III. MATERIAL E MÉTODOS

1. DESENHO EXPERIMENTAL

1.1. MATERIAL

1.1.1. ANIMAIS

Os estudos foram conduzidos em ratos Wistar adultos, machos, com peso compreendido entre 250-320g (Harlan Ibérica, Barcelona, Portugal) (BENES, 1999). Os animais foram colocados em caixas de contenção em grupos de cinco. Os animais encontravam-se alojados em armários biotério, a uma temperatura constante de 21±2ºC, com sistema de ventilação e humidade adequado à espécie e ciclos de luz claro-escuro de 12 horas. Não foi condicionado o livre acesso à água e ao alimento, excepto durante o protocolo experimental. Todo o procedimento experimental seguiu as normas impostas pela Portaria 1005/92. O protocolo experimental foi previamente aprovado pela Direcção Geral da Veterinária Portuguesa.

1.1.2. FÁRMACOS UTILIZADOS

Isotionato de lamotrigina, gentilmente cedido pelos Laboratórios Wellcome Research (Cardiff; UK); Oxcarbazepina em suspensão oral a 60 mg/ml (Trileptal®, Novartis Farmacêutica, S.A., Barcelona, Espanha); Cloridrato de Oxibuprocaína (Oftalder, Oeiras, Portugal).

Os fármacos em estudo foram diluídos em água destilada (recentemente obtida), imediatamente antes de serem utilizados.

1.1.3. OUTROS MATERIAIS

A indução de estados convulsivos foi conseguida com recurso ao estimulador Ugo basile ECT unit 7801 (Itália) apetrechado com eléctrodos corneais (BENES, 1999). Durante as experiências o investigador esteve devidamente protegido, usando, para o efeito, luvas "anti-choque" e todo o chão envolvente estava revestido com tapetes de borracha anti-derrapantes e anti-choque.

1.2. MÉTODOS

1.2.1. Teste do electrochoque máximo (*maximal electroshock seizure* – MES - *test*).

O teste do electrochoque máximo *(MES test*), desenvolvido por Toman, Swinyard e Goodman, (1946), constitui talvez, o modelo experimental agudo melhor validado para crises generalizadas tónico-clónicas, mimetizando o quadro clínico humano denominado de "grande mal" (LÖSCHER E SCHMIDT, 1988; SWINYARD, 1998; LÖSCHER, 2002). Neste modelo os animais, normalmente ratos ou murganhos, recebem um estímulo eléctrico com intensidade suficiente (5 a 10 vezes superior ao seu limiar de excitabilidade) para induzir a extensão tónica dos membros posteriores (Hind Limb Extension, *HLE*), sendo esta resposta considerada como positiva

(LÖSCHER E SCHMIDT, 1988). A capacidade do fármaco para abolir a extensão tónica dos membros posteriores no teste do electrochoque máximo indica a sua potencial utilidade em reduzir ou mesmo impedir a propagação das crises (LÖSCHER, FASSBENDER E NOLTING, 1991). Quando este modelo é utilizado para avaliação da potência anticonvulsivante de determinados fármacos, estes são administrados aos animais, sendo a actividade anticonvulsivante avaliada em função da sua capacidade de protecção em relação ao estímulo recebido. O teste é simples, económico e de grande aplicabilidade, uma vez que quase todos os FAEs – quer os clássicos quer os de nova geração – respondem a ele, e embora Meldrum (1997) refira que o teste do electrochoque máximo se correlaciona claramente com fármacos que actuam através dos canais de sódio, Lösher e Wauquier (1996) recordam que a maioria dos antiepilépticos clássicos e de nova geração são eficazes neste modelo, mesmo quando actuam por diferentes mecanismos de acção, dependendo o resultado apenas do modo como se realiza o teste; este facto permite a quantificação da potência anticonvulsiva de diversos FAEs e a consequente comparação entre eles. Deste modo, o MES, é considerado como teste padrão no screening de novos antiepilépticos.

Na Tabela M. 1. estão resumidas as condições experimentais comuns às diferentes etapas deste protocolo experimental (BENES, 1999).

Tabela M. 1.

Resumo das condições experimentais comuns a todas as etapas do protocolo experimental.

