

CARACTERIZAÇÃO COMPORTAMENTAL E VALIDAÇÃO DE UM MODELO ANIMAL PARA A TRIAGEM DE DROGAS ANTICONVULSIVANTES.

Leonardo Niero Santos (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Humberto Milani (Orientador), e-mail: ra106968@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde/Maringá, PR.

Área: FARMACOLOGIA – 21000000

Sub-Área: NEUROPSICOFARMACOLOGIA - 21003009

Palavras-chave: epilepsia, anticonvulsivantes, modelos animais.

Resumo:

A epilepsia é uma doença crônica de sintomatologia progressiva que representa um grande prejuízo na vida de seus portadores. Até 30% dos indivíduos epiléticos não respondem de modo satisfatório aos medicamentos disponíveis. Deste modo, é crucial que novas drogas antiepiléticas sejam estudadas, visando novas abordagens terapêuticas mais eficazes e seguras. Para isso, o uso de modelos animais é imprescindível. No presente estudo avaliamos a viabilidade metodológica para implantação de um modelo in vivo de epilepsia, mediante a aplicação em dose única do agente convulsivante pentilenotetrazol (PTZ), tendo em vista o seu uso futuro para se testar os efeitos anticonvulsivantes de análogos sintéticos ou semissintéticos do canabidiol (CBD), princípio ativo da cannabis sativa (maconha). Neste estudo, um grupo de animais recebeu uma dose única de PTZ (60 mg/kg, i.p), enquanto um outro grupo recebeu PTZ + Fenobarbital (PHB). O PHB foi utilizado como anticonvulsivante de referência (controle positivo), para validação do modelo do PTZ. Após quantificação das manifestações convulsivas em ambos os grupos, concluímos que o modelo do PTZ foi implantado e validado com sucesso em nosso laboratório, e poderá ser útil como ferramenta inicial de triagem de novos fármacos antiepiléticos.

Introdução

A epilepsia é uma doença neurológica crônica e progressiva, caracterizada por um estado de hiperexcitabilidade neuronal que resulta em manifestações neurobiológicas, cognitivas e psicossociais.

A prevalência mundial de epilepsia é estimada em 7,6 para cada 1000 indivíduos. Destas, até 70% podem se tornar livres de convulsões com o adequado diagnóstico e tratamento. Portanto, até 30% dos casos não respondem satisfatoriamente aos tratamentos atualmente disponíveis (OMS, ILAE., 2019).

Em que pese todo avanço no entendimento da fisiopatologia das epilepsias e no desenvolvimento de novos fármacos, há uma necessidade de novos estudos objetivando a identificação e/ou desenvolvimento de drogas mais eficazes e seguras (LÖSCHER, 2011; PATRA et al., 2018; MASCAL et al., 2019). Para tanto, o uso de modelos animais a fim de prospectar drogas com potencial terapêutico é uma etapa imprescindível no desenvolvimento de fármacos (LÖSCHER, 2011; KANDRATAVICIUS et al., 2014).

A despeito das limitações inerentes a todo modelo animal de experimentação, aqueles que utilizam o PTZ em dose única (Pentilenotetrazol, um antagonista do receptor gabaérgico tipo A) tem sido considerados modelos clinicamente relevantes de epilepsia resistente a drogas e útil para explorar vários aspectos relacionados a sua patologia (VASILEV et al., 2018).

Materiais e Métodos

Foram utilizados Ratos Wistar machos jovens (180–230 g), mantidos em condições padrões de alojamento. Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos sob a autorização do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA, nº 6657050421).

Os compostos químicos utilizados foram: Pentilenotetrazol (PTZ, Sigma-Aldrich) como agente convulsivante e Fenobarbital (PHB, Sanofi) como droga anticonvulsivante de referência.

Num primeiro experimento, o PTZ foi administrado em dose única de 60mg/Kg, via intraperitoneal (i.p.), em 30 animais, e as respostas comportamentais gravadas em vídeo por 30 minutos. Num segundo experimento, 20 animais foram previamente tratados com PHB (30mg/Kg, i.p.), e 30 minutos mais tarde receberam o PTZ (60 mg/kg). As respostas comportamentais foram gravadas em vídeo e analisados de forma randomizada e duplo-cego. As manifestações clínicas dos animais foram quantificadas de acordo com a escala de Racine (RACINE, RJ. 1972).

Posteriormente, os resultados foram analisados, comparando os dois grupos de animais (PTZ vs. PTZ+PHB) com base em critérios quantitativos temporais (latência para o primeiro sinal de convulsão, latência para a convulsão mais severa, latência para retorno ao comportamento usual, e duração da convulsão mais severa). A taxa de sobrevivência também foi medida.

Resultados

As variáveis-respostas de ambos os grupos, PTZ e PTZ + PHB não seguem uma distribuição normal. Portanto, o teste U e Mann-Whitney (estatística não-paramétrica) foi utilizado.

A figura 1 mostra o padrão de resposta comportamental (convulsões) nos grupos PTZ e PTZ+PHB. Comparado ao grupo PTZ, no grupo tratado com PHB houve aumento nas latências para início da convulsão ($p < 0,01$), máxima intensidade da convulsão ($p < 0,05$), e uma diminuição na latência para recuperação ao estado normal ($p < 0,01$). A duração da convulsão de máxima intensidade reduziu drasticamente após o uso do fenobarbital ($p < 0,001$). Esses dados indicam que o modelo foi capaz/sensível detectar o efeito anticonvulsivante do PHB.

