

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**ENSAIO PRÉ-CLÍNICO DO COMPOSTO  
ANTICONVULSIVANTE BROMO-BENZALDEÍDO  
SEMICARBAZONA EM RATOS E CÃES**

GIOCONDA ALVES DE ASSUMPÇÃO

BELO HORIZONTE  
2007

Gioconda Alves de Assumpção

**ENSAIO PRÉ-CLÍNICO DO COMPOSTO  
ANTICONVULSIVANTE BROMO-BENZALDEÍDO  
SEMICARBAZONA EM RATOS E CÃES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Fisiologia para programa de Pós-Graduação.

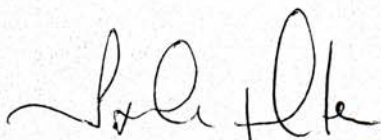
Orientação: Profa. Dra. Maria Carolina Doretto  
Co-orientação: Profa. Dra. Eliane Gonçalves de Melo

Belo Horizonte  
Instituto de Ciências Biológicas da UFMG  
2007

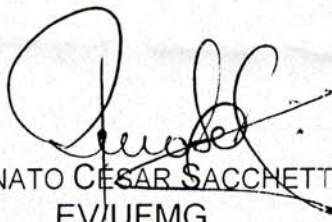
# ENSAIO PRÉ-CLÍNICO DO COMPOSTO ANTICONVULSIVANTE BROMO BENZALDEIDO SEMICARBAZONA EM RATOS E CÃES

GIOCONDA ALVES DE ASSUMPÇÃO

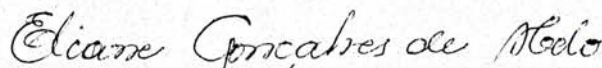
Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 14 de setembro de 2007,  
pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



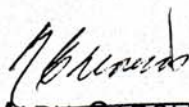
PROF. DR. IGOR DIMITRI GAMA DUARTE  
ICB/UFMG



PROF. DR. RENATO CÉSAR SACCHETTO TORRES  
EV/UFMG



PROFA. DRA. ELIANE GONÇALVES DE MELO  
EV/UFMG, CO-ORIENTADORA



PROFA. DRA. MARIA CAROLINA DORETTO  
ICB/UFMG, ORIENTADORA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-Fisiologia e Farmacologia  
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 14 de setembro de 2007.

## **Agradecimentos**

Aos meus pais e família por tudo.

À professora Carol pela oportunidade, orientação, confiança, exemplo e amizade.

Aos professores do NNC, Márcio e André pelo apoio e exemplo.

À professora Eliane pela orientação, incentivo e amizade.

À professora Heloísa Beraldo pelo apoio e cooperação.

Aos colegas e amigos do NNC pelo apoio e momentos prazerosos de trabalho em equipe e amizade.

Aos colegas da Pós-graduação do departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB/UFMG.

Aos amigos Maura e Jefferson pela confiança, companheirismo e apoio durante todas as etapas deste trabalho.

À Fátima pelo apoio, sugestões e discussões valiosas.

Aos amigos, Mari, Jerusa, Eric, Teca, Alexis, Roger, Uri, Hassan, Renata, Fê e Aline pelo apoio indispensável.

Aos amigos da casa nova que me apoiaram na etapa final.

Aos colegas da Veterinária Bruno, Sofia, Mel e Aline pela amizade e ajuda com os cães e histopatologia.

Ao Maurício pela ajuda com os filmes.

À Denise pelos esclarecimentos sobre farmacotécnica e ajuda na diluição do BrBS.

Aos funcionários Taquinho e Adriano Palhinha pelos cuidados e carinhos com os animais.

A equipe do canil do Centro de Zoonose da Prefeitura de Belo Horizonte que auxiliaram na coleta e seleção dos cães.

Ao Prof. Élvio pela disponibilização dos exames de leishmaniose.

À CAPES, FAPEMIG e CNPQ pelo financiamento dos experimentos.

À todos que participaram direta e indiretamente neste trabalho.

Aos animais.

## Lista de siglas

AMG	Abalo mioclônico generalizado
AS	Wistar audiogenic sensitive rats
BrBS	4-Bromobenzaldeído semicarbazona
BS	Benzaldeído semicarbazona
β-CD	β-ciclodextrina
CA	Crise audiogênica
CEBIO	Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas
CETEA	Comitê de ética em experimentação animal
CMC	Carboximetilcelulose
C1	Primeira corrida
CVT	Crise convulsiva tônica clônica
DPM	Desvio padrão da média
GABA	Ácido gama-amino-butírico
GEPR	Genetically epileptic prone rats
HE	Hematoxilina e eosina
HP-β-CD	Hidroxipropil β-ciclodextrina
ILAE	Liga Internacional Contra Epilepsia
i.p.	intraperitoneal
i.v.	Intravenoso
IS	Índice de Gravidade
MP	Mioclonia parcial
NMDA	N-metil-d-aspartato
p.o.	Por via oral
PTZ	Pentilenotretazol
s.c.	Subcutâneo
SRD	Sem raça definida
TID20	Dose que aumenta o limiar de crise em 20 %
WARs	Wistar Audiogenic Rats

# Sumário

## 1. Introdução

---

1.1	Epilepsia e Crise convulsiva	10
1.2	Fármacos anticonvulsivantes	13
1.3	Modelos Experimentais	17
	1.3.1 Crise audiogênica em WAR	18
	1.3.2 Modelo de PTZ	20
1.4	Semicarbazonas	25
1.5	Epilepsia em cães	28
1.6	Cálculo alométrico	31

## 2. Objetivos

---

2.1	Objetivo Geral	33
2.2	Objetivos Específicos	33

## 3. Material e Métodos

---

3.1	Animais	34
3.2	Fármacos	35
3.3	Eutanásia	35
3.4	Experimento 1 - Crise audiogênica em WAR	
	3.4.1 Estimulação sonora e avaliação comportamental das crises	36
	3.4.2 Protocolo Experimental	38
	3.4.3 Análise Estatística	39

3.5	Experimento 2 - Crise induzida por PTZ endovenoso em ratos	
3.5.1	Protocolo experimental	40
3.5.2	Análise Estatística	41
3.6	Experimento 3 - Crise induzida por PTZ endovenoso em cães	
3.6.1	Protocolo experimental	42
3.6.2	Histopatologia	45
3.6.3	Análise Estatística	45

#### **4. Resultados**

---

4.1	Experimento 1 - Crise audiogênica em WAR	47
4.2	Experimento 2 - Crise induzida por PTZ endovenoso em ratos	51
4.3	Experimento 3 - Crise induzida por PTZ endovenoso em cães	54

#### **5. Discussão**

---

5.1	Experimento 1 - Crise audiogênica em WAR	64
5.2	Experimento 2 - Crise induzida por PTZ endovenoso em ratos	68
5.3	Experimento 3 - Crise induzida por PTZ em cães	72
5.4	Discussão Geral	78

#### **6. Conclusão**

---

#### **7. Referências bibliográficas**

---

## Resumo

Apesar da disponibilidade de vários fármacos anticonvulsivantes, um terço dos pacientes com epilepsia continuam a apresentar crises. Em certos casos, os fármacos disponíveis são eficazes, mas promovem efeitos colaterais e toxicidade incompatíveis com a manutenção do tratamento. O Bromo Benzaldeído Semicarbazona (BrBS) é um composto da classe das semicarbazonas, o qual apresenta boa eficácia terapêutica e baixa toxicidade. O objetivo desse trabalho foi investigar a atividade anticonvulsivante do BrBS no modelo de crise audiogênica (CA) em ratos wistar audiogênicos (WAR), em crises induzidas por pentilenotetrazol (PTZ) em ratos Wistar e em cães sem raça definida. No modelo de CA, foram analisados os parâmetros de índice de gravidade (IS), latência e porcentagem de ocorrência de primeira corrida (C1) e crise generalizada tônica clônica (CVT). No modelo de PTZ em ratos, foram analisados os limiares de PTZ para ocorrência dos comportamentos abalo mioclônico (AM), mioclonia parcial (MP) e crise generalizada tônico-clônica (CVT). No modelo de PTZ em cães foram analisados os limiares de PTZ para ocorrência dos comportamentos mioclonia parcial (MP) e abalo mioclônico generalizado (AMG). No modelo de CA em WARs, na dose máxima (400 mg/kg), o BrBS bloqueou todos os comportamentos relacionados a crise (IS=0) para todos os animais sem apresentar efeitos colaterais evidentes. A porcentagem de animais que apresentou o comportamento CVT diminuiu em 50 % nas doses de 100 e 150 mg/kg em relação ao controle. A porcentagem de animais que apresentou C1 diminuiu



em 43 % na dose de 200 mg/kg, acompanhado do aumento da sua latência em relação ao controle. No modelo de PTZ em ratos, o BrBS apresentou um modelo de regressão quadrática na curva dose-resposta dos três comportamentos avaliados. Não foi observado efeito pró-convulsivante. As doses 150 e 200 mg/kg foram eficazes no AM. A dose de 200 mg/kg foi eficaz no MP e CVT, com decréscimo significativo na dose de 400 mg/kg para AM e CVT. O cão mostrou ser um modelo estável para o estudo de crise convulsiva por PTZ. No entanto, o BrBS não foi eficaz na crise induzida por PTZ em cão. Foi observado a ocorrência de dois grupos de animais com respostas distintas ao BrBS. Isso sugere a existência de animais com diferentes respostas farmacológicas à crise convulsiva. Podemos concluir que o BrBS, apresentou ótima eficácia no modelo de crise generalizada em WARs, moderada atividade, dependente de dose, no modelo de crises parciais e generalizadas de PTZ em ratos e ausência de efeito no modelo de crises parciais e generalizadas de PTZ em cães.

## Abstract

Despite the availability of wide range of anticonvulsant drugs, at least 25% of patients continue to have seizures. Furthermore, among those in whom seizures are effectively inhibited, substantial number of patients experience persistent and undesirable effects of these drugs. BrBS is a semicarbazone compound that has shown to possess excellent anticonvulsant activity in rats, besides their low or absent neurotoxicity. The objective of this present study was examine the ability of BrBS to prevent audiogenic seizures (AS) in Wistar Audiogenic Rats (WAR) and seizures induced by Pentilenetetrazole (PTZ) in Wistar rats and mongrel dogs. The behaviors observed in the WARs were severity index (IS), latency to the first wild running episode (FR), latency to the tonic-clonic phase (TCS) and the presence or absence of these seizure components. The endpoints used to evaluate the threshold for PTZ in rats was the first myoclonic twitch (MT), partial clonus (PC) and generalized tonic-clonic seizure (TCS). In dogs, PTZ model was evaluated by the threshold for generalized myoclonic twitch (MT) and partial clonus (PC). In the AS, the maximum dose of BrBS tested (400 mg/kg) blocked all the seizure components (IS = 0) for all animals and no adverse effect was noted. At the dose of 200 mg/kg, BrBS suppress the FR in 43% of rats and only 28 % still showed the TCS. The doses of 100 and 150 mg/kg, BrBS suppressed 50 % of the TCS in the rats. In the PTZ model in rats a restricted dose response was found for the three behaviors tested. No proconvulsant properties were observed. At the doses of 150 and 200 mg/kg, BrBS effectively increased the threshold for MT. The effective dose for PC and TCS was 200 mg/kg. The

anticonvulsant effect decreased at 400 mg/kg for MT and TCS components. The mongrel dogs showed to be a suitable model for PTZ seizures studies. However, BrBS showed no anticonvulsant efficacy in this model. Two groups of animals were characterized in their responses to BrBS anticonvulsant activity. These results suggest the existence of animals with individual differences in pharmacological anticonvulsant responses. In conclusion, this study showed the pharmacology efficacy of BrBS against AS in WAR model, against partial and generalized seizure in PTZ model in rats and no activity against PTZ model in dogs.

# **1. Introdução**

## **1.1 Epilepsia e Crise Convulsiva**

Epilepsia é um distúrbio do encéfalo caracterizado por predisposição persistente a gerar crises epiléticas e suas conseqüências neurobiológicas, cognitivas, psicológicas e sociais. Essa patologia requer a manifestação de pelo menos uma crise epilética, que é definida pela ocorrência de sinais e/ou sintomas devido à atividade anormal excessiva ou sincrônica de neurônios encefálicos (Fisher e cols., 2005; Guilhoto e cols., 2006).

