do fármaco inibir a *extensão tónica* em roedores (principalmente ratos e murganhos) suscitada no teste do electrochoque máximo e a sua eficácia clínica em crises generalizadas tónico-clónicas; permite que a capacidade do cérebro em manter uma "convulsão máxima" seja estudada, independentemente do limiar para as crises mínimas; apenas um electrochoque é aplicado por animal e por determinação, eliminando deste modo o efeito de choques subconvulsivos ou alterações devidas a convulsões mínimas não reconhecidas (TOMAN, SWINYARD E GOODMAN, 1946; BROWNING E NELSON, 1985; SWINYARD E KUPERBERG, 1985; LÖSCHER, FASSBENDER E NOLTING, 1990; LÖSCHER E WAUQUIER, 1996; LÖSCHER, 2002).

Da recolha bibliográfica efectuada facilmente se constata que diferentes investigadores, usando procedimentos aparentemente normalizados como seja o uso das mesmas espécies animais e idênticas doses de fármacos, apresentam resultados diferentes, o que leva a crer na existência de diversos factores técnicos, biológicos e farmacológicos condicionantes dos resultados experimentais. Assim, atendendo a que na literatura já estão referidos factores relacionados com os animais a utilizar como seja a idade, o sexo, a estirpe; as condições ambientais de alojamento como sejam: temperatura, humidade; a dieta a que são submetidos, o seu ritmo circadiano, alterações sazonais, natureza da formulação e do veículo a utilizar na dissolução do fármaco, características do estímulo eléctrico, equipamento, (LÖSCHER, FASSBENDER E NOLTING, 1991; LÖSCHER E FIEDLER, 2000; LÖSCHER, 2002a; WHITE, 2003), tentámos optimizar uma técnica experimental, entrando em linha de conta com a maioria destes factores.

✓ **Selecção dos animais de experimentação**

Neste estudo toda a experimentação animal foi conduzida de acordo com as directivas da União Europeia e o projecto foi previamente aprovado pela Direcção Geral de Veterinária Portuguesa.

Das diversas espécies animais, os ratos e os murganhos são as espécies mais utilizadas nos estudos laboratoriais, envolvendo antiepilépticos. Todavia, Löscher e Schmidt (1988) defenderam que as doses activas dos fármacos anticonvulsivantes nos ratos, reflectiam melhor a sua potência clínica nos humanos. Face a estes factos, em todas as etapas do protocolo experimental foram utilizados ratos Wistar com idade superior a 6 semanas e com peso compreendido entre os 250 e 320 g, ficando dessa forma assegurada a maturação de todos os sistemas biológicos do animal. No nosso caso optámos por ratos machos, preferindo-os às fêmeas, com o objectivo de evitar a interferência do período de alterações endócrinas na excitabilidade cerebral (SWINYARD E KUPFERBERG, 1985).

Os animais, após a sua chegada, foram sujeitos a um período de quarentena durante uma semana, finda a qual foram imediatamente manipulados com o intuito de evitar a influência do aumento de idade no limiar de excitabilidade (WOODBURY E DAVENPORT, 1952; LÖSCHER, FASSBENDER E NOLTING, 1991); foram colocados em caixas de contenção, em grupos de cinco; mantiveram-se a uma temperatura constante de 21±2ºC, já que mudanças ambientais bruscas podem causar mudanças temporárias no limiar de excitabilidade (WOODBURY E DAVENPORT, 1952) e tiveram livre acesso à comida e à água. A presença de alimentos não interfere com a absorção da lamotrigina (COHEN, 1987) e oxcarbazepina (PERUCCA, 1999) para além de uma sub-alimentação poder induzir o prolongamento da

componente extensora da fase tónica e redução do limiar de excitabilidade, ou seja, induzir o aumento da severidade da crise suscitada no teste do elctrochoque máximo (SWINYARD, BROWN E GOODMAN, 1952). Só no momento da experimentação foi retirada, por breves instantes, a comida e a água, uma vez que poderiam contribuir para alterar o limiar de excitabilidade, que se pretende estável durante todo o protocolo experimental. Cada animal foi testado uma única vez, dado que a frequente indução de crises provoca uma elevação artificial do limiar de excitabilidade (WOODBURY E DAVENPORT, 1952). Todas as manipulações tiveram que ser rápidas de modo a provocar apenas uma perturbação mínima no dia a dia destes animais. Tentou evitar-se a interferência do ritmo circadiano e, deste modo, todas as manipulações foram realizadas no período da manhã.

