

Modelos animais para avaliação de drogas anticonvulsivantes: uma revisão

Animal models evaluation employed anticonvulsant drugs: a review

Lucindo José Quintans-Júnior¹, Juliane Tolentino de Lima², Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida²,
Cheila Nataly Galindo Bedor³ & René Geraldo Cordeiro Silva Júnior⁴

RESUMO – O desenvolvimento de drogas antiepilépticas (DAEs) está relacionado com estudos pré-clínicos em modelos animais. Isso inclui o felbamato (1993), gabapentina (1994), lamotrigina (1994), fenitoína (1996), topiramato (1997), leviracetam (1999) e etossuximida (2000). Apesar disso, muito pacientes com epilepsia não tem o tratamento adequado com as DAEs atuais devido a farmacoresistência ou a uma gama considerável de reações adversas. Portanto, o presente trabalho realizou uma revisão dos principais modelos animais utilizados no estudo de novas DAEs e suas correlações.

PALAVRAS-CHAVE – Descobrimto de DAEs, modelos animais, epilepsia.

SUMMARY – The antiepileptic drugs (AEDs) development is relationship with preclinical studies in animal models. These include felbamate (1993), gabapentin (1994), lamotrigine (1994), fosphenytoin (1996), topiramate (1996), tiagabine (1997), levetiracetam (1999), zonisamide (2000) and oxcarbazepine (2000). However, despite the continued development and new AEDs release, many patients have seizures that don't respond to drug therapy or have related side effects that preclude its continued use. The aim of this paper was to realize a review of the common animal models used in evaluation of AED.

KEYWORDS – AED discovery, animal models, epilepsy.

INTRODUÇÃO

A epilepsia é um dos distúrbios neurológicos mais comuns que chega a ter uma prevalência em torno 0,5-1% da população mundial (Hachinski, 1998) e uma incidência cumulativa para toda a vida em cerca de 3-4% (Browne e Holmes, 2001).

As epilepsias caracterizam-se por alterações crônicas, recorrentes e paroxísticas na função neuronal, decorrentes de anormalidade na atividade elétrica cerebral. A disfunção neurológica na sua fase aguda é chamada de crise epiléptica, a qual pode se manifestar através de alterações sensitivas, emocionais ou cognitivas (Costa *et al.*, 1992). Na verdade, o evento mais dramático de alguns quadros de epilepsia é a convulsão, estando associado à atividade hipersincrônica e repetitiva de um grupamento neuronal do córtex cerebral e estruturas hipocámpais, cuja distribuição anatômica e duração de sua atividade determinam a natureza da crise (Avanzini e Franceschetti, 2003).

Uma única convulsão generalizada pode ocorrer num indivíduo normal, em reação ao estresse fisiológico, privação do sono, efeito do álcool ou drogas ou traumatismo craniocéfálico. Processos infecciosos, tóxicos ou metabólicos podem originar convulsões recidivantes e limitadas, em indivíduos com um limiar reduzido, hereditário, sem síndrome epiléptica (Albuquerque & Campos, 1989). Apesar do importante progresso na compreensão das crises convulsivas nas últimas década-

das, as bases celulares das epilepsias no homem permanecem ainda desconhecidas (Löscher e Schmidt, 2006). O tratamento convencional das crises convulsivas é realizado, principalmente, pelo uso clínico das drogas antiepilépticas (DAEs).

Uma DAE pode ser definida como uma substância que quando administrada pode, por um determinado período, diminuir a incidência ou severidade das convulsões que acometem pacientes epilépticos.

Atualmente, existe um vasto arsenal de DAEs utilizados na clínica, entretanto, cerca de 30% dos pacientes não conseguem ter um tratamento adequado com esses fármacos (Herman & Pedley, 1999; Löscher & Schmidt, 2002). A "farmacoresistência" e um número considerável de reações adversas dificultam o tratamento, deixando uma parcela considerável de doentes sem um tratamento adequado (Meldrum & Rogawski, 2007).