Animais	Estimulador	Eléctrodos	Frequência	Amplitude	Duração	Corrente
Ratos Wistar	Ugo Basile ECT unit 7801	Corneais	60 *Hz*	0,6 *ms*	0,2 *s*	150 *Ma*

1.2.2. ENSAIO EM BRANCO

O ensaio em branco caracteriza-se pela realização de todos os passos de uma técnica experimental sem administração do fármaco em estudo. No nosso caso em particular, atendendo a que o protocolo experimental do teste do electrochoque máximo (*MES*) exige a prévia selecção dos animais a utilizar na experiência, o ensaio em branco consistiu em três ensaios preliminares, realizados com 48 horas de intervalo, e apenas os animais que exibiram consistentemente a extensão tónica dos membros posteriores, nestes ensaios, foram utilizados nas etapas posteriores.

Imediatamente antes da colocação dos eléctrodos, uma gota de cloridrato de oxibuprocaína foi colocada no saco conjuntival de todos os ratos.

Durante a convulsão os animais foram devidamente observados, a fim de se verificar a presença ou ausência da extensão tónica dos membros posteriores (*HLE*), sendo esta resposta considerada como positiva (*end-point*). O teste era considerado positivo se, num período de 10 segundos após a estimulação, o animal atingisse a extensão tónica dos membros posteriores (num ângulo superior a 90º em relação ao corpo do animal durante mais de 3 segundos) ou a extensão completa dos membros posteriores que terminava quando estes ficavam perpendiculares ao corpo. Registou-se a duração em segundos (*s*) da fase tónica bem como da fase clónica. Atendendo à rapidez do processo, não foi possível quantificar a duração da componente de flexão da fase tónica, que decorre desde a estimulação até ao primeiro sinal de extensão dos membros posteriores, considerando-se, portanto, a fase tónica como um todo. Quando terminava a extensão dos membros posteriores, o

animal começava a respirar e iniciavam-se os primeiros movimentos clónicos, considerando-se então iniciada a fase clónica. Após a fase clónica seguia-se uma fase de depressão que não foi quantificada. Os animais que não apresentaram aquelas duas fases perfeitamente definidas foram rejeitados.

1.2.3. AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTICONVULSIVANTE DA LAMOTRIGINA

Conhecido o pico de actividade anticonvulsivante da lamotrigina (LEBRE, 2004), procedeu-se à avaliação e quantificação da sua potência anticonvulsivante. A avaliação da potência anticonvulsivante fez-se por determinação da dose capaz de suprimir as crises tónicas em 50% dos animais (DE_{50}).

Os animais foram divididos em 5 grupos de 10 ratos cada. A cada grupo de ratos foi administrada por via intraperitoneal, uma das seguintes doses de lamotrigina: 1; 3; 4,5; 6 e 10 mg/kg.

Cada grupo foi testado no pico de actividade anticonvulsivante (2 horas) (LEBRE, 2004). Para cada dose testada foi registada a duração das fases tónica e clónica bem como o número de animais protegidos. Este último valor foi seguidamente convertido em percentagem. A 10 animais protegidos foi atribuída uma protecção máxima (100%).

O parâmetro farmacodinâmico DE_{50} foi finalmente calculado por regressão não-linear utilizando o **modelo sigmoidal E_{max}**. Este modelo constitui um dos mais usados em estudos farmacodinâmicos, principalmente

quando da análise dos resultados dose-efeito resulta um padrão de resposta em forma de "S":

$$\mathbf{E = (E_{max} * C^{\gamma}) / (DE^{\gamma}_{50} + C^{\gamma})}$$

γ = Coeficiente de Hill; valor exponencial que confere sigmoicidade à relação dose-efeito; se γ=1 este modelo é idêntico ao modelo E_{max} (modelo hiperbólico); se γ <1 a curva torna-se convexa; se γ >1 a curva revela-se sigmóide.

Os valores experimentais foram ajustados por regressão não-linear recorrendo a um programa informático adequado (WinNonlin®) (SCHWINGHAMMER, 1988; LEBRE, 2004).

A potência anticonvulsivante do fármaco em estudo será tanto maior quanto maior for o número de animais protegidos, ou seja, quanto menor for o número de animais capaz de responder positivamente ao teste.

1.2.4. AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTICONVULSIVANTE DA OXCARBAZEPINA

Conhecido o pico de actividade anticonvulsivante da oxcarbazepina (BENES, 1999), procedeu-se à avaliação e quantificação da sua potência anticonvulsivante. A avaliação da potência anticonvulsivante fez-se por determinação da dose capaz de suprimir as crises tónicas em 50% dos animais (DE_{50}).

Os animais foram divididos em 5 grupos de 10 ratos cada. A cada grupo de ratos foi administrada por via oral, uma das seguintes doses de oxcarbazepina: 2,5; 10; 15; 20; 30 e 50 mg/kg (KUBOVA, 1993).