Uma gota de anestésico (cloridrato de oxibuprocaína) foi colocada no saco conjuntival de todos os animais imediatamente antes da introdução dos eléctrodos corneais. Deste modo garantiu-se um adequado contacto eléctrico (BENES, 1999).

✓ **Selecção do aparelho de electrochoque**

O equipamento utilizado para a aplicação do teste do electrochoque máximo deve assegurar a aplicação de um estímulo constante que não sofra influência da impedância inerente a cada animal. Assim, um ponto a ter em consideração na aplicação do teste é a resistência interna do estimulador, que deverá ser escolhida em função da resistência externa do animal.

Normalmente essa resistência é de 5 kΩ, pelo que se costuma seleccionar uma resistência interna de 10 kΩ para o estimulador. Para além disso, um estimulador de corrente constante deve ser capaz de fazer um auto-ajuste da voltagem de modo a assegurar a aplicação do estímulo com a corrente efectivamente seleccionada (LÖSCHER E SCHMIDT, 1988; LÖSCHER, FASSBENDER E NOLTING, 1991).

O estimulador utilizado (Ugo Basile ECT unit 7801) baseia o seu princípio de funcionamento ao desenvolvido por Woodbury e Davenport (1952) e foi devidamente regulado a fim de se respeitarem as exigências referenciadas (BENES, 1999).

✓ **Intensidade e duração do estímulo eléctrico**

Desde que o teste do electrochoque máximo foi criado e desenvolvido por Toman, Swinyard e Goodman (1946) que a intensidade de 150mA foi sempre usada como intensidade padrão (BENES, 1999). Efectivamente, aqueles autores confirmaram que as crises induzidas por um estímulo eléctrico de intensidade de 150mA, duração de 0,2s e frequência de 60Hz são "máximas" e, em geral, "incrementos" na intensidade da corrente não alteram o padrão ou a duração da crise convulsiva em ratos. Tedeschi, Swinyard e Goodman (1946) bem como Laffan, Swinyard e Goodman (1957) chegaram às mesmas conclusões, pois, embora o aumento da intensidade da corrente se possa traduzir por ligeiras alterações nas componentes da fase tónica, ou seja, diminuir o período de flexão e aumentar o período de extensão, a duração total da crise não se altera já que aquelas duas componentes se relacionam reciprocamente. Zablocka e Esplin (1964) também estudaram qual era o

efeito (ou seja, se se verificava o aumento ou diminuição da percentagem de ratos extensores) obtido caso se procedesse ao aumento da intensidade da corrente de 150mA para 500 mA e os resultados que obtiveram não foram animadores.

A duração da estimulação, inicialmente proposta e utilizada por Toman *et a.l,* (1946) e posteriormente por outros cientistas, foi de 0,2 s (BENES, 1999). Todavia, Zablocka e Esplin (1964) e Browning e Nelson (1985), nos seus trabalhos, constataram que estímulos de longa duração são mais efectivos em activar as descargas paroxísticas do que os estímulos de curta duração. Face a estes dados preliminares, tentámos verificar qual o resultado obtido se se aumentasse a duração de 0,2 s para 0,5s. A percentagem de movimentos extensores aumentou consideravelmente; a maioria dos animais deixou de manifestar a componente clónica das crises e um não conseguiu recuperar, acabando por morrer. Perante este último facto optámos por seleccionar uma duração de estimulação de 0,2s.

✓ **Eléctrodos corneais**

Quando o teste do electrochoque máximo começou a ser largamente implantado em todos os laboratórios com estudos no âmbito da epilepsia e de novos antiepilépticos, eram utilizados preferencialmente os eléctrodos corneais. Depois, pouco a pouco (década de 70 e 80), foram sendo introduzidos também os eléctrodos transauriculares, havendo, na década de 80 (BROWNING E NELSON, 1985) e princípios da década de 90 (LÖSCHER, FASSBENDER E NOLTING, 1991), estudos que afirmaram que, embora os

eléctrodos corneais continuassem ainda a ser os mais utilizados, os eléctrodos transauriculares revelavam-se mais efectivos em suscitar crises tónicas.