As DAEs de primeira (fenitoína, carbamazepina, fenobarbital, diazepam e valproato de sódio), segunda (lamotrigina, vigabatrina, tiagabine, topiramato, gabapentina e leviracetam) e terceira geração foram inicialmente estudadas em modelos animais para avaliação de drogas anticonvulsivantes (Smith *et al.*, 2007).

A importância de um modelo experimental pode ser determinada pelo grau em que ele serve como teste-munho de um fenômeno natural. Nesse sentido, torna-se fundamental a diversificação dos modelos experimentais gerando distintos pontos de vista e permitindo uma compreensão mais holística dos fenômenos que

Recebido em 21/3/2007

¹Farmacêutico. Depto. de Fisiologia. Univ. Fed. de Sergipe (DFS/UFS); ²Farmacêutico; ³Biomédica; ⁴Veterinário
Lab. de Pesquisa do Vale do São Francisco/Univ. Fed. do Vale do São Francisco (LAPEVALE/UNIVASF)

^vPresidente do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UNIVASF

caracterizam as epilepsias. Finalmente, para que um modelo experimental seja classificado como um modelo de epilepsia, ele deve preencher os seguintes requisitos: demonstrar a presença de atividade epileptiforme nos registros eletroencefalográficos e clinicamente, apresentar uma atividade semelhante àquelas observadas durante uma crise epiléptica (Mello *et al.*, 1986).

Fazendo-se um breve histórico, os modelos experimentais sempre foram utilizados na realização de triagens (*screening*) farmacológicas de drogas antiepilépticas, onde o principal objetivo é a contenção das crises convulsivas por drogas em estudo, ou seja, um tratamento sintomático, mas não necessariamente curativo. Esses modelos ainda são muito utilizados, mas tiveram seu apogeu na década de 1960, quando muitas DAEs de primeira geração foram desenvolvidas (White, 1997). Paralelamente, esses modelos contribuíram substancialmente com informações a respeito dos mecanismos envolvidos na gênese e manutenção das crises (Mello *et al.*, 1986).

Posteriormente, a partir das décadas de 1970 e 1980, com o aparecimento de modelos experimentais crônicos induzidos, sendo o principal desses o modelo do abrasamento (*kindling*), os estudos das drogas antiepilépticas se voltaram para a identificação de agentes capazes de prevenir a epileptogênese e/ou diminuir os déficits comportamentais de longa duração decorrentes das crises. No entanto, as grandes restrições de parte dos clínicos em relação à real validade deste modelo para as epilepsias humanas, resultaram em um enorme retardo na incorporação da porção "aplicada" dos dados obtidos com o modelo do abrasamento (Queiroz *et al.*, 2002).

Nas décadas de 1980 e 1990, dois novos modelos foram extensamente utilizados: o modelo da pilocarpina e o modelo do ácido caínico (Turski *et al.*, 1983; Leite *et al.*, 2002). Ambos os modelos replicam características fenomenológicas das epilepsias humanas do lobo temporal (Turski *et al.*, 1989).

Portanto, modelos experimentais mais elaborados farmacologicamente como o modelo do "abrasamento" ou genéticos têm contribuído significativamente como ferramenta para compreensão dos mecanismos básicos da epilepsia e no desenvolvimento de novas DAEs (Löscher & Schmidt, 2006).

O presente trabalho realizou uma revisão da literatura e mostra os principais modelos animais utilizados na busca de novas drogas anticonvulsivantes, com potencial utilização no tratamento das epilepsias.

Desenvolvimento

Principais modelos

A classificação dos modelos experimentais de epilepsias transformou-se drasticamente nos últimos 30 anos. Um dos catalisadores dessa mudança certamente foi o rápido desenvolvimento da genética molecular, que modificou a visão científica a respeito das relações entre meio ambiente e código genético. Nesse sentido, existem várias classificações para os métodos experimentais utilizados em animais para avaliação de drogas anticonvulsivantes e, de maneira geral, a presente divisão se baseou nos estudos de Mello *et al.* (1986); Löscher (2002); Quintans-Júnior (2004) e Smith *et al.* (2007).