A epilepsia afeta aproximadamente 1 a 2% da população mundial. A taxa de incidência varia de 50 a 122 pessoas por 100.000 por ano. A faixa etária mais acometida é a infantil, principalmente abaixo dos 2 anos, seguida pelos idosos com mais de 65 anos e com predomínio nos homens em relação às mulheres, sendo de 1,1 a 1,7 vezes (Engel, 2001).

A gravidade das crises varia de episódios de perda de atenção até convulsões graves, associadas à perda de consciência (Lees & Jones, 2000). Esses episódios ocorrem periodicamente, de maneira imprevisível na maioria dos casos clínicos, comprometendo a realização de atividades como condução de veículos ou tarefas do trabalho cotidiano, além da ocorrência de ferimentos durante as crises convulsivas (McKeouwn & McNamara, 2001).

Os aspectos sociais da epilepsia refletem a evolução histórica das crenças relacionadas às doenças em diferentes épocas da sociedade. O nome epilepsia deriva da palavra grega *epilambanien* que significa ser acometido ou apossado. Na antiguidade, acreditava-se que as doenças eram conseqüências de castigos divinos, e o aspecto bizarro e inconsciente das crises convulsivas sustentou essa crença - que o paciente epiléptico era apossado por forças sobrenaturais (Gross, 1992; Engel, 1995; Lees & Jones, 2000). Apesar do desenvolvimento da ciência com o esclarecimento de substratos neurobiológicos da epilepsia, os pacientes ainda se encontram sob o fantasma da discriminação social, com dificuldades para trabalhar e até mesmo em relacionamentos pessoais, muitas vezes, mantendo-se reclusos com medo da iminência de crise no ambiente social (Fernandes & Li Min, 2006).

A Liga Internacional Contra a Epilepsia (ILAE) desenvolveu uma classificação das crises epiléticas considerando critérios clínicos para a determinação do tipo de crise que um paciente apresenta. A semiologia ictal é importante para essa classificação, que leva em conta dois parâmetros básicos: o grau de envolvimento do sistema nervoso central (generalizado ou focal) e o comprometimento ou não da consciência do paciente. Assim, as crises podem ser parciais ou generalizadas, e as parciais podem ocorrer sem perda da consciência – crises parciais simples – ou com perda da consciência – crises parciais complexas – ou com evolução para crises generalizadas. Também se leva em conta a presença ou não de fenômenos motores – crises convulsivas e não convulsivas (Commission, 1989; Yacubian, 1999).

Existem mais de 40 tipos de epilepsias ou síndromes epiléticas caracterizadas por diferentes tipos de crise, etiologia, anatomia, fatores precipitantes, idade de início, gravidade, cronicidade, comportamento circadiano, prognóstico e características eletroencefalográficas (Commission, 1989; Löscher, 1998; Lees & Jones, 2000, Guilhoto e cols., 2006). Nas últimas décadas, a pesquisa sobre os seus mecanismos etiopatológicos, eletroencefalográficos e farmacológicos trouxe descobertas como o envolvimento de genes associados a diversas síndromes, bem como aos aspectos de neuroplasticidade envolvidos no desenvolvimento de maior susceptibilidade a crises convulsivas em pacientes pós - lesão encefálica – trauma craniano ou acidentes vasculares encefálicos. Apesar disso, ainda não existe tratamento algum que possa impedir o desenvolvimento da epilepsia.

A farmacoterapia ainda é o principal tratamento para epilepsia, sendo que a sua abordagem é direcionada para o controle dos sintomas, isto é, supressão das crises (Löscher, 1998; Lees & Jones, 2000). A esses compostos, damos o nome de fármacos anticonvulsivantes. O objetivo da terapia com fármacos anticonvulsivantes é manter o paciente livre de crises com a menor interferência na função encefálica normal. A seleção do medicamento anticonvulsivante é baseada primariamente na sua eficácia para os diferentes tipos de epilepsias (Löscher, 1998; Aiken & Brown, 2000).

Componentes específicos da convulsão, como a manifestação clônica e tônica, são gerados por variados substratos anatômicos, que apresentam

diferentes sensibilidades a vários fármacos; a sua identificação permite uma abordagem racional no desenvolvimento de novos fármacos e na escolha da terapia anticonvulsivante (Browning & Nelson, 1986; Gale, 1988).

## **1.2 Fármacos anticonvulsivantes**

Os fármacos mais utilizados na clínica – fenitoína, carbamazepina, valproato, benzodiazepínicos, etosuximida, fenobarbital e primidona – foram desenvolvidos e introduzidos entre 1910 e 1970 e são referidos como fármacos de primeira geração (Löscher, 1998). Posteriormente, outros medicamentos foram desenvolvidos, incluindo os fármacos de segunda geração como lamotrigina, felbamato, oxcarbazepina, vigabatrina, tiagabina, topiramato, gabapentina, zonisamida e levetiracetam (Löscher & Leppik, 2002). Outros fármacos estão em desenvolvimento pré-clínico e/ou clínico (Kitano e cols., 2005).

Apesar da disponibilidade dessas várias drogas, aproximadamente um terço dos pacientes com epilepsia continuam a ter crises convulsivas devido a refratariedade medicamentosa (Lees & Jones, 2000; McKeouw & McNamara, 2001). Embora a ressecção cirúrgica da área encefálica alterada seja uma alternativa, essa intervenção não seria necessária se houvesse fármacos com toxicidade e efeitos colaterais menores e que atuassem nesses pacientes refratários (Löscher, 1998).

Pacientes com tipos de crises idênticas podem apresentar uma grande diferença na resposta ao mesmo fármaco anticonvulsivante, indicando que pode haver diferenças fisiopatológicas multifatoriais individuais (Löscher, 1998; Stables e cols., 2002). Entretanto, os mecanismos responsáveis pela resistência clínica aos medicamentos não são conhecidos, mas podem incluir a insensibilidade do sítio de ação do fármaco, falha do fármaco em alcançar algumas regiões do cérebro, desenvolvimento de tolerância ou presença de proteínas droga-resistentes (para revisão ver Stables e cols., 2002). Alguns preditores da intratabilidade são propostos, como por exemplo, o tipo de crise, alta frequência de ocorrência das crises, início da crise na infância, etiologia sintomática, distúrbios psicóticos, presença de múltiplos tipos de crise e resultado terapêutico a curto prazo ruim. Apesar disso, ainda não é possível prever se um paciente será refratário ao tratamento anticonvulsivante (Löscher, 1998).

Diante desse quadro, há uma grande necessidade do desenvolvimento de fármacos anticonvulsivantes e/ou novas estratégias terapêuticas.

O conhecimento dos mecanismos de ação dos primeiros anticonvulsivantes surgiu anos após o seu uso na clínica. Hoje, os diversos fármacos podem ser agrupados de acordo com o seu mecanismo de ação (Ochoa & Riche, 2005). Os principais grupos incluem os bloqueadores de canal para sódio, inibidores de corrente de cálcio, gabamiméticos, bloqueadores glutamatérgicos, inibidores da anidrase carbônica, hormônios, entre outros (Ochoa & Riche,



2005). No entanto, a eficácia clínica dos diversos medicamentos se deve, provavelmente, à combinação dos diferentes mecanismos (Löscher, 1998).

A fenitoína, por exemplo, atua em canais de sódio, inibindo os disparos neuronais de alta frequência. Uma vez que esse canal é ativado, a fenitoína é capaz de mantê-lo na conformação “inativada”, evitando disparos subsequentes, bloqueando assim, o início da crise convulsiva (Lees & Jones, 2000). Outros fármacos, como a carbamazepina, valproato, lamotrigina, oxcarbazepina, topiramato e felbamato também atuam em canais de sódio (para revisão ver Löscher, 1998).

Por outro lado, a potencialização da inibição gabaérgica está envolvida na atividade anticonvulsivante do valproato, barbituratos, benzodiazepínicos, bem como vigabatrina, tiagabina, gabapentina, felbamato e topiramato. A inibição glutamatérgica também faz parte do efeito anticonvulsivante de alguns fármacos antigos e novos, como por exemplo, o topiramato (para revisão ver Löscher, 1998).

Levando em conta que a epilepsia se constitui em um processo multifatorial, o desenvolvimento de anticonvulsivantes com diversos mecanismos de ação apresenta vantagens comparadas aos fármacos de efeito seletivo que atuam em apenas um canal ou neurotransmissor específico (Löscher, 1998).

Existem três estratégias pré-clínicas utilizadas para o desenvolvimento de novos fármacos anticonvulsivantes (Löscher, 1998):

1. Seleção aleatória de novos compostos químicos sintetizados, os quais fazem parte de diversas categorias estruturais com atividade anticonvulsivante em modelos animais;
2. Variação estrutural de fármacos anticonvulsivantes conhecidos;
3. Desenvolvimento racional "mecanismo-relacionado", baseado no conhecimento de eventos fisiopatológicos básicos envolvidos na crise ou epilepsia.

Os modelos de epilepsia em animais experimentais ainda fazem parte dos pré-requisitos importantes na busca pré-clínica por novos fármacos anticonvulsivantes (Löscher, 1998; White, 2003). O efeito anticonvulsivante de todos os fármacos de primeira geração, exceto os brometos e o fenobarbital, foi primariamente determinado em modelos animais de eletrochoque máximo ou teste de pentilenotetrazol (PTZ), demonstrando a predição da atividade clínica do fármaco nesses modelos (Löscher, 1998). Assim como os fármacos de primeira geração, o efeito anticonvulsivante de novos compostos clinicamente efetivos, como o levetiracetam e remacemida, por exemplo, foi determinado por modelos experimentais em animais, substanciando a premissa de que a atividade clínica pode ser predita dessa maneira (Löscher, 1998; Nehlig & Boehrer, 2003).

### 1.3 Modelos Experimentais

Os modelos experimentais são de grande utilidade no estudo de epileptogênese e estratégias de tratamento de crises epiléticas. Entre os modelos experimentais mais utilizados, cabe ressaltar o eletrochoque máximo (Löscher e cols., 1991), os modelos químicos, incluindo o PTZ (Velisek e cols, 1992) e a pilocarpina (Turski e cols., 1987) e os modelos audiogênicos genéticos como o WAR – Wistar Audiogenic Rat (Doretto e cols, 2003), GEPR – Genetically Epilepsy Prone Rat (Dailey & Jobe, 1985); e AS – Wistar Audiogenic Sensitive Rat (Kiesmann e cols, 1988; Rigoulot e cols., 2003).

É possível relacionar manifestações epiléticas clônicas e tônicas a diferentes substratos anatômicos (Gale, 1988; Magistris e cols., 1988). Assim, os modelos animais podem ser classificados em modelos de prosencéfalo e de tronco encefálico, de acordo com os substratos neurais primariamente envolvidos (Browning & Nelson, 1986; Browning, 1987). As crises que envolvem o prosencéfalo são caracterizadas por espasmos clônicos, imobilidade, abalos mioclônicos, mioclonia de face e membros anteriores, progredindo para elevação do corpo e quedas (Racine, 1972; Browning, 1987). Doses baixas de agentes pró-convulsivantes como o PTZ, pilocarpina, bicuculina e correntes de intensidade baixa de eletrochoque transcorneal são exemplos de modelos animais que recrutam o prosencéfalo. Já as crises mediadas pelo tronco encefálico envolvem convulsões tônico-clônicas que podem ou não ser precedidas pela corrida em fuga (Browning e cols., 1987,

Gale, 1988). Essas crises podem ser induzidas por correntes de intensidade baixa ou alta de eletrochoque, eletrochoque transcorneal e frontal em altas correntes, altas doses de PTZ e bicuculina ou estímulo sonoro apropriado em animais audiogênicos (Browning e cols., 1985; Browning & Nelson, 1986; Browning, 1987; Browning e cols., 1994; Doretto e cols., 2003). Tanto o prosencéfalo quanto o tronco encefálico possuem condições de originar crises convulsivas, sendo que cada um deles pode iniciá-las e sustentá-las na ausência do outro (Browning & Nelson, 1986; Browning e cols., 1993).

Uma das limitações centrais dos modelos utilizados para seleção de anticonvulsivantes é que a eficácia de um fármaco é avaliada pela sua habilidade em limitar uma convulsão evocada num animal normal, sendo que as convulsões clínicas associadas à epilepsia humana surgem espontaneamente de um substrato do sistema nervoso central alterado (Stables e cols., 2002). Assim, os modelos genéticos de crises convulsivas generalizadas têm uma função importante na elucidação de aspectos farmacológicos, eletrofisiológicos e neuroetológicos de crises generalizadas (Garcia-Cairasco e cols., 1996; Moraes e cols., 2000).