Cada grupo foi testado no pico de actividade anticonvulsivante (2 horas) (BENES, 1999). Para cada dose testada foi registada a duração das fases tónicas e clónicas bem como o número de animais protegidos. Este último valor foi seguidamente convertido em percentagem. A 10 animais protegidos foi atribuída uma protecção máxima (100%).

O parâmetro farmacodinâmico DE_{50} foi finalmente calculado por regressão não-linear utilizando o **modelo sigmoidal E_{max}.**, usando um programa informático adequado (WinNonlin®) (SCHWINGHAMMER, 1988; LEBRE, 2004).

A potência anticonvulsivante do fármaco em estudo será tanto maior quanto maior for o número de animais protegidos, ou seja, quanto menor for o número de animais capaz de responder positivamente ao teste.

1.2.5. ANÁLISE ISOBOLOGRÁFICA

A análise isobológráfica é um método experimental aplicável na determinação farmacológica de interacções entre fármacos sendo actualmente aceite como o *método padrão* na detecção de interacções farmacológicas bem como na compreensão da real natureza dessas interacções, independentemente do seu mecanismo de acção ou da natureza das relações dose-resposta (ROKS, 1999; DECKERS, 2000).

De facto, este método experimental permite a avaliação da administração concomitante de FAEs em doses efectivas, permitindo uma posterior extrapolação dos resultados obtidos para a terapia experimental em doentes com epilepsia refractária e posterior adaptação dessas associações de FAEs à prática clínica (DECKERS, 2000; LUSZCZKI, 2003a,b,c,d).

Teoricamente a análise isobológráfica distingue os três tipos mais importantes de interacções: adição, sinergismo, e antagonismo (Figura M. 1.) (ROKS, 1999; BOROWICZ, 2002; LUSZCZKI, 2003a,b,c,d; 2004).

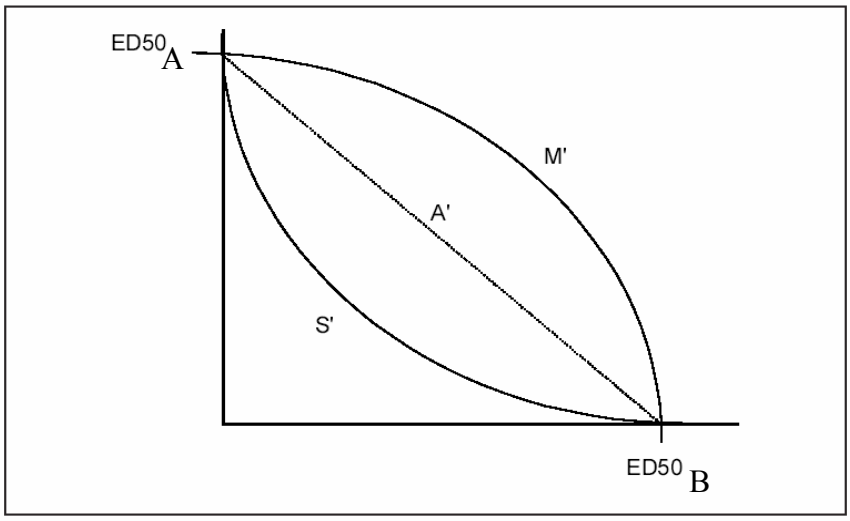

Fig. M. 1.
Três isobologramas mostrando o efeito da associação de fármacos (A e B): (M') antagonismo, (A') adição e (S') sinergismo.

Num isobolograma a dose de um fármaco (A) é representado nas abcissas; a dose do outro fármaco (B) é representada nas ordenadas. Cada ponto marcado no gráfico representa um par de doses dos dois fármacos que atingem o DE_{50} quando administrados em associação. A linha que liga os dois pontos dos fármacos isolados é designada de linha isobológráfica. Se os

pontos determinados experimentalmente coincidirem com a referida linha, então o efeito dos fármacos em associação é aditivo não havendo portanto interacção. Se os pontos se situarem abaixo da linha isobológráfica, o efeito é de sinergismo, se os pontos se encontrarem acima da linha então o efeito é de antagonismo (ROCKS, 1999; BOROWICZ, 2002; LUSZCZKI, 2003a,b,c,d).