As crises tónicas para além de serem mais facilmente induzidas, manifestavam-se mais severas. Segundo os autores referidos, a maior severidade das crises parece dever-se ao facto dos eléctrodos transauriculares activarem preferencialmente a região do tronco cerebral, onde se supõe que as crises tónicas têm o seu substracto anatómico. A estimulação através da córnea parece activar preferencialmente regiões frontais do cérebro, só activando mais tarde o tronco cerebral, se a intensidade do estímulo assim o permitir, daí resultando crises tónicas de menor severidade.

A estimulação transcorneal parece induzir crises menos severas, o que se traduz por aumento da latência para a extensão e diminuição da duração da extensão, ou seja, regista-se aumento da componente flexora e diminuição da componente extensora da fase tónica

A estimulação transauricular permite obter menor percentagem de ratos não extensores. Face ao exposto, começámos por tentar utilizar eléctrodos transauriculares. Todavia, a implementação da técnica mostrou-se completamente impossível com as condições laboratoriais disponíveis. Recorremos, pois, aos eléctrodos corneais, mostrando-se a técnica experimental após a sua optimização, fácil de executar e relativamente rápida, (WAMIL, 1994; BENES, 1999; LEBRE, 2004).

✓ **Selecção da via de administração**

Independentemente do antiepiléptico com que se esteja a trabalhar, a via parenteral deverá ser a primeira via de administração a ser seleccionada nos estudos pré-clínicos (LÖSCHER E SCHMIDT, 1988).

Assim, Castel-Branco (2002) nos estudos farmacocinéticos preliminares, optou pela via intraperitoneal, já que a elevada vascularização do peritoneu assegurava a incorporação do fármaco na circulação sistémica num curto espaço de tempo.

A oxcarbazepina foi administrada por via oral devido à formulação do fármaco em questão, suspensão oral, sendo então administrado por uma sonda gástrica que permitia a introdução do mesmo directamente no estômago do animal, como aliás, foi já utilizada por outros grupos de trabalho (WAMIL, 1994; MCLEAN, 1994; SCHMUTZ, 1994; BENES, 1999; MATAR, 1999).

✓ **Selecção da formulação e do veículo**

Utilizámos a solução aquosa de lamotrigina sob a forma de isotionato de lamotrigina. Após a dissolução, a solução aquosa deverá ser devidamente protegida da acção da luz, devendo-se este cuidado à fotossensibilidade manifestada pela lamotrigina (CASTEL-BRANCO, 2002).

Utilizámos ainda, a suspensão oral de Oxcarbazepina diluída em água destilada até à obtenção da dosagem pretendida.

✓ **Selecção das doses**

Os estudos farmacocinéticos preliminares foram realizados com a administração de lamotrigina em 3 doses: 5, 10 e 20 mg/kg. Todavia, a dose de 10 mg/kg já tinha sido referida por Wheatley e Miller (1989) como a dose que desencadeia uma resposta anticonvulsivante no rato, para além do facto desta dose parecer proporcionar a obtenção de níveis plasmáticos nos ratos semelhantes à margem terapêutica proposta para os doentes epilépticos (CASTEL-BRANCO, 2002; LEBRE, 2004). Quanto à oxcarbazepina, face à bibliografia consultada, as doses utilizadas foram de 2,5; 10; 15; 20; 30 e 50 mg/kg (KUBOVA, 1993).

✓ **Determinação do "Time of peak drug effect"**

A determinação do "Time of peak drug effect" deverá ser determinado o mais cedo possível, nos estudos pré-clínicos, a fim de evitar falsas conclusões em diferentes modelos animais. Uma vez determinado pelo teste do electrochoque máximo, o fármaco em estudo deverá ser sempre testado nesse ponto, qualquer que seja o modelo experimental seleccionado (SWINYARD, BROWN E GOODMAN, 1952; LÖSCHER E SCHMIDT, 1988).

Este dado foi obtido pela bibliografia consultada para a oxcarbazepina (BENES, 1999) e para a lamotrigina através dos estudos realizados por Lebre (2003). O tempo para atingir o efeito anticonvulsivante máximo ocorre 2 horas após administração dos fármacos.