### **1.3.1 Crise audiogênica em WAR**

Uma linhagem de ratos Wistar selecionados geneticamente, Wistar Audiogenic Rat (WAR), com susceptibilidade epiléptica audiogênica é estudada em nosso laboratório - Núcleo de Neurociência (NNC). Nesses animais, um estímulo sonoro de alta intensidade (120 dB SPL) induz crise

convulsiva do tipo tônico-clônica generalizada seguida por espasmos clônicos (Kiesmann e cols., 1988, Doretto e cols., 2003).

Os substratos neurais da crise audiogênica incluem o colículo inferior, camadas profundas do colículo superior, formação reticular, substância negra e substância cinzenta periaquedutal. O colículo inferior parece ser uma das áreas mais críticas do mesencéfalo envolvido na gênese da crise (Garcia-Cairasco e cols., 1993, 1996; Faingold, 1999; Garcia-Cairasco, 2002). As crises audiogênicas compartilham substratos neuroanatômicos e neuroquímicos com outros modelos de crise tônico-clônica generalizada (Faingold, 1999; Garcia-Cairasco, 2002).

O sistema gabaérgico tem um importante papel nas crises audiogênicas (Doretto e cols., 1994, Faingold, 1999; Garcia-Cairasco, 2002). Aparentemente os WARs, de maneira semelhante aos GEPERs apresentam deficiência nesses mecanismos inibitórios. As anormalidades neuroquímicas responsáveis pela susceptibilidade das crises audiogênicas também incluem os sistemas noradrenérgicos, serotoninérgicos, opioidérgico, histaminérgico e purinérgico (Dailey & Jobe, 1985; Faingold, 1999; Faingold & Casseber, 1999; Feng & Faingold, 2000).

Nas crises audiogênicas, a repetição dos estímulos sonoros de acordo com protocolos apropriados modifica a expressão motora dessas crises para um padrão semelhante a crises límbicas, também chamadas de crises do lobo temporal (Vergnes e cols., 1987; Naritoku e cols., 1992; Garcia-Cairasco e

cols., 1996; Garcia-Cairasco, 2002). Essa modificação na expressão motora ocorre devido ao recrutamento de novos substratos neurais, tais como a amígdala, hipocampo e córtex (Garcia-Cairasco e cols., 1996; Moraes e cols., 2000). Esse recrutamento de estruturas límbicas através de estimulações repetitivas foi denominado abrasamento audiogênico (Vergnes e cols., 1987). Se o recrutamento límbico for re-avaliado com um novo estímulo sonoro, após um intervalo de tempo sem estímulo, observa-se permanência da fenomenologia da crise límbica, dependente de rearranjos na amígdala, córtex piriforme e perirrinal (Garcia-Cairasco e cols., 1996). Esses dados mostram interação e modulação existente entre os substratos neuronais mesencefálicos e prosencefálicos (Garcia-Cairasco, 2002; Moraes e cols., 2000).

Os WARs são utilizados em estudos de mecanismos neurais epileptogênicos, de memória e neuroplasticidade, além da avaliação de fármacos, como a dipirona e semicarbazonas (Garcia-Cairasco e cols., 1996; Doretto e cols., 1998; Beraldo e cols., 2002; Teixeira e cols., 2003; Pimenta, 2004).

### **1.3.2 Modelo de PTZ**

O PTZ é um derivado tetrazol com atividade convulsivante consistente em várias espécies, como ratos, camundongos, gatos, cães e primatas, quando administrado por via sistêmica (Fisher, 1989, Sechi e cols., 1997). Esse convulsivante é empregado como modelo químico de crises convulsivas agudas, comumente utilizado em estudos de epilepsia, pesquisa estrutura-

atividade, desenhos de fármacos mecanismo-orientado e outras abordagens envolvendo o desenvolvimento de novos compostos anticonvulsivantes (Löscher e cols., 1991; Isoherranen e cols., 2001; Kitano e cols., 2005). A sua administração repetida, em doses subconvulsivantes, em ratos, produz sensibilização ou abasamento químico (Giorgi e cols., 1991). Alguns fármacos como etosuximida, trimetadiona e valproato foram identificados com atividade anticonvulsivante nesse modelo (Löscher, 2002).

O tipo e a gravidade da crise induzida pelo PTZ estão relacionados à dose e via de administração utilizada (Löscher e cols., 1991). No teste de PTZ subcutâneo (s.c.), doses entre 80 a 100 mg/kg em camundongos e 70 a 90 mg/kg em ratos são capazes de induzir crises clônicas generalizadas em todos os animais do grupo. Doses maiores são necessárias para induzir crises tônicas (Löscher e cols., 1991).

Os eventos comportamentais após a infusão de PTZ são seqüenciais. Após a sua administração sistêmica, i.v. ou i.p., inicialmente observa-se abalos mioclônicos, que se tornam contínuos, podendo levar a crises tônico-clônicas generalizadas (Fisher, 1989; Browning, 1994).

As crises motoras clônicas podem ser denominadas crises mínimas, e as generalizadas tônico-clônicas, crises máximas (Velisek e cols., 1992). Em 1987, Pohl e Mares estabeleceram a seguinte escala comportamental do modelo de PTZ:

1. Abalos mioclônicos isolados;
2. Crises mínimas atípicas (apenas poucos componentes presentes);
3. Crises mínimas (mioclonia de cabeça e membros anteriores, com elevação de cauda e mastigação eventuais);
4. Crises máximas sem o componente tônico;
5. Crises máximas tônico-clônicas.

Esses comportamentos são utilizados amplamente em estudos de avaliação de fármacos anticonvulsivantes. Swinzard, em 1989, propôs um ponto de corte – limiar para crise – como sendo o primeiro episódio de atividade clônica generalizada de pelo menos 5 segundos (Löscher e cols., 1991). Green e Murray, no mesmo ano, propuseram o abalo mioclônico como ponto de corte. A escolha do abalo mioclônico, como ponto de corte, é mais confiável para a diferenciação de diferentes classes de fármacos anticonvulsivantes. Esses autores também sugeriram o uso da  $TID_{20}$  (dose que aumenta o limiar da crise em 20 %) para a determinação da potência desses fármacos em ratos, mostrando resultados preditivos com esse parâmetro quando relacionado com crises em humanos – valor que se aproxima à concentração plasmática de pacientes.

Considerando a relação entre estruturas encefálicas e geração de padrões motores, podemos localizar as bases neurais associadas a esses comportamentos convulsivos. Já que crises mínimas não podem ser induzidas em animais com transecção mesencefálica, sua origem pode estar



localizada em camadas profundas no prosencéfalo (Browning, 1985; Browning & Nelson, 1986). Estudos em felinos corroboram essa hipótese (Magistris e cols., 1988). Por outro lado, o gerador de crises generalizadas tônico-clônicas pode estar localizado no tronco encefálico (Browning, 1985; Browning & Nelson 1986; Magistris e cols., 1988). Estudos realizados com injeção direta de convulsivantes no tecido encefálico mostraram baixa sensibilidade do tronco encefálico ao PTZ, com maior ativação de regiões da formação reticular mesencefálica (Faingold & Caspary, 1987). A injeção de  $\gamma$ -vinil-GABA, um inibidor da degradação de GABA, bloqueia crises induzidas por PTZ quando injetadas na formação reticular, hipotálamo medial anterior e hipotálamo caudal (Miller e cols., 1987).

Enfocando a sua farmacodinâmica, o PTZ parece interagir com o complexo receptor GABA-benzodiazepínico-ionóforo-cloreto (Fisher, 1989). A sua atividade convulsivante utilizando o mecanismo via íons cloreto foi descrita por Pellmar & Wilson em 1977 (Faingold & Caspary, 1987). Estudos eletrofisiológicos confirmam essa hipótese, mostrando que o PTZ inibe a corrente de íons cloreto ativados por GABA de maneira concentração-dependente e voltagem-independente (Huang e cols., 2001). Wash e cols. (1999) observaram que infusão dose única de PTZ em ratos, promove alterações transitórias nos níveis de mRNA do receptor GABA<sub>A</sub>, além de afetar a estimulação em sítios benzodiazepínicos no receptor GABA<sub>A</sub>. Alguns estudos sugerem a contribuição de aminoácidos excitatórios nos efeitos convulsivantes do PTZ, sendo que essa atividade nos receptores n-metil-d-

aspartato (NMDA) pode estar relacionada à redução da neurotransmissão gabaérgica (Sechi e cols., 1997).

Löscher e cols., em 1991, avaliaram o efeito de oito fármacos anticonvulsivantes após a infusão de PTZ s.c. e i.v., delineando alguns fatores técnicos, biológicos e farmacológicos que devem ser controlados durante um experimento. Gênero, idade, dieta, temperatura e ritmo circadiano devem ser mantidos padronizados e constantes para garantir resultados válidos. Segundo o autor, a variabilidade de resposta entre os diferentes trabalhos, empregando um mesmo fármaco no modelo de PTZ, se deve a esses fatores, bem como a escolha do ponto de corte, via de administração, farmacocinética do fármaco, dose-resposta não linear e linhagens (Löscher e cols., 1991). A sazonalidade também pode interferir no limiar de PTZ apesar da padronização das condições ambientais em laboratório – temperatura e fotoperíodo. Alterações sazonais no campo geomagnético podem levar a variação na produção de melatonina pela pineal atuando como um *Zeitgeber* – sincronizador sazonal (Löscher & Fiedler, 1996).

O modelo experimental de crise convulsiva utilizando dose limiar de PTZ em cão também é bem estabelecido na literatura, sendo utilizado para avaliação e seleção de fármacos anticonvulsivantes (Sechi e cols., 1997; Löscher e cols., 2004).

## 1.4 Semicarbazonas

As semicarbazonas fazem parte de uma classe de compostos com amplo perfil farmacológico; com efeitos antichagásico, anticonvulsivante, hipnótico, pesticida e herbicida (para revisão ver Beraldo, 2004). A atividade anticonvulsivante do grupo tem sido investigada em modelos experimentais de epilepsia induzida por eletrochoque máximo e PTZ em ratos, mostrando-se mais eficaz em eletrochoque máximo (Dimmock e cols., 1993; Dimmock e Baker, 1994; Pandeya e cols., 2000). Quando utilizadas por via oral, as semicarbazonas apresentam maior potência e menor neurotoxicidade. Esses compostos, assim como muitos outros fármacos usados na clínica, apresentam os requisitos estruturais necessários à atividade anticonvulsivante, mas não contêm a função dicarboximida (COM(R)CO), a qual pode contribuir para o aparecimento de efeitos tóxicos (Dimmock e cols., 1993). A atividade anticonvulsivante ocorre devido à característica bifuncional, possuindo grupamento lipofílico (anel aromático) e ligante de hidrogênio (grupo terminal semicarbazona, N1-N2-C8(O)-N3 (Dimmock e cols., 1995).

Beraldo e colaboradores, em 2002, empregaram a estratégia *host-guest*, preparando compostos de inclusão de benzaldeído semicarbazona (BS) em  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) e em hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD) com o objetivo de alterar a farmacocinética do BS. Essa estratégia melhora a atividade anticonvulsivante do fármaco, permitindo a utilização de doses menores com menos efeitos colaterais. Esses compostos foram testados

quanto à atividade anticonvulsivante no modelo do eletrochoque máximo e no modelo audiogênico em ratos, observando um decréscimo significativo da sua dose anticonvulsivante eficaz (Beraldo e cols., 2002; Teixeira e cols., 2003).

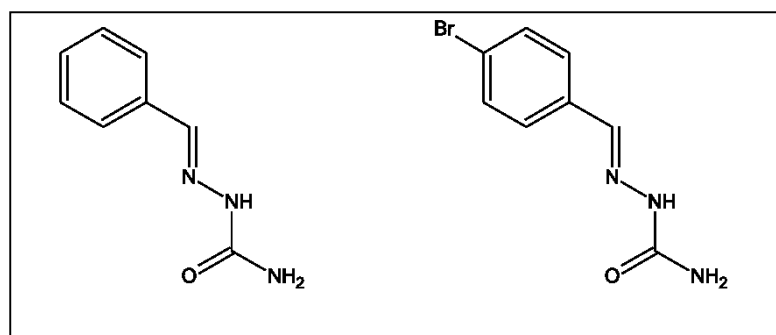
Foram realizadas várias modificações estruturais na molécula do benzaldeído semicarbazona, tais como a introdução do átomo bromo no seu anel aromático. Esta nova estrutura foi denominada 4-bromobenzaldeído semicarbazona (BrBS) (Figura 1), escolhida como protótipo pelo "National Institute of Health" (NIH) americano devido a sua excelente potência e alto índice de proteção no modelo de eletrochoque máximo. A sua atividade anticonvulsivante frente a diferentes crises epiléticas e seus efeitos adversos ainda é assunto de investigação (Dimmock & Baker, 1994; Dimmock e cols., 1995).