Geralmente, em modelos experimentais de epilepsia, a análise isobológráfica a 2-dimensões (2-D) consiste em vários passos básicos (LUSZCZKI, 2003a,b,c,d). Neste presente trabalho, este compreendeu 4 passos, como se descreve:

a) Avaliação da actividade anticonvulsivante dos FAEs testados através da determinação dos valores do DE_{50} para cada FAE administrado isoladamente no teste do MES. Os valores de DE_{50} (com um intervalo de confiança de 95%) são determinados directamente através da respectiva curva dose/efeito.
b) Escolha teórica das razões fixas para a combinação de dois FAEs seguido pelo calculo do $DE_{50,ad}$ para cada combinação. O $DE_{50,ad}$ representa a adição total da dose dos fármacos, que promovem 50% de protecção aos animais contra o teste do MES. Devem ser realizadas pelo menos três combinações diferentes (1:3, 3:1, 1:1) de modo a detectar possíveis interacções.
c) Determinação experimental do $DE_{50,mis}$ para a respectiva razão de combinação dos fármacos, previamente escolhida. O $DE_{50,mis}$ é uma dose total da combinação de dois fármacos experimentalmente determinada, a qual foi administrada numa combinação suficiente de razão fixa suficiente para um efeito protector de 50% contra o teste do MES.

d) Representação gráfica das interacções observadas na forma de isoboles, tornando-se então simples a visualização de interacções, facilitando a interpretação da interacção entre os dois FAEs estudados.

1.2.5.1. AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTICONVULSIVANTE DAS RAZÕES FIXAS DA ASSOCIAÇÃO ENTRE A LAMOTRIGINA E A OXCARBAZEPINA

As doses de fármaco equi-efectivas e as suas fracções incluídas na mistura são fundamentais para calcular as doses de fármaco aditivas ($DE_{50,ad}$) no método isobológráfico. Por outro lado, a razão das combinações das doses dos fármacos é baseada em números naturais (ex: 1:3; 1:5; 4:1) em vez de fracções (ex: 1:5,5; 1:3,47). Assim, a descrição da combinação de dois FAEs a uma razão fixa de 1:3 significa que a mistura de fármacos é composta por: ¼ do DE_{50} do fármaco 1 adicionado a ¾ do DE_{50} do fármaco 2 resultando finalmente num DE_{50} total da mistura de dois fármacos. No método isobológráfico, esta forma de descrever as razões fixas de combinação em números naturais é vastamente aceite (BOROWICZ, 2002; LUSZCZKI, 2003a,c,d; 2004).

Neste trabalho, para avaliar o tipo de interacção, a lamotrigina e a oxcarbazepina foram co-administradas em três razões fixas: 1:3, 3:1 e 1:1 (para todas as combinações testadas), sendo os animais submetidos então ao teste do electrochoque máximo.

Conhecido o pico de actividade anticonvulsivante da lamotrigina (LEBRE, 2004) e da oxcarbazepina (BENES, 1999), procedeu-se à avaliação e

quantificação da potência anticonvulsivante. A avaliação da potência anticonvulsivante fez-se por determinação da dose capaz de suprimir as crises tónicas em 50% dos animais (DE_{50}).

Os animais foram divididos em grupos de 10 ratos cada. A cada grupo de ratos foi administrada por via intraperitoneal, uma das seguintes razões de doses de lamotrigina:oxcarbazepina (LTG:OXC) 1:1, 3:1 e 1:3 (Tabela M. 2.).

Tabela M. 2.

Razões de doses de lamotrigina:oxcarbazepina 1:1, 1:3 e 3:1.

Razões fixas (LTG:OXC / 1:1)	**Lamotrigina (mg/kg)**	**Oxcarbazepina (mg/kg)**
50% ED_{50} + 50% ED_{50}	2,12	10,57
Razões fixas (LTG:OXC / 1:3)	**Lamotrigina (mg/kg)**	**Oxcarbazepina (mg/kg)**
25% ED_{50} + 75% ED_{50}	1,06	15,86
Razões fixas (LTG:OXC / 3:1)	**Lamotrigina (mg/kg)**	**Oxcarbazepina (mg/kg)**
75% ED_{50} + 25% ED_{50}	3,17	5,29

Cada grupo foi testado no pico de actividade anticonvulsivante (2 horas). Para cada dose testada foi registada a duração das fases tónicas e clónicas bem como o número de animais protegidos. Este último valor foi seguidamente convertido em percentagem.

A potência anticonvulsivante do fármaco em estudo será tanto maior quanto maior for o número de animais protegidos, ou seja, quanto menor for o número de animais capaz de responder positivamente ao teste.