Injeção ou aplicação tópica de metais

Ácido tungstico

É um modelo mais utilizado na avaliação de substâncias anticonvulsivantes efetivos nas crises tônico-clônicas generalizadas.

Cobalto

É considerado útil para estudos que requerem um processo epiléptico semicrônico, sendo igualmente utilizado em estudos neuroquímicos.

Estimulação química

Os modelos animais mais antigos não reproduziam de forma fidedigna a fenomenologia encontrada em humanos, pois as crises convulsivas eram induzidas de forma aguda, não sendo observada a ocorrência de crises espontâneas (Leite & Terra-Bustamente, 2000).

A primeira substância utilizada como indutor de estados convulsivos foi a *creatinina* que era aplicada no córtex cerebral em modelos experimentais (Mello *et al.*, 1986).

Bicuculina

Quando injetada intracerebralmente é utilizada como modelo de epilepsia de longa duração. O mecanismo de ação da bicuculina age antagonizando GA-BA_A (Löscher & Schmidt, 2006).

Colinomiméticos

A administração sistêmica de pilocarpina pode desenvolver o *status epilepticus* (SE) sendo uma ferramenta importante para o estudo da epilepsia do lobo temporal humana, visto que, achados histopatológicos eletrográficos, manifestações comportamentais e padrão de resposta à terapêutica farmacológica assemelham-se aos encontrados naquela patologia.

Convulsões límbicas espontâneas e recorrentes em ratos depois de episódios de SE prolongado, os quais são tipicamente induzidos por uma dose convulsivante pela droga colinérgica *pilocarpina*, ou pelo *agonista glutamatérgico ácido caínico*, assemelham-se à epilepsia parcial que se desenvolve após convulsões febris prolongadas na infância (Slaght, 2002).

Estricnina

As convulsões induzidas pela administração sistêmica da estriçnina consistem apenas de extensões tônicas. A estriçnina é um potente convulsivante e atua, principalmente, como antagonista competitivo seletivo da inibição pós-sináptica mediada pela glicina. Sua principal ação é o aumento da excitabilidade reflexa da medula (Gilman, 2003).

Insulina

Esse modelo fornece dados sobre o fenômeno epiléptico em geral e especificamente sobre as crises induzidas por hipoglicemia em humanos. Em 1927 o neurologista e neuropsiquiatra polonês, Manfred J. Sakel,

introduziu o "choque epiléptico induzido por insulina" como ferramenta útil no tratamento da esquizofrenia (Sakel, 1994).

Penicilina

A administração parenteral desse antimicrobiano produz, em gatos, epilepsia generalizada que apresenta muitas semelhanças com o pequeno mal mioclônico.

Pentilenotetrazol (PTZ)

O PTZ é uma das principais substâncias indutoras de convulsão que são utilizadas na triagem pré-clínica de novos fármacos anticonvulsivantes, podendo ser utilizada como modelo de crises de generalizadas do tipo ausência ou mioclônicas como de crises tônico-clônicas (Löscher, 1998; Quintans-Júnior & Mello, 2006; Smith *et al*, 2007). O PTZ atua inibindo canais de cloreto associados aos receptores GABA_A (Löscher *et al*, 1998). O desenvolvimento de benzodiazepínicos e barbitúricos no tratamento das crises convulsivas veio a partir de estudos com o PTZ (Löscher & Schmidt, 1988).

Picrotoxina

É um modelo de epilepsia focal recorrente, para crises do tipo "pequeno mal", ou de crises de ausência. A picrotoxina (PIC) é um poderoso estimulante do Sistema Nervoso Central (SNC) sendo utilizada na indução química de convulsões através do antagonismo aos receptores GABAérgicos (Zia *et al*, 1995). A reversão da estimulação induzida pela picrotoxina é considerado um parâmetro eficaz no estudo de drogas da classe dos anticonvulsivantes que atuam em mecanismos que envolvem o sistema GABAérgico.