O composto não apresenta propriedades pró-convulsivantes em camundongos, bem como não foram observadas tolerância e indução enzimática após sua administração em ratos. Alguns testes foram realizados, como *rotarod test* em camundongos e avaliação para ataxia, perda de resposta de posicionamento e tônus muscular em ratos. O BrBS apresentou baixa toxicidade comparado à fenitoína, carbamazepina e valproato (Dimmock & Baker, 1994).

O mecanismo de ação do BrBS ainda não foi elucidado. O BrBS produziu efeito protetor nas crises induzidas por picrotoxina e inibiu a ligação de

[<sup>3</sup>H]GABA ao receptor em 21 %, sugerindo fraca atividade farmacodinâmica gabaérgica. Porém, esse fármaco não promoveu inibição de GABA transaminase ou alterou as concentrações de [<sup>3</sup>H]GABA no encéfalo de rato após doses de 100 a 600 mg/kg. O BrBS também não deslocou o [<sup>3</sup>H]flunitrazepam do seu sítio, mostrando ausência de interação a receptores benzodiazepínicos. Além do mais, esse fármaco não foi eficaz nos modelos de bicuculina e estriquinina. Assim, apesar de aparentemente interagir com receptores de GABA nos canais para cloreto, o BrBS apresenta um fraco efeito antagonista gabaérgico e parece ter assim mecanismos de ação anticonvulsivante diferentes da maioria dos fármacos em uso clínico (Dimmock & Baker , 1994)

A investigação da atividade anticonvulsivante do BrBS é parte do projeto que está sendo desenvolvido pelo Núcleo de Neurociências do Instituto de Ciências Biológicas em colaboração com a Profa. Dra. Heloísa Beraldo do Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da UFMG (Beraldo e cols., 2002).



**Figura 1** - Benzaldeído Semicarbazona e Bromo Benzaldeído Semicarbazona.

## 1.5 Epilepsia em cães

Epilepsia é a patologia neurológica crônica mais comum em cães, com prevalência estimada entre 0,5 a 5,7 % (Shell, 1993; March, 1998; Chandler, 2006). Há uma grande necessidade de estudos descritivos em epilepsia canina (Berendt & Dam, 2003), pois muito do que se conhece vem de observações e estudos da epilepsia no homem. Em medicina veterinária, existem poucos trabalhos clínicos padronizados que mostram dados epidemiológicos, análises descritivas e registros eletroencefalográficos em cães. Licht e cols., em 2002, num estudo descritivo, desenvolveram um sistema de classificação de epilepsias para cães baseado na classificação da ILAE utilizada em seres humanos. A padronização dessa classificação permite a comparação entre os diferentes trabalhos de epilepsia canina além da comparação dos tipos de crise e síndromes epilépticas encontradas em cães com as encontradas em humanos.

Em cães, as epilepsias não são diferenciadas em síndromes, no entanto, similarmente aos humanos, as crises são classificadas em parciais ou generalizadas (Berendt, 2004). As crises parciais podem ser subdivididas em simples e complexas, dependendo do comprometimento da consciência. Nas crises parciais simples, geralmente ocorrem sintomas sensoriais ou motores sem o comprometimento da consciência como, por exemplo, as crises focais faciais ou mordedura excessiva de uma determinada região do corpo. Os animais com crise parcial complexa apresentam comprometimento da consciência acompanhado de vários distúrbios motores, podendo exibir

atividades comportamentais bizarras como “morder o ar”. Essas crises parciais podem progredir para generalização secundária (Podell, 1996). As crises generalizadas são subdivididas em convulsivas e não-convulsivas. As convulsivas são caracterizadas pelo comprometimento da consciência associado a sinais motores bilaterais tônico-clônicos, tônicos, mioclônicos ou atônicos e as não-convulsivas são pouco documentadas na clínica de pequenos animais (Podell, 1996).

O fenobarbital é o fármaco de escolha para cães, devido ao seu baixo custo, tolerância e boa eficácia. No entanto, alguns efeitos adversos como sonolência, polifagia, polidipsia e degeneração hepática dificultam o seu uso em muitos animais. Além disso, o uso contínuo leva a uma redução progressiva na meia-vida de eliminação devido à auto-indução das enzimas microsossomais hepáticas (Podell, 1996).

O brometo é o segundo fármaco utilizado na epilepsia canina e é utilizado em casos refratários ao fenobarbital. Aproximadamente 25 % desses pacientes têm boa resposta ao brometo de potássio. Apesar de ser um medicamento bem tolerado pelos cães, pode levar a alguns efeitos colaterais como ataxia, depressão, estupor, dor muscular, alterações dermatológicas e gastrointestinais (Podell, 1996). O brometo de potássio foi introduzido como tratamento anticonvulsivante para humanos, em 1853, devido a suas características antiafrodisíacas, numa época em que a epilepsia era atribuída à masturbação. Foi amplamente utilizado por 59 anos, sendo substituído por

outros fármacos devido a sua alta toxicidade envolvendo o sistema nervoso central, a pele e o trato gastrointestinal (Ryan & Baumann, 1999).

Enquanto esses fármacos podem melhorar a qualidade de vida de muitos pacientes, aproximadamente 30% não respondem à terapia e eventualmente morrem devido a complicações associadas a crises recorrentes (Dyer e Shell, 1993) ou são eutanasiados.

Existem muitas limitações na seleção de fármacos anticonvulsivantes na medicina veterinária. Muitos dos anticonvulsivantes disponíveis para o homem são inadequados para uso contínuo em cães (Löscher e cols., 2004), devido principalmente a toxicidade, tolerância, farmacocinética inapropriada e custo (Knowles, 1998; Podell, 1996). Assim, muitos fármacos anticonvulsivantes licenciados para uso em seres humanos, como a carbamazepina, oxcarbazepina, ácido valpróico, gabapentina, felbamato, vigabatrina entre outras, não tem a mesma eficácia em cães (Berendt, 2004). A fenitoína, por exemplo, apresentou uma eficácia menor que 2 % nos animais estudados comparados com 48 % e 53 % nos cães submetidos ao tratamento com fenobarbital e primidona, respectivamente. Muitos outros medicamentos, quando usados em cães, apresentam o mesmo problema. A meia-vida curta resulta em incapacidade de manter concentrações séricas no nível terapêutico e o desenvolvimento de tolerância metabólica, com o seu uso crônico, exige dose maior para manutenção da mesma concentração terapêutica (Podell, 1996; Berendt, 2004).



Esses fatos mostram a necessidade do desenvolvimento de novos compostos com boa tolerância e eficácia para o controle de crises epiléticas em cães, uma vez que estas crises e as medicações usadas para controlá-las comprometem a qualidade de vida desses animais e de seus proprietários (Licht e cols., 2002).

## **1.6 Cálculo alométrico**

A alometria se iniciou com os trabalhos na pediatria em 1960, quando os médicos calculavam as dosagens de medicação para crianças através da medida da superfície corporal ( $\text{mg}/\text{m}^2$ ) (para revisão ver Sousa, 2006).

O cálculo alométrico considera a relação entre as diferentes características dos animais relacionadas a seus tamanhos corporais. Um pequeno animal, quando comparado com um maior, apresenta tempo total de circulação menor, maior densidade de capilares por área de tecido, maior superfície de trocas gasosas, taxa de filtração glomerular mais alta, mais elementos hepáticos e maior número de mitocôndrias e citocromos em uma área corporal (Sedgwick, 1993).

Os princípios de extrapolação alométrica pressupõem que a variação desses parâmetros fisiológicos apresente a mesma proporcionalidade da variação dos parâmetros farmacocinéticos. Partindo dessa premissa e utilizando dados disponíveis de uma determinada espécie em que tenham sido efetuados estudos farmacocinéticos e farmacodinâmicos ou em que existam

doses medicamentosas estabelecidas empiricamente, pode-se determinar doses para animais alvos a partir daquelas utilizadas em “animais modelos” (para revisão ver Sousa, 2006).

A taxa metabólica basal - gasto energético mínimo - é considerada o melhor caminho para comparação entre organismos diferentes e é a base para o desenvolvimento da escala alométrica, uma vez que a absorção, a distribuição e a eliminação de todos os fármacos ocorrem em função da taxa metabólica basal (para revisão ver Sousa, 2006).

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo Geral**

Investigar a atividade do composto Bromo Benzaldeído Semicarbazona (BrBS) em três modelos experimentais de epilepsia.

### **2.2 Objetivos Específicos**

1. Avaliar a eficácia anticonvulsivante do BrBS no modelo de crise audiogênica em WARs pela determinação do índice de gravidade, latência e porcentagem de ocorrência da primeira corrida (C1) e do componente tônico (CVT) nos animais que receberam diferentes doses de BrBS;
2. Padronizar a metodologia para determinação do limiar de PTZ em ratos Wistar utilizando a via intravenosa pela veia da cauda em ratos não anestesiados;
3. Avaliar a eficácia anticonvulsivante do BrBS no modelo de crise induzida por PTZ em dose limiar em ratos;
4. Padronizar a metodologia para determinação do limiar de PTZ utilizando a via intravenosa pela veia cefálica em cães não anestesiados;
5. Avaliar a eficácia anticonvulsivante do BrBS no modelo de crises induzidas por PTZ em dose limiar em cães.

### **3. Material e métodos**

#### **3.1 Animais**

Foram utilizadas 44 ratas fêmeas de 250 gramas da colônia WAR, criadas e mantidas no biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (Doretto e cols., 2003), e 49 Wistar normais fêmeas procedentes da população geral do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (CEBIO). Os animais tiveram livre acesso à água e ração comercial, e ciclo de claro-escuro de 14/10 horas, iniciando o período de luz às 6 horas da manhã.

Foram utilizados 5 (cinco) cães machos, jovens, sem raça definida, de peso entre 5 e 10 kg, procedentes do canil do Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura de Belo Horizonte, MG e mantidos no canil experimental da Escola de Veterinária da UFMG durante todo o experimento, com livre acesso à água e ração comercial, com passeios diários nas cercanias do canil. No período de quarentena (30 dias) os animais foram examinados para possíveis doenças infecto-contagiosas e patologias neurológicas. Foram também vacinados (Recombitek/Merial Saúde Brasil), submetidos a tratamento antiparasitário (Cardomec e Frontline Plus/Merial Saúde Brasil) e exames complementares tais como: hemograma, bioquímica sérica e pesquisa para leishmaniose. Foram mantidos no experimento, os animais que se

apresentaram sadios. Ao final dos experimentos, os animais foram eutanasiados conforme item 3.3.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CETEA) e os protocolos conduzidos de acordo com as normas éticas estabelecidas por esse comitê.

### **3.2 Fármacos**

O PTZ (Research Biochemical International®) foi diluído em solução de salina 0,9%. O BrBS foi sintetizado no Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Esse composto foi preparado para administração oral na forma de suspensão a 4% em carboximetilcelulose 5% (CMC).

### **3.3 Eutanásia**

Ao término dos experimentos, os ratos foram eutanasiados por decapitação em guilhotina. Os cães foram submetidos à anestesia geral com tiopental sódico (25 mg/kg; i.v.) e eutanasiados com cloreto de potássio. Os cães foram submetidos à necrópsia para avaliação anatomohistopatológica.

### **3.4 Crise audiogênica em WAR**

#### **3.4.1 Estimulação sonora e avaliação comportamental das crises**

As WARs foram submetidas à avaliação da susceptibilidade epiléptica audiogênica – *screening* – aos 70, 74 e 78 dias de idade. O estímulo sonoro foi aplicado dentro de um cilindro de acrílico transparente de 32 cm de altura, com base de 30 cm de diâmetro, o qual não interfere na expressão motora da crise audiogênica e ao mesmo tempo facilita sua visualização. Esse cilindro de acrílico é posicionado dentro de uma câmara de 45X45X40 cm cujas paredes internas são revestidas por material que garante isolamento acústico. O acesso visual é possível em toda parte frontal da câmara de estimulação (Garcia-Cairasco & Sabbatini, 1983; Moraes, 1998).