O protocolo experimental para o método isobológrafico foi dividido em quatro etapas:

1) Ensaio em branco

2) Avaliação da actividade anticonvulsivante da lamotrigina

3) Avaliação da actividade anticonvulsivante da oxcarbazepina

4) Análise isobológrafica

4.1.) Avaliação da actividade anticonvulsivante das razões fixas da associação entre a lamotrigina e a oxcarbazepina

4.2.) Isobolograma

1. Ensaio em branco

Algumas estirpes animais podem manifestar-se refractárias ao electrochoque e não apresentar a extensão tónica dos membros posteriores (ZABLOCK E ESPLIN, 1964). Atendendo a que todos os animais a utilizar no protocolo experimental terão que apresentar essa componente da fase tónica de uma forma expressiva (trata-se de um fenómeno de "tudo ou nada"), tivemos que realizar o teste em branco antes da administração do fármaco em estudo.

O teste em branco consistiu, então, em três ensaios realizados com 48 horas de intervalo (SWINYARD, BROWN E GOODMAN, 1952; BROWNINIG E NELSON, 1985; RAMZAM E LEVY, 1989; BENES, 1999) e nos quais os animais receberam, de uma só vez, choques eléctricos (150 mA de intensidade, 60 Hz de frequência, 0,6ms de amplitude durante 0,2 s), através de eléctrodos corneais (BENES, 1999). Segundo Woodbury e Davenport (1952), é extremamente importante que seja respeitado este intervalo entre os choques, a fim de evitar a alteração do limiar de excitabilidade.

Como a intensidade da corrente aplicada é muito superior ao limiar de excitabilidade dos animais, não tivemos que nos preocupar com as flutuações diárias daquele parâmetro, servindo então, cada animal, como o seu próprio controlo. Há ainda a referir que caso os animais sejam manipulados de acordo com as directivas europeias, o limiar de excitabilidade pode considerar-se praticamente constante (LOSCHER, FASSBENDER E NOLTING, 1991). Para além da ocorrência ou não de extensão tónica (fenómeno de "tudo ou nada"), registou-se a duração das fases tónica e clónica, sendo intenção deste procedimento a eventual comparação em etapas posteriores do projecto de investigação em curso. Efectivamente, estas avaliações adicionais

servem para esclarecer qual o efeito dos fármacos em estudo em cada uma das fases, já que estas informações podem eventualmente ser úteis na caracterização do mecanismo de acção (NOVACK, STARK E PETERSON, 1978).

Os ratos começaram por apresentar uma fase tónica composta por uma componente de flexão e posteriormente por extensão. Os animais apresentaram flexão dos membros com ligeiro tremor a que se seguiu a extensão dos membros posteriores. A fase tónica considerou-se concluída, quando ocorreu um relaxamento abrupto da musculatura e os animais começaram a respirar. O clónus rapidamente se iniciava e propagava por todo o corpo do animal. Terminada esta fase clónica, seguia-se um período de depressão que antecedia a recuperação completa do animal. É de referir a ausência de crises recorrentes, mesmo após a ocorrência de severas crises tónico-clónicas. Os animais que não apresentaram estas duas fases perfeitamente definidas eram excluídos (BENES, 1999).

Com a estimulação "supra-máxima" é induzida a extensão tónica; todos os circuitos neuronais capazes de contribuir para a descarga eléctrica são activados ao máximo e a convulsão, uma vez iniciada, não pode ser modificada (TOMAN, SWINYARD E GOODMAN, 1946). Admite-se que, ao ocorrer a extensão tónica, ocorre a máxima dissipação de energia de que o cérebro é capaz. Os animais que apresentaram somente crises clónicas e que, por isso, foram excluídos, recuperaram muito mais rapidamente do que os animais que apresentaram as duas fases perfeitamente definidas (BENES, 1999).

2. Avaliação da actividade anticonvulsivante da Lamotrigina

A potência anticonvulsivante da lamotrigina foi avaliada através da determinação da dose capaz de suprimir as crises tónicas em 50% dos animais (DE_{50}) (DALBY E NIELSON, 1997). Para o efeito, apenas os animais que ao serem submetidos ao teste em branco exibiram consistentemente a extensão tónica dos membros posteriores em três ensaios preliminares, realizados em dias separados, foram seleccionados (SWINYARD, BROWN E GOODMAN, 1952; BROWNING E NELSON, 1985; RAMZAM E LEVY, 1989).