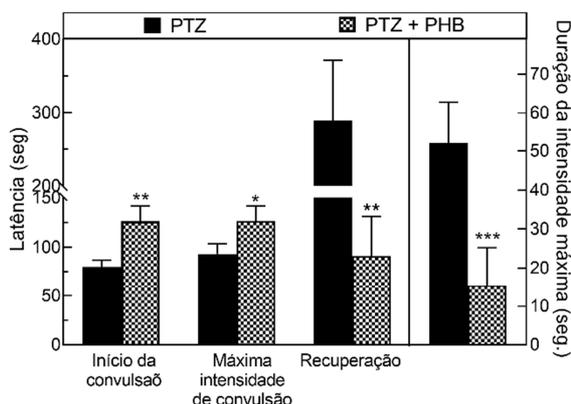


Figura 1. (esquerda) Valores de latência (em segundos) para as seguintes variáveis-respostas (eixo 'x'): (i) início do primeiro sintoma (convulsão), (ii) convulsão de intensidade máxima, e (iii) recuperação do comportamento 'normal'. (direita) Duração da convulsão de intensidade máxima. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, PTZ vs. PTZ+PHB. PTZ (n = 30), PTZ+PHB (n = 20).

A Figura 2 mostra a taxa de sobrevivência (ou mortalidade) nos animais de ambos os grupos.

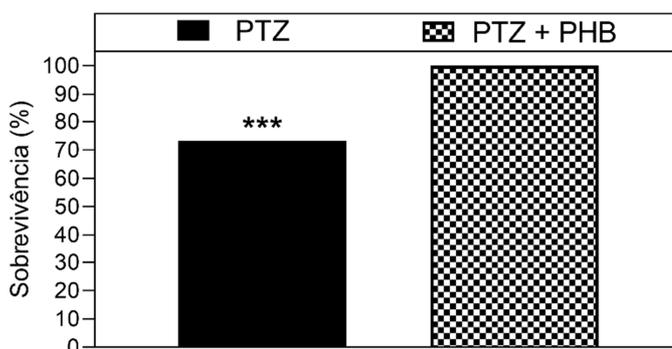


Figura 2. Taxa de sobrevivência nos grupos tratados com PTZ somente, ou PTZ + PHB.

A taxa de sobrevivência no grupo PTZ foi de 73,3% (mortalidade de 26,7%), enquanto nenhum animal foi a óbito após o tratamento com PHB ($p < 0,001$), indicando mais uma vez a sensibilidade do modelo do PTZ agudo em detectar os efeitos anticonvulsivantes do PHB.

Discussão/Conclusão

Os resultados obtidos foram consistentes com as expectativas do projeto. O modelo do PTZ agudo em ratos se mostrou capaz de detectar, com significância estatística, os efeitos de um fármaco antiepilético padrão (fenobarbital). Os critérios analisados apresentaram resultados consistentes e os procedimentos experimental e de análise foi realizado de forma eficaz e descomplicada. Concluímos que houve sucesso no objetivo do projeto, ou seja, implantar o modelo "PTZ dose única" em nosso laboratório, para uso na triagem de novos fármacos anticonvulsivantes, a

exemplo do canabidiol e análogos. Entretanto, estudos adicionais são necessários para melhor caracterizar o modelo do PZT em nosso laboratório, como por exemplo, o modelo do PTZ crônico (abrasamento químico), no qual, o animal é submetido a doses sub-convulsivantes repetidas, tornando-o sensibilizado para manifestação de convulsões. Este modelo ('Kindling') apresenta maior proximidade com a fisiopatologia das epilepsias.

Agradecimentos

Primeiramente, meus sinceros agradecimentos ao meu coordenador, Prof. Dr. Humberto Milani, que sempre demonstrou paciência e profundo conhecimento para responder todos os meus questionamentos e será lembrado com muito carinho como um dos professores que, durante minha graduação, despertaram a vontade de seguir no academicismo. Agradeço também aos demais professores da disciplina de Farmacologia, que ofertam aos alunos de meu curso uma disciplina de excelência, que será um diferencial em nossas carreiras. Adicionalmente, agradeço à minha família e amigos, que me apoiam e incentivam rotineiramente.

Referências

1. WORLD HEALTH ORGANIZATION., INTERNATIONAL LEAGUE AGAINST EPILEPSY. Epilepsy: a public health imperative. Geneva, 2019. Disponível em: https://www.ilae.org/files/dmfile/19053_Epilepsy_A-public-health-imperative-For-Web.pdf
2. LÖSCHER, W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. **Seizure**. 2011;20(5):359-68.
3. PATRA, BH et al. Cannabidiol reduces seizures and associated behavioral comorbidities in a range of animal seizure and epilepsy models. **Epilepsia** 2019;60(2):303-314.
4. MASCAL, M et al. Synthetic, non-intoxicating 8,9-dihydrocannabidiol for the mitigation of seizures. **Sci Rep**. 2019;9(1):7778.
5. KANDRATAVICIUS, L et al. Animal models of epilepsy: use and limitations. **Neuropsychiatr Dis Treat**. 2014;10:1693-705
6. RACINE, RJ. "Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure". **Electroencephalography and Clinical Neurophysiology**. 1972;32(3):281–94.