O sistema de estimulação sonora consiste de um amplificador de 15 watts, IHF, um alto falante (tweeter - 4W, TLX1e, 5-20 KHz) e uma fonte de alimentação (12V, 3A). Nesse sistema é aplicado o sinal de uma campainha elétrica, gravado em CD e executado por um tocador de CD. A intensidade do estímulo é ajustada por meio do controle de volume áudio, sendo que se colocado no máximo da escala, a intensidade sonora equivale a 120 dB SPL (*Sound Pressure Level*). O alto-falante, instalado no teto do cilindro de acrílico, se conecta ao amplificador por meio de uma chave que possui a finalidade de iniciar e interromper o som abruptamente quando assim se desejar (Moraes, 1998).

Cada animal foi colocado na caixa de estimulação e o som de intensidade máxima foi aplicado até que o animal apresentasse convulsão ou até o tempo máximo de 1 (um) minuto. A gravidade das crises foi avaliada pelo índice de gravidade (IS), de acordo com a metodologia previamente descrita por Garcia-Cairasco & Sabbatini (1983) e posteriormente aprimorada por Garcia-Cairasco e cols. (1996). Esse índice representa uma escala linear de gravidade gradual variando de 0 a 1 e leva em conta a seqüência de eventos característicos das crises audiogênicas. São considerados os aparecimentos das fases procursiva e convulsiva, sendo que quanto mais grave for o comportamento, maior será o seu valor no índice (Garcia-Cairasco e cols, 1996). As fases procursivas consistem de episódios de corrida e pulos e quedas atônicas. Os valores de IS freqüentemente observados estão representados na tabela 1.

<b>ÍNDICE</b>	<b>COMPORTAMENTO</b>
0,00	Ausência de qualquer comportamento convulsivo
0,11	Um episódio de corrida
0,23	Um episódio de corrida + pulos e quedas atônicas
0,38	Dois episódios de corrida + pulos e quedas atônicas
0,61	Todos os comportamentos anteriores + convulsão tônica com arqueamento dorsal da cabeça
0,73	Todos os comportamentos anteriores + convulsões clônicas parciais e generalizadas
0,85	Todos os comportamentos anteriores + Espasmos clônicos
0,90	Todos os comportamentos anteriores + flexão ventral da cabeça
0,95	Todos os comportamentos anteriores + hiperextensão dos membros anteriores
1,00	Hiperextensão de membros anteriores e posteriores

**Tabela 1.** Comportamentos mais freqüentemente observados nos animais submetidos à estimulação sonora e seus respectivos índices de gravidade (Garcia-Cairasco e Sabbatini, 1983 e Garcia-Cairasco e cols., 1996).

Todos os animais WARs utilizados neste trabalho apresentaram  $IS \geq 0,85$  ao início dos experimentos, o que significa a presença de convulsões tônico-clônicas generalizadas seguidas de espasmos clônicos nos três testes do *screening* (Doretto e cols., 1998).

### **3.4.2 Protocolo Experimental**

Todos os experimentos foram realizados entre 16 e 20 h, para evitar interferência de variações circadianas na resposta obtida. A sala e os pesquisadores foram mantidos constantes durante todo o protocolo. Cada animal foi utilizado uma única vez.

Os animais foram divididos em 7 grupos de acordo com os tratamentos seguintes:

1. Controle (CMC 0,5%), n=9
2. BrBS (50 mg/kg), n=5
3. BrBS (100 mg/kg), n=6
4. BrBS (150 mg/kg), n=6
5. BrBS (200 mg/kg), n=7
6. BrBS (300 mg/Kg), n=5
7. BrBS (400 mg/Kg), n=6



Todos os animais receberam BrBS por via oral, na dose referente ao grupo, através de uma cânula de gavagem, 2 (duas) horas antes do estímulo sonoro indutor de crise audiogênica, realizado de acordo com o item 3.4.1

Os comportamentos avaliados e quantificados foram: índice de gravidade, latência e porcentagem de ocorrência de primeira corrida (C1) e componente tônico (CVT) e porcentagem de bloqueio do componente tônico (quando  $IS < 0,61$ ).

### **3.4.3 Análise Estatística**

Os dados de IS foram expressos em mediana seguida pelos 1<sup>o</sup> e 3<sup>o</sup> quartis. O teste de Kruskal-Wallis, post-hoc Dunn foi utilizado para comparações múltiplas.

Os dados da latência de C1 e CVT foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média (DPM), analisados por ANOVA – *one way*, post hoc Tukey.

Os dados de porcentagem de ocorrência dos comportamentos C1 e CVT e bloqueio do componente tônico foram analisados por tabela de contingência (Teste exato de Fisher). A hipótese nula foi rejeitada para  $p < 0,05$ .

O programa utilizado para análise dos dados foi o Prism® versão 4, 2003.

### **3.5 Crise aguda induzida por PTZ endovenoso em ratos.**

#### **3.5.1 Protocolo experimental**

Todos os experimentos foram realizados entre 11 e 16 h, para evitar interferência de variações circadianas na resposta obtida (Löscher e cols., 1991). A sala e os pesquisadores foram mantidos constantes durante todo o protocolo. Cada animal foi utilizado uma única vez.

Os animais foram previamente mantidos em uma caixa de madeira aquecida com uma lâmpada incandescente, durante 5 (cinco) minutos, para promover uma vasodilatação periférica. Cada animal foi colocado em um contensor de madeira para imobilização e exposição da cauda, permitindo a identificação da sua veia coccígea e posterior cateterização, utilizando-se um cateter endovenoso (Angiocath 24/BD). O cateter foi fixado com esparadrapo e mantido até o momento da infusão de PTZ.

Os animais foram divididos em 7 (sete) grupos, de acordo com os tratamentos seguintes:

1. Controle (CMC 0,5 %), n = 8
2. BrBS (50 mg/kg), n = 6
3. BrBS (100 mg/kg), n = 8
4. BrBS (150 mg/kg), n = 6
5. BrBS (200 mg/kg), n = 9
6. BrBS (300 mg/Kg), n = 5

## 7. BrBS (400 mg/Kg), n = 7

Todos os animais receberam BrBS por via oral, na dose referente ao grupo, através de uma cânula de gavagem, 2 (duas) horas antes do início da infusão de PTZ.

A solução de PTZ (10 mg/ml em salina 0,9 %) foi infundida na veia da cauda, utilizando-se uma bomba de infusão (Infusion Pump 680 – Samtronic) na taxa de 1 ml/min. Durante a infusão os animais permaneceram com livre movimentação dentro de uma caixa de acrílico de 45 cm<sup>3</sup>. Esses procedimentos foram realizados de acordo com Löscher e cols. (1991).

Os comportamentos avaliados e selecionados como ponto de corte, foram: abalo mioclônico, mioclonia parcial e crise generalizada tônico-clônica. A quantidade de PTZ, em mg por kg, necessária para indução desses comportamentos, em cada animal, foi calculada e definida como limiar convulsivo do PTZ.

A administração do PTZ foi interrompida no momento da crise generalizada tônico-clônica ou até completar 5 minutos de infusão.

### **3.5.2 Análise Estatística**

O delineamento inteiramente ao acaso (ANOVA – *one way*) foi utilizado para comparações múltiplas (estudo dose resposta). O contraste ortogonal (Tukey)

foi selecionado a partir do cálculo do coeficiente de variação da análise de variância. Os dados foram expressos em média e desvio padrão da média (DPM). A hipótese nula foi rejeitada para  $p < 0,05$ . O programa utilizado para análise dos dados foi o Prism® versão 4, 2003.

### **3.6 Crise induzida por PTZ endovenoso em cães**

#### **3.6.1 Protocolo experimental**

Todos os experimentos foram realizados entre 10 e 15 h, para evitar interferência de variações circadianas na resposta obtida (Löscher e cols., 1991). A sala e os pesquisadores foram mantidos constantes durante todo o protocolo.

As doses utilizadas em cães foram determinadas por meio de cálculos alométricos, utilizando as doses definidas em ratos no protocolo anterior.

1. Controle (CMC 0,5 %), n = 5
2. BrBS (50 mg/kg), n = 5
3. BrBS (100 mg/kg), n = 5
4. BrBS (150 mg/kg), n = 5
5. BrBS (200 mg/kg), n = 5

Todos os procedimentos experimentais foram realizados nos animais contidos fisicamente, sem qualquer contenção química. Para a determinação da eficácia anticonvulsivante aguda da BrBS foram selecionados 05 (cinco) animais distribuídos de maneira cruzada 5X5 da seguinte maneira :

### **Delineamento experimental**

<b>Cães</b>					
<b>Dia</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>1</b>	50	100	150	200	0
<b>2</b>	100	150	200	0	50
<b>3</b>	200	0	50	100	150
<b>4</b>	0	50	100	150	200
<b>5</b>	150	200	0	50	100

O BrBS foi administrado por via oral 2 (duas) horas antes da determinação do limiar convulsivo. Para determinação do limiar convulsivo do PTZ, os cães foram canulados com cateter (BD/Angiocath 24G) na veia cefálica e infundidos via i.v. com uma solução a 3 % de PTZ em salina 0,9 % numa taxa de 3 ml/min, utilizando-se uma bomba de infusão (Infusion Pump 680 – Samtronic). A administração do PTZ foi interrompida no momento do primeiro abalo mioclônico. As quantidades de PTZ, em mg por kg, necessárias para indução de crise mioclônica parcial e abalo mioclônico em cada animal, foram calculadas e definidas como limiar convulsivo do PTZ para cada comportamento. Esse procedimento foi realizado 5 (cinco) vezes

em cada animal, em intervalos de sete dias para não produzir o abasamento químico. Todo o procedimento foi filmado em fita mini-DV.

Os parâmetros temperatura, frequências cardíaca e respiratória foram aferidos antes e após o término do protocolo da infusão de PTZ em cada animal. Todos os animais foram pesados imediatamente antes de cada experimento. Foram coletadas amostras de sangue para análise de hemograma e bioquímica sérica, antes e depois de todo o experimento. O hemograma reflete o quadro eritrocitário e leucocitário dos animais. O perfil bioquímico sérico oferece informação específica a respeito da distribuição e da atividade do distúrbio hepatobiliar bem como uma estimativa do grau de comprometimento funcional com possíveis alterações na excreção de drogas (Nelson & Couto, 1992).

Ao término da infusão de PTZ, após o primeiro abalo mioclônico, cada animal recebeu diazepam injetável (Valium), 1 mg/kg; i.v., oxigênio e fluidoterapia (salina 0,9%). Quando necessário, o animal era induzido, por meio de máscara, e mantido sob anestesia geral inalatória com isoflurano para bloquear a crise convulsiva. Todos os animais recuperaram os padrões clínicos no mesmo dia da infusão de PTZ e, assim, retornaram para o canil experimental com livre acesso à água e ração. Esses cuidados permitiram a sobrevivência de todos os cães após a infusão do convulsivante e a utilização desses animais por cinco vezes cada.

### **3.6.2 Histopatologia**

Após a eutanásia, foram coletados fragmentos do fígado e de todo o encéfalo dos animais, incluindo o córtex frontal, parietal, occipital e temporal, hipocampo, amígdala e cerebelo. As amostras foram fixadas em formalina 10 % em tampão fosfato, processadas e incluídas segundo as técnicas rotineiras de inclusão em parafina. Secções de 5 µm foram coradas pela técnica de HE e avaliadas sob microscopia óptica para análise morfológica. Esses procedimentos foram realizados no laboratório de patologia da Escola de Veterinária do DCCV-UFMG.

### **3.6.3 Análise Estatística**

Os dados paramétricos foram expressos em média e desvio padrão da média (DPM). Os parâmetros frequência cardíaca, respiratória e temperatura antes e depois de cada experimento e os parâmetros de hemograma e bioquímica sérica antes e depois de todo o protocolo foram analisados pelo test t de *Student*. O peso e as diferenças dos limiares entre os cães e dos limiares entre os dias apresentaram distribuição gaussiana, assim foram avaliados por análise de variância (Quadrado Latino), seguido por post hoc Tukey. O programa utilizado para análise dos dados paramétricos foi o Prism® versão 4, 2003.

Os dados não paramétricos foram expressos por mediana seguida pelos 1° e 3° quartis. A escolha do teste não paramétrico partiu do princípio de que os

grupos não apresentaram distribuição normal (Triola, 1999). A diferença dos limiares entre as doses foi analisada pelo teste de Friedman. O programa utilizado para análise dos dados paramétricos foi o MINITAB® versão 13.20, 2000. A hipótese nula foi rejeitada para  $p < 0,05$ .