Processos físicos

Congelamento

A maioria dos distúrbios resultantes do congelamento cortical permanece pouco compreendida.

Estimulação Elétrica

Eletrochoque máximo (ECM)

É um dos principais métodos animais e é extensivamente utilizado na triagem de DAEs. Baseia-se na observação de que a estimulação por meio de pulsos elétricos repetitivos usando parâmetros adequados é capaz de induzir, em diferentes estruturas neuronais, um padrão característico de atividade epiléptica que auto-mantida, comumente denominando pós-descarga. O ECM é um modelo bem estabelecido que mimetiza crises convulsivas generalizadas do tipo tônico-clônicas (Löscher & Schmidt, 2006).

Abrasamento ("kindling")

O modelo do "kindling" foi inicialmente descrito por Goddard *et al*. (1969) que demonstrou que através de estimulações elétricas contínuas em limiares subconvulsivantes, em ratos, resultava no aparecimento de um

quadro progressivo de convulsões, semelhante aos sintomas de alguns tipos de epilepsia.

Da mesma forma foi visto que administrações diárias de PTZ, em doses subconvulsivantes, leva após algumas repetições ao desenvolvimento de crises convulsivas generalizadas em ratos (Izquierdo *et al*, 1975; Becker *et al*, 1992). Após a instalação desse processo, podem-se desencadear crises convulsivas espontâneas em dias ou até meses após o abrasamento inicial (Löscher, 2002). Sabe-se que essas alterações podem acompanhar o animal por toda vida; sendo assim, é um modelo que avalia tanto epilepsia quanto a epileptogênese (Meldrum & Rogawski, 2007).

Portanto, sabe-se que a capacidade de uma droga de inibir o abrasamento induzido por PTZ seja um indicativo de efeito anticonvulsivante e que possa ter uma correlação com a epilepsia no homem, principalmente, na epilepsia no lobo temporal ou parcial e na epilepsia parcial complexa (Löscher, 1999; Brodie, 2001).

Administração de neurotoxinas

Ácido Caínico

As convulsões induzidas pela injeção intraventricular de ácido caínico produz uma crise comportamental que é acompanhada por lesão cerebral muito semelhante ao da epilepsia do lobo temporal.

Pilocarpina

A administração local ou sistêmica da pilocarpina resulta em um padrão de crise límbica duradoura bastante característica (*status epilepticus*), que após um período conhecido como silencioso (de 3 a 14 dias), leva o animal a apresentar crises espontâneas e recorrentes (Turski *et al*, 1983). A lesão cerebral induzida pelo *status epilepticus* nesses modelos pode ser considerada como equivalente a um evento epileptogênico (ou seja, capaz de gerar epilepsia) no ser humano, como por exemplo, uma convulsão febril (Mathern *et al*, 1996).

Modelos com predisposição genética

Crises audiogênicas em camundongos

Esse modelo genético é utilizado no estudo de possíveis alterações bioquímicas presentes na maioria das epilepsias e é caracterizado por extensas convulsões do tipo generalizadas tônico-clônicas que podem ser conduzidas por intensas estimulações auditivas (Zivanovic *et al*, 2005).

A geração das convulsões audiogênicas em ratos naturalmente epilépticos inicia-se em animais com 15-18 dias de nascido (Hjeresen *et al*, 1987). Em animais com o cérebro ainda em desenvolvimento são mais susceptíveis na geração de crises convulsivas (Kubova & Mares, 1995).