Os animais foram seguidamente divididos em grupos de 10. A cada grupo foi administrado uma dose diferente (1; 3; 4,5; 6 ou 10 mg/kg) e testado no pico de actividade anticonvulsivante, determinado em estudos anteriormente realizados (LEBRE, 2003). Assim, ao fim de 2 horas, após administração da LTG foi aplicado o electrochoque e a resposta de cada animal foi observada e registada. Analisando os resultados da Tabela **R**.1 constatou-se que a dose de 1 mg/kg não induziu nenhum nível de protecção. À medida que a dose foi aumentando o nível de protecção aumentou até se atingir 100% de animais protegidos com a dose de 10 mg/kg. Representando graficamente estes resultados e colocando em abcissas as doses e em ordenadas a percentagem de animais protegidos, obtivemos uma curva dose-efeito sigmóide (SCHWINGHAMMER, 1988; LEBRE, 2004) (Figura R.1). O estudo de regressão não-linear utilizando o **modelo sigmoidal E_{max}.**, recorrendo a um programa informático adequado (WinNonlin®) (SCHWINGHAMMER, 1988; LEBRE, 2004), proporcionou um parâmetro farmacodinâmico DE_{50} de 4,2 mg/kg.

O valor de DE_{50} obtido está dentro do intervalo de valores registados por outros autores, usando outras doses, outras vias de administração, outras espécies animais e/ou outro equipamento. Assim, os valores médios mais baixos de DE_{50} encontrados por Miller *et al.,* foram determinados 1 hora após a administração oral da lamotrigina e são de 2,6 mg/kg e 1,9 mg/kg para murganhos e ratos, respectivamente (MILLER, 1986). A potência anticonvulsivante da lamotrigina após a sua administração por diferentes vias revelou-se semelhante: em ratos, os valores de DE_{50} são de 2,0; 2,4; 3,6 e 3,0 mg/kg 2 horas após administração oral, subcutânea e intraperitoneal e 1 hora após administração endovenosa, respectivamente (MILLER, 1986a,b). Graves e Leppik (1991) numa pesquisa referem a variação do DE_{50} em aproximadamente 2 a 4 mg/kg. Rataud *et al*. (1994) referem valores de DE_{50} de 4,4 mg/kg (murganhos) e 3,1 mg/kg (ratos) 30 min após a administração intraperitoneal de lamotrigina. Dalby e Nielsen (1997) referem o valor de 36 μmol/kg (9,2 mg/kg) para o DE_{50} em murganhos 2 horas após a administração intraperitoneal de lamotrigina. Luszczki *et al*. (2003b) referem valores de DE_{50} de 4,4 mg/kg (3,1-6,2 mg/kg) em murganhos 1 hora após administração intraperitoneal de lamotrigina. Borowicz (2002) refere valores de DE_{50} de 5,1 mg/kg (3,7-6,6 mg/kg) em murganhos 1 hora após administração intraperitoneal de lamotrigina.

3. Avaliação da actividade anticonvulsivante da Oxcarbazepina

Da mesma forma que para a lamotrigina, a potência anticonvulsivante da oxcarbazepina foi avaliada através da determinação da dose capaz de suprimir as crises tónicas em 50% dos animais (DE_{50}) (DALBY E NIELSON, 1997). Para o efeito, apenas os animais que ao serem submetidos ao teste em branco exibiram consistentemente a extensão tónica dos membros posteriores em três ensaios preliminares, realizados em dias separados, foram seleccionados (SWINYARD, BROWN E GOODMAN, 1952; BROWNING E NELSON, 1985; RAMZAM E LEVY, 1989).

Os animais foram seguidamente divididos em grupos de 10. A cada grupo foi administrado uma dose diferente (2,5; 10; 15; 20; 30 ou 50 mg/kg) e testado no pico de actividade anticonvulsivante, determinado em estudos anteriormente realizados (BENES, 1999). Assim, ao fim de 2 horas, após administração de OXC, foi aplicado o electrochoque e a resposta de cada animal foi observada e registada. Analisando os resultados da Tabela **R**. 3 constatou-se que a dose de 2,5 mg/kg não induziu nenhum nível de protecção. À medida que a dose foi aumentando o nível de protecção aumentou até se atingir 100% de animais protegidos com a dose de 50 mg/kg. Representando graficamente estes resultados e colocando em abcissas as doses e em ordenadas a percentagem de animais protegidos, obtivemos uma curva dose-efeito sigmóide (SCHWINGHAMMER, 1988; LEBRE, 2004) (Figura **R**.2). O estudo de regressão não-linear utilizando o **modelo sigmoidal E_{max}**, recorrendo a um programa informático adequado (WinNonlin®)

(SCHWINGHAMMER, 1988; LEBRE, 2004), proporcionou um parâmetro farmacodinâmico DE_{50} de 21,1 mg/kg.