## 4. Resultados

### 4.1 Crise audiogênica em WAR

As figuras 2 e 3 mostram os resultados do BrBS no modelo de crise audiogênica em WAR. No grupo controle, todos os animais tratados com CMC 0,5 % apresentaram os comportamentos primeira corrida (C1) e crise convulsiva tônica-clônica (CVT). Nesse grupo, as latências para os comportamentos C1 e CVT foram  $3,1 \pm 1,2$  s e  $21,6 \pm 15,7$  s, respectivamente. O valor da mediana seguido do primeiro e terceiro quartis para o índice de gravidade (IS) foi  $0,90 \pm 0,85/0,95$ .

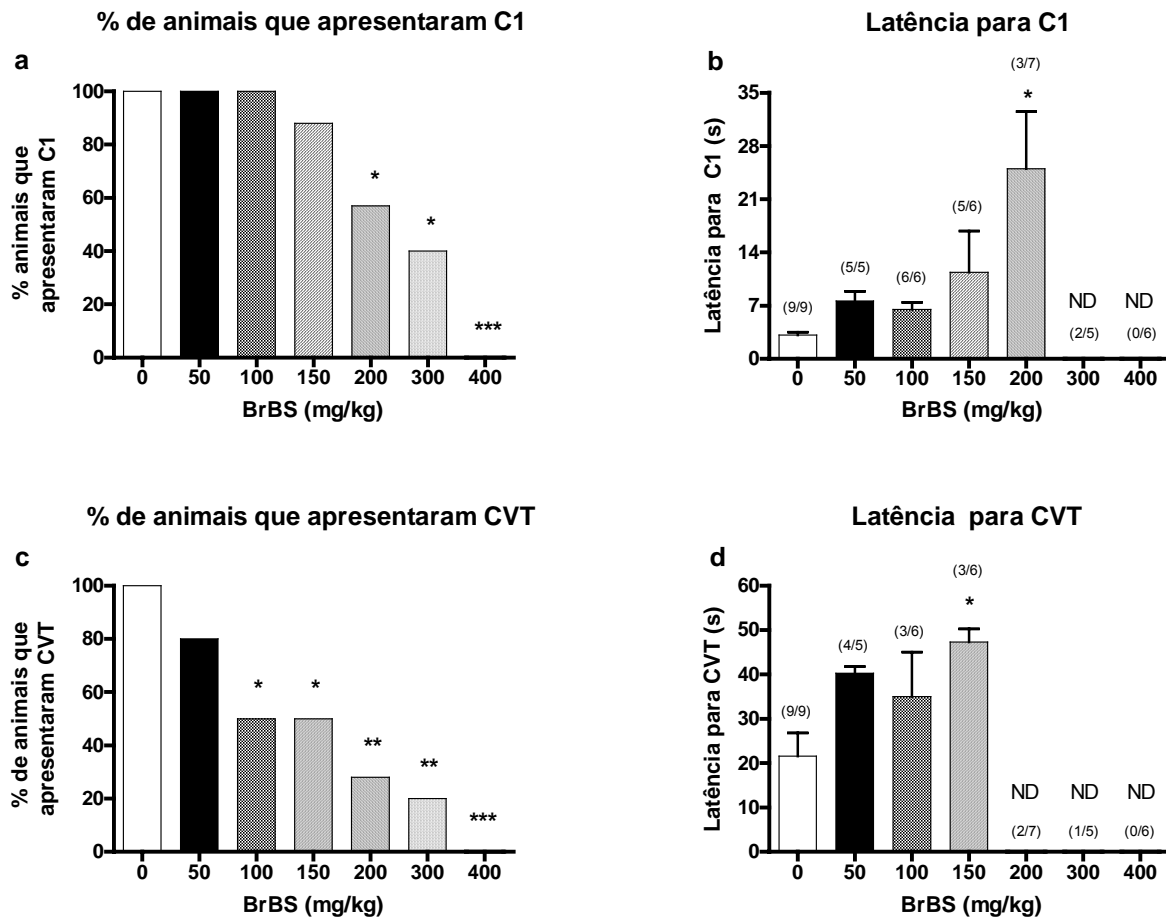
Nas doses de 50, 100 e 150 mg/kg não houve diferenças na porcentagem de ocorrência e na latência para o comportamento C1 em relação ao controle. No entanto, a porcentagem de animais que apresentou o comportamento CVT diminuiu 50 % nas doses de 100 e 150 mg/kg em relação ao controle ( $p < 0,05$ ). A latência para CVT só foi maior na dose de 150 mg/kg ( $48,0 \pm 7,1$  vs  $21,6 \pm 15,7$ ;  $p < 0,05$ ). O IS foi similar ao controle nas doses 50, 100 e 150 mg/kg.

Nas doses de 200 mg/kg foi observado diminuição da porcentagem de animais que apresentaram C1 em 43% ( $p < 0,05$ ), acompanhado do aumento da sua latência em relação ao controle ( $25 \pm 13$  vs  $3,1 \pm 1,2$  s;  $p < 0,05$ ). O comportamento de CVT diminuiu em 72% ( $p < 0,005$ ) em relação ao controle.

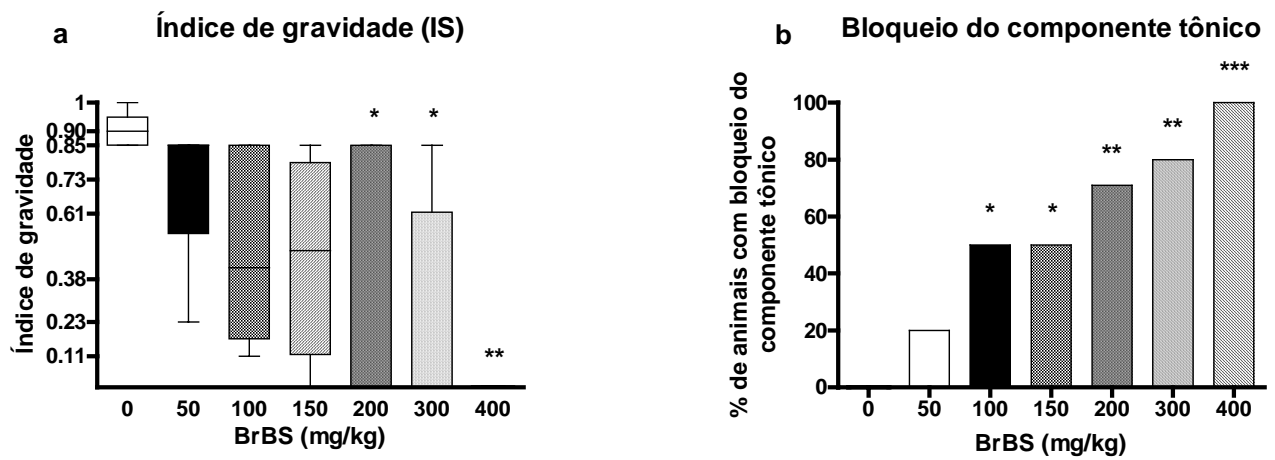
A crise tônico-clônica foi observada somente em dois animais do grupo; assim não foi possível avaliar a sua latência nesse grupo. O IS, expresso em mediana seguido do primeiro e terceiro quartis, para a dose de 200 mg/kg, foi menor que o controle ( $0 \pm 0/0,85$  vs  $0,90 \pm 0,85/0,95$ ,  $p < 0,05$ ).

Na dose de 300 mg/kg somente dois animais apresentaram o comportamento C1. A crise tônico-clônica foi observada somente em um animal do grupo. O IS foi menor em relação ao controle ( $0 \pm 0/0,38$  vs  $0,90 \pm 0,85/0,95$ ;  $p < 0,01$ ).

Na dose de 400 mg/kg nenhum animal apresentou C1 e CVT. O IS foi menor comparado ao controle ( $0 \pm 0/0$  vs  $0,90 \pm 0,85/0,95$ ,  $p < 0,001$ ), com a ausência completa de qualquer comportamento convulsivo em todos os animais.



**Figura 2.** Efeito de dose única de BrBS ou CMC 0,5% (controle) no comportamento de C1 (a e b) e CVT (c e d). O estímulo acústico foi realizado duas horas após a administração do BrBS ou CMC 0,5% via gavagem. A porcentagem de ocorrência do comportamento foi analisada por tabela de contingência – teste exato de Fisher. **a** – \* 200 e 300 vs controle ( $p < 0,05$ ); \*\*\* 400 vs controle ( $p \leq 0,0001$ ); **c** – \*100 e 150 vs controle ( $p < 0,05$ ); \*\*200 e 300 vs controle ( $p < 0,005$ ); \*\*\* 400 vs controle ( $p \leq 0,0001$ ). Os dados da latência são expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média (DPM), analisados por ANOVA, post hoc, Tukey. O número de animais que apresentaram o comportamento sobre o número total de animais utilizados foi especificado em cada grupo. **b** – \* 200 vs controle ( $25 \pm 13$  vs  $3,1 \pm 1,2$  s;  $p < 0,05$ ); **d** – \*150 vs controle ( $48,0 \pm 7,1$  vs  $21,6 \pm 15,7$ ;  $p < 0,05$ ). ND: não determinado



**Figura 3.** Efeito de dose única de BrBS ou CMC 0,5% (controle) no índice de gravidade e bloqueio do componente tônico (IS < 0,61) para crise audiogênica em WAR. O estímulo acústico foi realizado duas horas após a administração do BrBS ou CMC 0,5% via gavagem. Os dados do IS são expressos como mediana seguidos dos 1<sup>o</sup> e 3<sup>o</sup> quartis. Análise estatística – Kruskal-Wallis, post-hoc, Dunn  
**a** – \* 200 vs controle (0 ± 0/0,85 vs 0,90 ± 0,85/0,95, p < 0,05); 300 vs controle (0,90 ± 0,85/0,95; p < 0,01); \*\*400 vs controle (0 ± 0/0 vs 0,90 ± 0,85/0,95, p < 0,001). O bloqueio do componente tônico foi analisado por tabela de contingência – Teste exato de Fisher.  
**b** – \* 100 e 150 vs controle (p < 0,05); \*\*200 e 300 vs controle (p < 0,005); \*\*\* 400 vs controle (p < 0,0001).

## 4.2 Crise induzida por PTZ endovenoso em ratos

Os dados do limiar para abalo, mioclonia parcial e crise generalizada tônico-clônica após a infusão contínua de PTZ estão representados na figura 4. No grupo controle, tratado com CMC 0,5 %, as latências para os comportamentos foram: abalo mioclônico ( $20,50 \pm 3,12$ ), mioclonia parcial ( $25,67 \pm 4,34$ ) e crise generalizada tônico-clônica ( $57,51 \pm 10,59$ ).

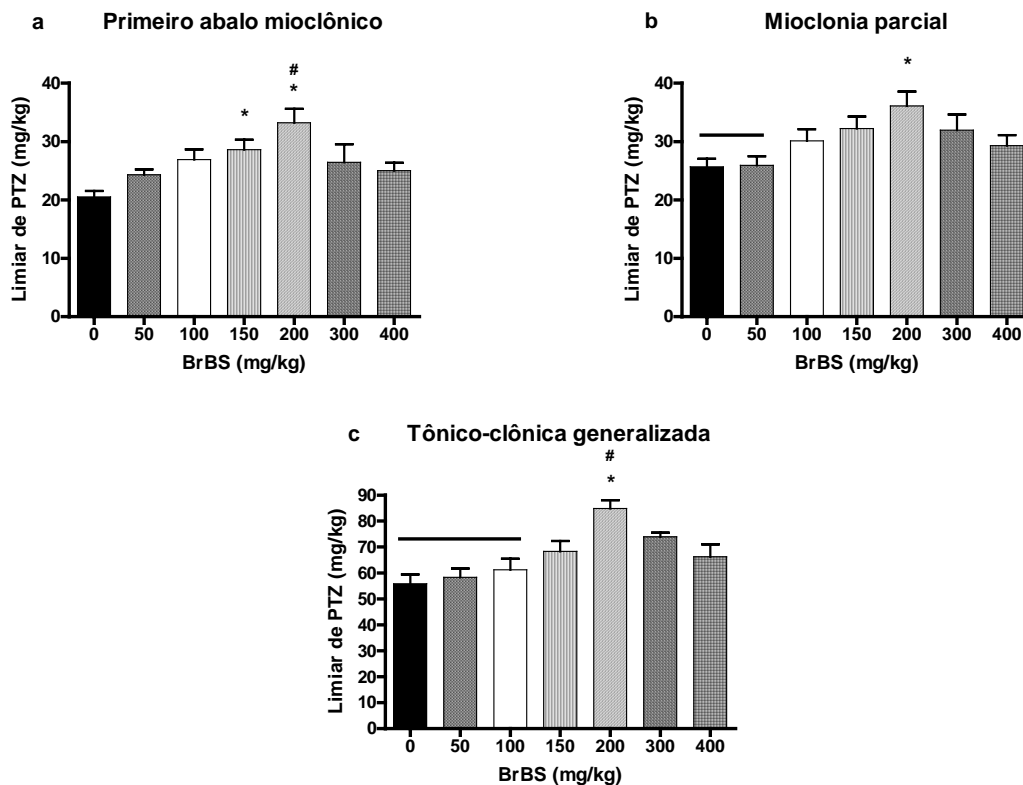
Para o comportamento abalo mioclônico foi observado diferença entre as doses: controle vs 150 ( $20,50 \pm 3,12$  vs  $26,49 \pm 3,05$ ;  $p < 0,05$ ); controle vs 200 ( $20,50 \pm 3,12$  vs  $31,88 \pm 7,19$ ;  $p < 0,001$ ) e 200 vs 400 ( $31,88 \pm 7,19$  vs  $24,64 \pm 4,23$ ;  $p < 0,05$ ).