Fotossensibilidade do balbuíno senegalês

O balbuíno senegalês *Papio papio* apresenta atividade paroxística e motora em resposta a estimulação luminosa intermitente, resposta essa parecida com

QUADRO I Modelos experimentais para avaliação de drogas com propriedades anticonvulsivantes		
Tipos de epilepsia que mimetizam	Focal	Generalizada
Agudos	<ul style="list-style-type: none"> ♦ Metais (Cobalto e Ácido Túngstico) ♦ Fármacos convulsivantes (penicilina, estriçnina, oubaina, estrógenos conjugados, ácido quinolônico, etc...) ♦ Estimulação elétrica focal 	<ul style="list-style-type: none"> ♦ Elétricas (ECM) ♦ Químicas: (PTZ, pilocarpina, picrotoxina, bicuculina, estriçnina) - Bloqueio dos sistemas de transporte de eletrólitos nas células (lítio, tiocianato) <ul style="list-style-type: none"> - Crises induzidas por CO₂ - Por abstinência de drogas (barbitúricos, álcool, etc...)
Crônicos	<ul style="list-style-type: none"> ♦ Metais (Gel de alumina,) ♦ Abrasamento ("kindling"): elétrico, audiogênico, químico (PTZ) ♦ Sistêmicos: ácido cainico e pilocarpina ♦ Modelos IGER ("Ilhara's genetically epileptic rats") 	<ul style="list-style-type: none"> ♦ Precipitação sensorial: crises fotossensíveis, audiogênicas, estresse ♦ Espontâneas: mutações genéticas

aquelas observadas nas crises epilépticas consideradas de origem centroencefálica no homem.

O **Quadro I** mostra, de maneira resumida, os principais modelos animais utilizados no estudo de novas drogas com propriedades anticonvulsivantes.

CONCLUSÕES

A impraticabilidade e os próprios preceitos éticos demonstram ser perigoso testar, inicialmente, a ação de drogas em doentes epilépticos, sem antes se fazer uma triagem e ensaios biológicos pré-clínicos. Os métodos laboratoriais continuam sendo desenvolvidos para tal finalidade. Além disso, testes que embora sejam considerados clássicos, como os testes de convulsões induzidas pelo pentilenotetrazol e eletrochoque máximo, que se baseiam no efeito anticonvulsivante do tipo "tudo ou nada", continuam apresentando boa correlação na atividade clínica de uma DAE.

Além disso, o desenvolvimento atual de novas DAEs caminha no horizonte de drogas com potencial anticonvulsivante alto, controlando de forma seletiva os diversos tipos de epilepsias, e que apresentem baixa toxicidade. Mas, o fato de poder estudar, preliminarmente, em simples modelos animais, continua sendo uma ferramenta importante na pesquisa.

REFERÊNCIAS

1. Avanzini G, Franceschetti S. 2003; Cellular biology of epileptogenesis. The Lancet: Neurology, vol 2.
2. Becker A, Grecksch G, Ruthrich HI, Pohle W, Marx B, Matthies H. Kindling and its consequences on learning in rats. Behav Neural Biol. 1992; 57:37-43.
3. Brodie MJ. Do we need any more new antiepileptic drugs? Epilepsy Research. 2001; 45:3-6.
4. Browne TR, Holmes GL. Epilepsy. New England Journal Medicine. 2001; 344:1145-1151B.
5. Goddard GV, McIntyre DC, Leech CK. A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. Experimental Neurology; 1969; 25: 295-330.
6. Hachinski V. New antiepileptic drugs – the cost of innovation. Archives Neurology. 1998; 55: 1142.
7. Hjerresen D, Franck J, Amend D. Ontogeny of seizure incidence, latency and severity in genetically epilepsy prone rats. Dev. Psychobiol. 1987; 20: 355-363.