O valor de DE_{50} obtido está dentro do intervalo de valores registados por outros autores, usando outras doses, outras vias de administração, outras espécies animais e/ou outro equipamento. Schmutz *et al.* (1994) referem valores de DE_{50} entre 13,5 e 20,5 mg/kg, em ratos e murganhos, após administração oral de oxcarbazepina e do seu metabolito humano monohidroxi MHD. Tecoma (1999) refere que tanto a oxcarbazepina e o seu metabolito activo (MHD) demonstraram eficácia sem sedação no teste do electrochoque máximo numa gama de doses entre 10 a 20 mg/kg (DE_{50}) após administração por via oral. Luszczki *et al.* (2003a) referem valores de DE_{50} de 10.6 mg/kg (8,8-12,8 mg/kg) em murganhos 30 minutos após administração intraperitoneal da oxcarbazepina. Luszczki e Czuczwar (2003d) referem valores de DE_{50} de 9,9 mg/kg (8,2-12,0 mg/kg) em murganhos 30 minutos após administração intraperitoneal da oxcarbazepina. Benes (1999) nas suas experiências obteve um valor de DE_{50} de 10±1,9 mg/kg em ratos 2 horas após administração oral de oxcarbazepina. Wamil *et al.* (1994) referem valores de DE_{50} de 14 (9-20) e 13,5 (6-18) mg/kg no teste do electrochoque máximo em murganhos e ratos, respectivamente, após administração oral Mclean *et al.,* (1994) referem valores de DE_{50} de 10-20 mg/kg p.o..

4. Análise Isobológrafica

4.1. Avaliação da actividade anticonvulsivante das razões fixas da associação entre a lamotrigina e a oxcarbazepina.

A eficácia da combinação em politerapia pode depender da razão fármaco:fármaco, motivo pelo qual é importante ponderar e fundamentar farmacologicamente a escolha das doses a combinar (SHANK, 1994).

A potência anticonvulsivante da combinação entre a lamotrigina e a oxcarbazepina foi avaliada através da determinação da dose capaz de suprimir as crises tónicas em 50% dos animais (DE_{50}) (DALBY E NIELSON, 1997). Para o efeito, apenas os animais que ao serem submetidos ao teste em branco exibiram consistentemente a extensão tónica dos membros posteriores em três ensaios preliminares, realizados em dias separados, foram seleccionados (SWINYARD, BROWN E GOODMAN, 1952; BROWNING E NELSON, 1985; RAMZAM E LEVY, 1989).

Os animais foram seguidamente divididos em grupos de 10. A cada grupo foi administrado uma dose correspondente a uma razão fixa dos fármacos LTG:OXC [1:1 (2,12 mg/kg:10,57 mg/kg), 3:1 (3,17 mg/kg:5,29 mg/kg), 1:3 (1,06 mg/kg:15,86mg/kg)], e testado no pico de actividade anticonvulsivante (2 horas), determinado em estudos anteriormente realizados (BENES, 1999; VERA, 2004). Assim, ao fim de 2 horas, após administração da associação LTG:OXC, foi aplicado o electrochoque e a resposta de cada animal foi observada e registada.

Analisando os resultados verificamos que o nível de protecção para qualquer das razões utilizadas produziu o mesmo grau de protecção, ou seja

50%. Devido à concordância dos resultados nas três razões fixas de doses utilizadas, não houve necessidade em explorar proporções adicionais da dose (LUSZCZKI, 2003d).

4.2. Isobolograma

No presente estudo, para visualizar o tipo de interacção entre a lamotrigina e a oxcarbazepina os resultados foram apresentados graficamente através de um isobolograma.

Os isoboles foram desenhados ao extrapolar os pontos relativos às respectivas doses de LTG (no eixo dos XX) e de OXC (no eixo dos YY). A linha que liga os dois valores de DE_{50} dos fármacos em questão, administrados isoladamente, contra o teste do electrochoque máximo, representa o isobole teórico de aditividade. Os pontos determinados experimentalmente, que reflectem a combinação de várias razões de doses fixas, colocam-se sob o isobole de aditividade demonstrando desta forma, uma interacção aditiva.