Para o comportamento mioclonia parcial observamos diferença entre as doses: controle vs 200 ( $25,67 \pm 4,34$  vs  $36,11 \pm 7,82$ ;  $p < 0,01$ ), 50 vs 200 ( $25,91 \pm 3,51$  vs  $36,11 \pm 7,82$ ;  $p < 0,05$ ).

Para o comportamento crise generalizada tônico-clônica observamos diferença entre as doses: controle vs 200 mg/kg ( $57,51 \pm 10,59$  vs  $84,86 \pm 9,39$ ;  $p < 0,001$ ), 50 vs 200 mg/kg ( $58,32 \pm 8,17$  vs  $84,86 \pm 9,39$ ;  $p < 0,001$ ), 100 vs 200 mg/kg ( $66,17 \pm 17,54$  vs  $84,86 \pm 9,39$ ;  $p < 0,001$ ) e 200 vs 400 mg/kg ( $84,86 \pm 9,39$  vs  $66,21 \pm 12,87$ ;  $p < 0,05$ ).

A curva dose resposta encontrada nos três gráficos apresenta um modelo de regressão quadrática. No entanto, não observamos efeito pró-convulsivante

do BrBS, isto é, não ocorreu diminuição do limiar de PTZ em nenhuma dose em relação ao controle.

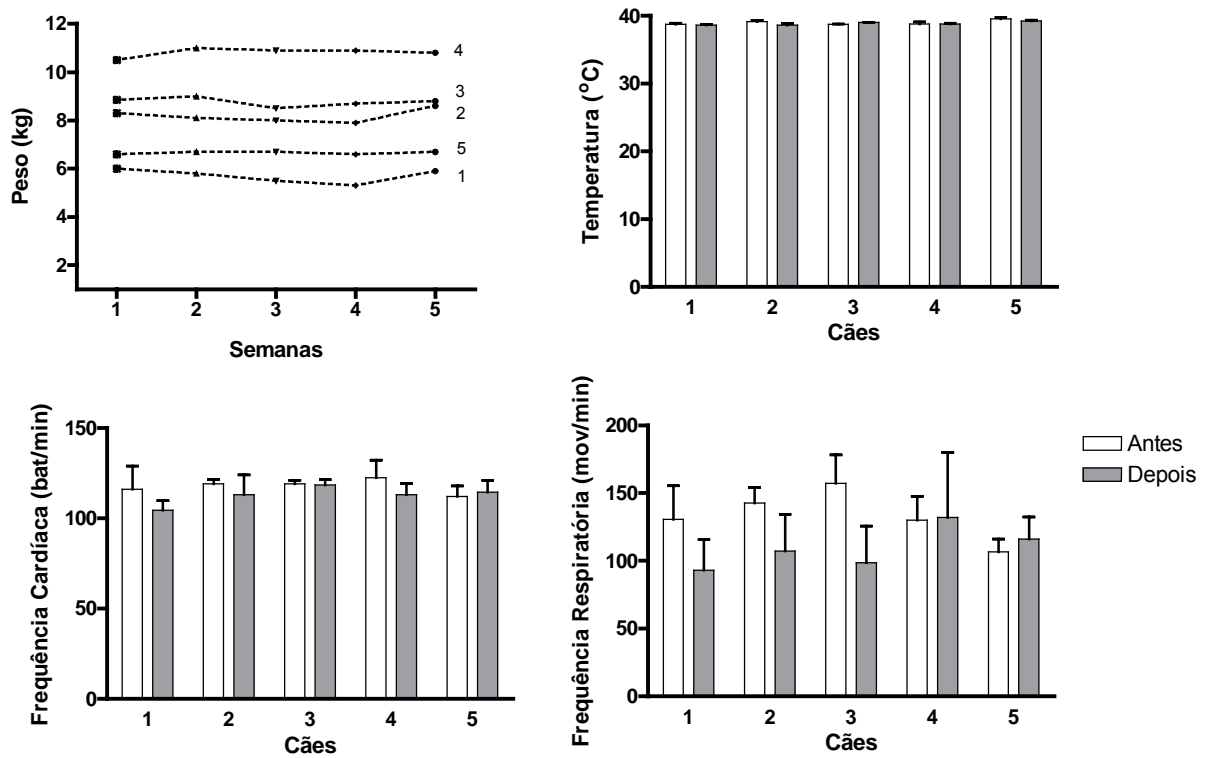


**Figura 4.** Efeito de dose única de BrBS ou CMC 0,5% (controle) no limiar de Pentilenotetrazol (PTZ) para crises convulsivas em ratos Wistar. O limiar foi calculado duas horas após a administração do BrBS ou CMC 0,5% via gavagem. Os dados foram expressos como média  $\pm$  DPM. Desenho experimental utilizado – ANOVA- *One Way*, post-hoc, Tukey. **a** –\*controle vs 150 e 200 ( $p < 0,05$ ); #200 vs 400 mg/kg ( $p < 0,05$ ); **b** –\*controle e 50 vs 200 mg/kg ( $p < 0,05$ ); **c** –\*controle, 50 e 100 vs 200 mg/kg ( $p < 0,001$ ); #200 vs 400 mg/kg ( $p < 0,05$ ).

### **4.3 Crise induzida por PTZ endovenoso em cães**

A figura 5 mostra os resultados do peso, da temperatura e das frequências cardíaca e respiratória. Os pesos dos animais mantiveram-se constantes durante todo o experimento (tabela 6, em anexo). Os parâmetros da temperatura e das frequências cardíaca e respiratória foram similares antes e depois de cada protocolo (tabela 7, 8 e 9, em anexo).





**Figura 5.** Pesos, temperaturas, freqüências cardíaca e respiratória dos cães utilizados como animais experimentais para indução de PTZ. □ antes; ■ depois do experimento. O peso foi avaliado no modelo Quadrado Latino e os demais parâmetros por teste t *Student* pareado;  $p < 0,05$ .

Os eritogramas e leucogramas realizados de amostras sanguíneas coletadas antes e depois do experimento estão representados nas tabelas 2 e 3.

Parâmetros	Antes					Depois					Valores de Referência
	Cães					Cães					
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	
<b>Volume Globular (%)</b>	42	50	47	40	38	40	40	46	42	38	<b>37,0 - 55,0</b>
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	13,6	16,5	15,3	12,8	12,1	12,7	12,9	14,9	13,5	12,2	<b>12,0 - 18,0</b>
<b>Hemácias (<math>\times 10^6</math> céls/)</b>	5,9	7,2	7,3	5,7	5,2	5,8	5,7	7	5,8	5,4	<b>5,5 - 8,5</b>
<b>VCM (fL)</b>	71	69,2	64,5	70,3	72,8	70,4	70,4	65,6	72,5	70,4	<b>60,0 - 77,0</b>
<b>CHCM (g/dL)</b>	32,7	33	32,6	32	31,8	31,8	32,3	32,4	32,1	32,1	<b>32,0 - 36,0</b>
<b>HCM (pg)</b>	23,2	22,9	21	22,5	23,2	21,9	22,6	21,2	23,4	22,5	<b>19,5 - 24,5</b>
<b>RDW (%)</b>	-	-	14,2	15,2	12,8	14,2	14,8	14	14,2	13,3	<b>0</b>
<b>Plaquetas (<math>\times 10^6</math> céls/)</b>	515	342	176	285	187	547	352	280	195	373	<b>175 - 500</b>

**Tabela 2.** Eritograma dos cães utilizados como animais experimentais para indução de PTZ antes e depois do experimento. Os parâmetros antes e depois foram avaliados por teste t *student* pareado;  $p < 0,05$ .

Parâmetros	Antes					Depois					Valores de Referência
	Cães					Cães					
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	
<b>Bastonetes</b>	0	0	-	0	-	0	0	0	0	0	<b>0-300 3000-</b>
<b>Segmentados</b>	4056	7750	-	5900	-	3274	4284	9088	5700	6058	<b>11500</b>
<b>Eosinófilos</b>	4784	750	-	1600	-	1733	1037	1408	950	1580	<b>100-1250</b>
<b>Basófilos</b>	0	0	-	0	-	0	0	0	0	0	<b>raros</b>
<b>Linfócitos</b>	832	3125	-	2400	-	834	760	1408	2185	439	<b>1000-4800</b>
<b>Monócitos</b>	728	875	-	100	-	1220	829	1024	665	702	<b>150-1350</b>
<b>Leucócitos totais</b>	10400	12500	9420	10000	8640	6420	6910	12800	9500	8780	<b>6000- 17000</b>

**Tabela 3.** Leucograma dos cães utilizados como animais experimentais para indução de PTZ antes e depois do experimento. Os parâmetros antes e depois foram avaliados por teste t *Student* pareado;  $p < 0,05$ .

Os parâmetros hepáticos e renais estão representados nas tabelas 4 e 5. O animal 1 apresentou aumento de uréia após o experimento. Apenas o animal 4 apresentou alterações nos valores de creatinina e uréia séricas. O animal 1 apresentou aumento de AST antes do experimento e o animal 2 e 5 após o término do experimento.

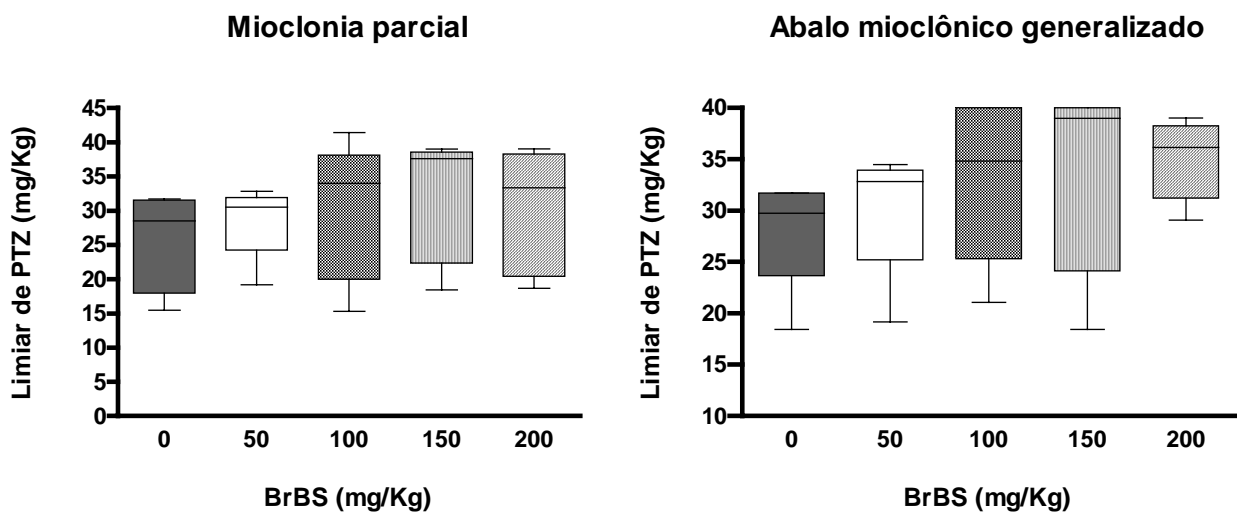
Parâmetros	Antes					Depois					Valores de Referência
	Cães										
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	
Uréia	30,0	35,0	52,0	97,0	36,0	73,0	40,0	32,0	76,0	48,0	20-56
Creatinina	0,4	0,8	0,6	1,8	0,7	0,8	0,9	0,9	0,9	0,8	0,5-1,5

**Tabela 4.** Perfil Renal dos cães utilizados como animais experimentais para indução de PTZ antes e depois do experimento. Uréia e creatinina em mg/dL. Os parâmetros foram avaliados por teste t Student pareado;  $p < 0,05$ .