8. Izquierdo I, Fernandes J, Oliveira R, Settineri F. Effect of daily saline, drug or blank injections on the susceptibility to the convulsant effect of drugs. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 1975; 3: 721-722.
9. Kubova H, Mares P. Different postnatal development of convulsions and lethality induced by strychnine in rats, Pharmacol. Toxicol. 1995; 77:219-224.
10. Leite JP, Terra-Bustamante VC. Plasticidade neuronal e epileptogênese. 2000. Acesso em 22/fevereiro/2007. Disponível em: http://www.videbulas.com.br/dinfo/atualida/021016_07.htm
11. Leite JP, Garcia-Cairasco N, Cavalheiro, EA. New insights from the use of pilocarpine and kainate models. Epilepsy Research. 2002; 50(1-20): 93-103.
12. Löscher W, Schmidt D. Which animal model should be used in the search for new antiepileptic drugs? A proposal based on experimental and clinical considerations. Epilepsy Research. 1988; 2:145-181.
13. Loscher W, Fassbender CP, Nolting B. The role of technical, biological and pharmacological factors in the laboratory evaluation of anticonvulsant drugs. II. Maximal electroshock seizure models. Epilepsy Res 1991;8:79-94.
14. Löscher W. New visions in the pharmacology of anticonvulsant. European Journal of Pharmacology. 1998; 342:1-13.
15. Löscher W. Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease-modifying drugs. A comparison of the pharmacology of kindling and post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy. Epilepsy Research. 2002; 50: 105-123.
16. Löscher W, Schmidt D. New horizons in the development of antiepileptic drugs. Epilepsy Research, 2002; 50: 3-16.
17. Löscher W, Schmidt D. New horizons in the development of antiepileptic drugs: Innovative strategies. Epilepsy Research. 2006; 69:183-272
18. Meldrum BS, Rogawski MA. Molecular Targets for Antiepileptic Drug Development. Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental 2007; 4:18-61.
19. Mello LE, Bortolotto ZA, Cavalheiro EA. Modelos experimentais de epilepsias. Uma Revisão. Neurobiologia, 1986; 49:231-268.
20. Queiroz C., Leite J. Mello LE. Modelos experimentais em epilepsias, 2004 Acesso em 06/março/2007 Disponível em: <http://www.com.ciencia.br/reportagens/epilepsia/ep24.htm>
21. Quintans-Júnior LJ. Estudo da atividade anticonvulsivante de *Rauvolfia ligustrina* Roem et Schult. e de derivados indólicos sintéticos. João Pessoa, 2004. [Tese de Doutorado – Universidade Federal da Paraíba].
22. Quintans-Júnior LJ, Mello LEAM. In: Almeida RN. Psicofarmacologia - Fundamentos práticos. 1ª ed. Editora Guanabara Koogan, 2006.
23. Sakel, M. The methodical use of hypoglycemia in the treatment of psychoses. Reproduced in: Am J Psychiatry. 1994; 151(6): 240-247.
24. Slaght SJ. Activity of thalamic reticular neurons during spontaneous genetically determined spike and wave discharges. Journal of Neuroscience. 2002; 22(6): 2323-2334.
25. Smith M, Wilcox KS, White HS. Discovery of antiepileptic drugs. Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics. 2007; 4:12-17.
26. Turski WA, Cavalheiro EA, Schwarz M, Czuczwar SJ, Kleinrok Z, Turski L. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. Behav Brain Res. 1983; 9:315-35.
27. Turski L, Ikonomidou C, Turski WA, Bortolotto ZA, Cavalheiro, EA. Review: cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine: a novel experimental model of intractable epilepsy. Synapse. 1989; 3:154-71.
28. White HS. Clinical significance of animal seizure models and mechanism of action studies of potential antiepileptic drugs. Epilepsia. 1997; 38: S9-S17.
29. Zia A, Siddiqui BS, Begum S, Suria A. Studies on the constituents of the leaves of *Nerium oleander* on behavior pattern in mice. Journal of Ethnopharmacology, 1995; 49: 33-39.
30. Zivanovic D, Stanojlovic O, Mirkovic S, Susic V. Ontogenetic study of metaphit induced audiogenic seizures in rats. Developmental Brain Research. 2005; 155:42- 48.

Endereço para correspondência

Lucindo José Quintans Júnior
 Departamento de Fisiologia/Universidade Federal de Sergipe (UFS)
 Campus Universitário Prof. Aloísio de Campos
 49100-000, São Cristóvão, SE, Brasil
 E-mail: lucindo@ufs.br; lucindo_jr@yahoo.com.br (Preferencialmente)