Os resultados estão de acordo com os pressupostos propostos por Deckers (2000) o qual refere que uma interacção sinérgica é mais provável que ocorra quando se combinam dois fármacos com mecanismos de acção diferentes, sendo a interacção aditiva a mais esperada quando os fármacos combinados partilham o mesmo mecanismo de acção ou pelo menos o mais importante.

No nosso caso tanto a lamotrigina como a oxcarbazepina têm o seu principal mecanismo de acção ao nível do bloqueio dos canais de sódio. É contudo provável que a diversidade de actividade anticonvulsivante destes

bloqueadores dos canais de Na^+ resultem de uma interacção farmacodinâmica entre estes FAEs (LUSZCZKI, 2003b). Assim, as diferenças nas interacções entre os bloqueadores dos canais de Na^+ podem ser explicadas pela diferente afinidade da lamotrigina, carbamazepina e oxcarbazepina aos locais de ligação no complexo dos canais de Na^+, ou pela existência de diversos canais de Na^+ com elevada afinidade para a carbamazepina (LUSZCZKI, 2003b).

De acordo com os resultados obtidos, a associação entre a lamotrigina e a carbamazepina ou oxcarbazepina pode ser clinicamente interessante em doentes com crises refractárias, no entanto, a associação entre a lamotrigina e a carbamazepina possui uma componente farmacocinética indesejável, uma vez que se verifica um aumento do primeiro metabolito da carbamazepina (epóxido), que pode resultar na ocorrência de sintomas neurotóxicos incluindo cefaleias, náuseas, ataxia (PATSALOS, 2002; SCHMIDT, 2002a; LUSZCZKI, 2003b; CLEMENS, 2004). Luszczki (2003b) demonstrou um distinto antagonismo para a associação entre a LTG e a CBZ no teste do electrochoque máximo em murganhos. Assim a substituição da carbamazepina pela oxcarbazepina nesta associação pode ser vantajosa face ao perfil farmacocinético da oxcarbazepina e da lamotrigina (CLEMENS, 2004).

De facto, as evidências indicam que certas interacções farmacocinéticas podem mascarar o exacto tipo de interacção entre os FAEs, e o facto de se ignorar os eventos farmacocinéticos pode levar a interpretações erradas e/ou conclusões falsas sobre as interacções observadas. Desta forma, o carácter farmacocinético da interacção deve ser sempre excluído ou confirmado em cada estudo isobológrafico (LUSZCZKI, 2003b,d).

Deve ser referido que a extrapolação directa dos resultados obtidos nos estudos experimentais em animais para a prática clínica não é possível.

Porém, resultados preliminares quanto a estas interacções farmacodinâmicas em modelos animais podem ajudar ou sugerir aos clínicos a melhor escolha para a associação de FAEs no tratamento mais eficaz dos doentes com epilepsia refractária (Tabela D. 1.) (LUSZCZKI, 2003a,b,c,d).

Tabela D. 1.
Associações de FAEs frequentemente usadas na base de dados da prescrição farmacológica Holandesa.

Combinações Frequentemente utilizadas	Frequência (%)
OXC + LTG	2,1
VPA + LTG	2,1
PB + CBZ	1,7
PB + PHT	1,3
CBZ + LTG	1,3
PB + OXC	1,1
CBZ + VPA	0,9
CBZ + OXC	0,7
CBZ + CLZP	0,7
OXC + VPA	0,6
OXC + VGB	0,6
	Adaptado de Deckers, 2002.

As evidências sugerem que a politerapia racional para a epilepsia refractária deve considerar pelo menos dois aspectos: os resultados obtidos nos estudos experimentais em animais (DECKERS, 2000; CZUCZWAR, 2002; LUSZCZKI, 2003a,b,c,d) e as considerações teóricas relativamente ao mecanismo de acção dos fármacos em associação (PERUCCA, 1995; LUSZCZKI, 2003a,b,c,d). É óbvio que "qualquer" racionalidade terá depois de ser comprovada directamente a partir dos ensaios clínicos. No entanto, testar numa primeira fase uma associação de fármacos em doentes é pouco recomendável de um ponto de vista ético, daí a importância deste tipo de estudos.