Parâmetros	Antes					Depois					Valores de Referência
	Cães										
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	
Albumina	3,4	3,2	3,8	3,3	3,0	3,3	3,3	3,8	3,7	3,4	2,3-3,1
Globulina	2,5	2,9	2,9	4,3	2,2	2,6	2,5	2,1	2,4	2,3	2,7-4,4
Albumina/globulina	1,4	1,1	1,3	0,8	1,4	1,3	1,3	1,8	1,5	1,5	0,6-1,1
Fosfatase alcalina	23,0	87,0	23,0	2,0	42,0	22,0	56,0	25,0	22,0	39,0	20-156
Proteínas totais	5,9	6,1	6,7	7,6	5,2	5,9	5,8	5,9	6,1	5,7	5,4-7,5
ALT	67,0	48,0	60,0	64,0	63,0	79,0	67,0	53,0	62,0	81,0	10-109
AST	81,0	49,0	54,0	52,0	61,0	63,0	81,0	50,0	68,0	71,0	23-66

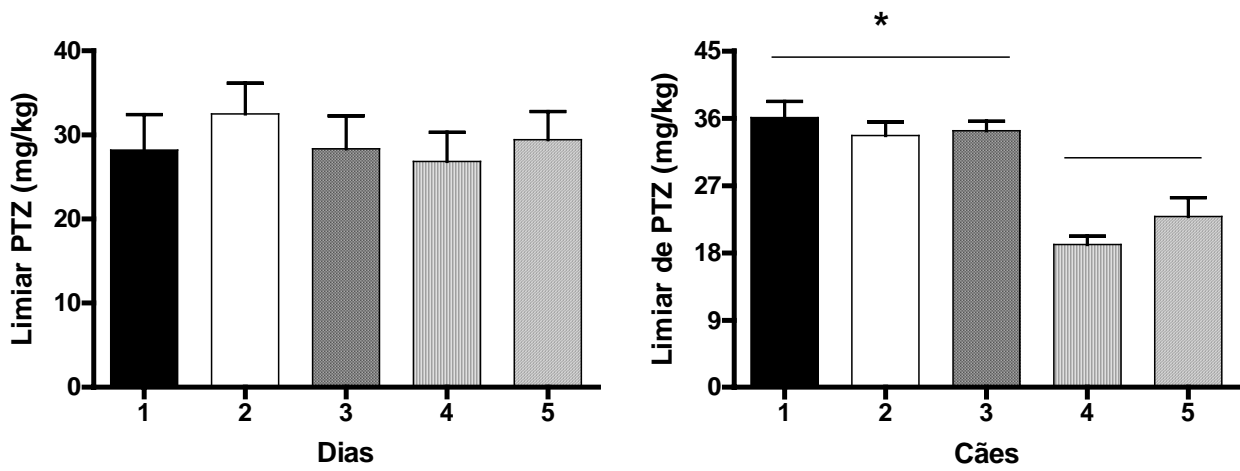
**Tabela 5.** Perfil hepático dos cães utilizados como animais experimentais para indução de PTZ antes e depois do experimento. Os parâmetros foram avaliados por teste t *student* pareado;  $p < 0,05$ . Albumina – g/dL, globulina – g/dL, fosfatase alcalina - U/L, proteínas totais - /dL, TGP - U/L e AST – U/L.

A figura 6 representa os dados do limiar de PTZ para a mioclonia parcial e generalizada. Os limiares de PTZ no grupo controle (CMC 0,5 %) foram: mioclonia parcial ( $28,5 \pm 20,5/31,4$ ) e abalo mioclônico generalizado ( $29,7 \pm 28,9/31,7$ ). Não houve diferença entre os limiares de PTZ para as doses de BrBS (50, 100, 150 e 200 mg/kg) comparados ao controle em todos os comportamentos avaliados. Os dados estão nas tabelas 10 e 11 em anexo.



**Figura 6.** Efeito de dose única de BrBS ou CMC 0,5% (controle) no limiar de PTZ para mioclonia parcial e abalo mioclônico generalizado em cães. O limiar foi calculado duas horas após a administração do BrBS ou CMC 0,5% via oral. Os dados foram expressos como mediana  $\pm$  1<sup>o</sup> e 3<sup>o</sup> quartis de um grupo de cinco cães. Dados analisados pelo teste de Friedman.  $p < 0,05$ .

A figura 7 mostra os resultados do limiar de PTZ entre os cães e entre os dias. O limiar de PTZ observado em todos os animais permaneceu constante durante todos os cinco dias experimentais para mioclonia parcial: 1° dia ( $28,21 \pm 9,41$ ) vs 2° dia ( $32,52 \pm 8,09$ ) vs 3° dia ( $28,36 \pm 8,79$ ) vs 4° dia ( $26,86 \pm 7,74$ ) vs 5° dia ( $29,46 \pm 7,44$ ). No entanto, houve diferença entre os animais. Destarte, podemos separar os animais em dois grupos distintos de resposta ao PTZ. Os cães 1 ( $36,09 \pm 4,84$ ), 2 ( $33,70 \pm 4,01$ ) e 3 ( $34,47 \pm 2,75$ ) apresentaram limiar maior que os cães 4 ( $19,10 \pm 2,56$ ) e 5 ( $22,85 \pm 5,67$ ), considerando  $p < 0,01$ .



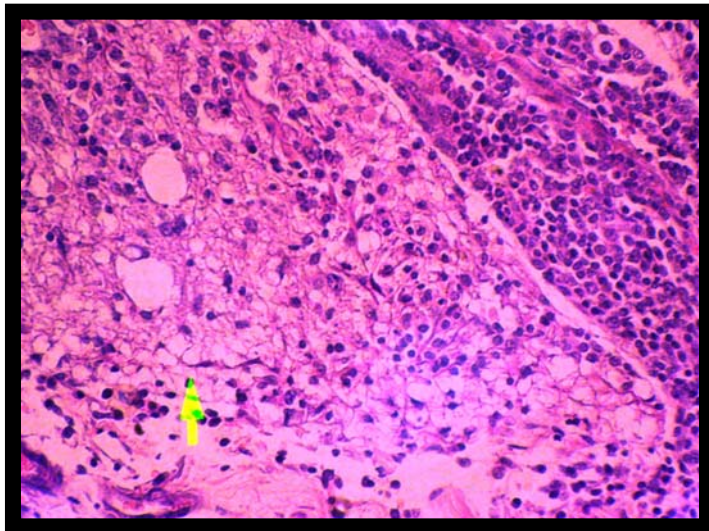
**Figura 7.** Limiar de PTZ para mioclonia parcial, considerando os diferentes animais e os diferentes dias de experimento. Os dados foram expressos como média  $\pm$  DPM de um grupo de cinco cães. Desenho experimental utilizado – Quadrado Latino seguido do *post-hoc*, Tukey.  $P < 0,05$ . A - \* cães 1, 2 e 3 vs 4 e 5 ( $p < 0,01$ ).

Ao realizar a necropsia, foi observado que os animais 1, 2, 3 e 5 não apresentavam nenhuma alteração anatomopatológica, além de mucosas cianóticas e esplenomegalia congestiva devido aos fármacos utilizados para eutanásia: tiopental sódico e cloreto de potássio. Além dessas alterações, o animal 4 apresentou linfadenomegalia discreta, intensa quantidade de cálculo dentário nos molares, áreas multifocais de pneumonia em fase de consolidação nos lobos pulmonares cranial esquerdo e caudal direito e área focal de infarto agudo no rim direito.

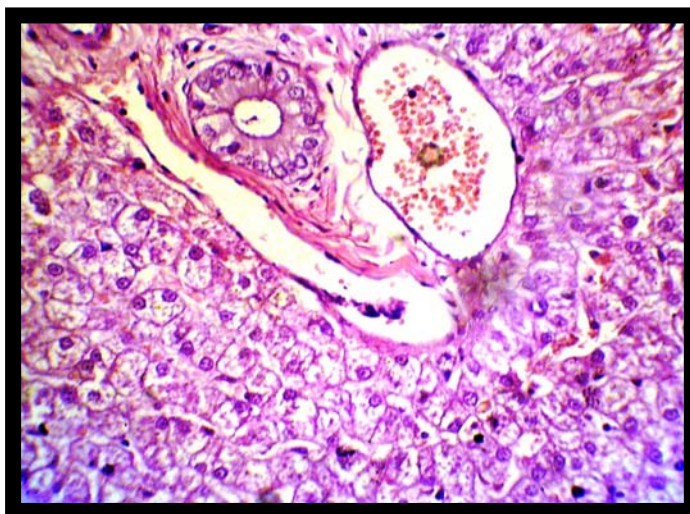
À análise morfológica, o animal 5 apresentou meningoencefalite linfoplasmocitária moderada (fig. 8), caracterizada por infiltrado inflamatório linfocitário e especialmente plasmocitário, focalmente extenso, que se estendia do córtex frontal direito até o cerebelo. Nos núcleos da base, esse infiltrado se difunde por um segmento do neurópilo promovendo áreas de desmielinização associado à manguitos multifocais e congestão moderada.

À análise morfológica do fígado observou-se degeneração hidrópica difusa (fig. 9) em todos os animais, que variou de discreta a acentuada. Além da degeneração hidrópica, foi observada no animal 1 discreta retenção de pigmentos biliares.





**Figura 8.** Fotomicrografia de cérebro (núcleos da base) do animal 5. Meningoencefalite linfoplasmocitária. HE. 400X



**Figura 9.** Fotomicrografia de fígado (região porta). Degeneração hidrópica moderada a acentuada difusa. HE. 400X

## **5. Discussão**

### **5.1 Crise audiogênica em WAR**

Foi observado o efeito supressor do BrBS na crise audiogênica em fêmeas WARs. Esse fármaco foi eficaz tanto na inibição de C1 e CVT, como também no aumento da latência para esses comportamentos.

Doses de 50 a 100 mg/kg de BrBS não foram suficientes para alterar o IS e a latência de C1. Entretanto, na dose de 100 mg/kg, quando foi modificado o critério de avaliação para porcentagem de ocorrência do componente tônico foi observado efeito do fármaco com diminuição no número de animais que apresentaram CVT. Esse resultado manteve-se em doses maiores. Isso mostra a necessidade de avaliar mais de um parâmetro na crise audiogênica, permitindo a comparação e complementação dos dados na avaliação final, pois a observação de poucas variáveis poderia ocultar dados relevantes.

Após a administração de BrBS, apesar da ocorrência de C1 em alguns animais, houve aumento da latência ou bloqueio de CVT. Esse padrão de resposta, possivelmente reflete o mecanismo de ação do BrBS nos substratos envolvidos na propagação e generalização da crise audiogênica. A rede neuronal das crises audiogênicas é iniciada no colículo inferior, progredindo para camadas profundas do colículo superior, formação reticular pontina e substância cinzenta periaquedutal (Faingold, 2004). Segundo

Faingold (1999) o colículo inferior e camadas profundas do colículo superior são áreas críticas para o início da crise audiogênica e comportamento de C1, enquanto que áreas do núcleo reticular pontino e substância periaquedutal são cruciais para a fase tônico-clônica.

Para bloquear essa crise, alguns fármacos atuam inibindo disparos neuronais no colículo inferior ou em outros substratos envolvidos na crise. Entretanto, alguns compostos, como o MK-801 - antagonista de receptores NMDA - não atuam em nenhum desses substratos apesar de inibir a crise audiogênica. O MK-801 aumenta os disparos de neurônios da substância negra, promovendo um efeito indireto via desinibição, alterando a modulação da crise (para revisão ver Faingold, 2004).

O BrBS poderia atuar no recrutamento dessas áreas mesencefálicas, como também na conexão nigro-collicular, envolvida na modulação da crise audiogênica (Browning, 1985; Gale, 1988; Garcia-Cairasco, 2002).

A diminuição da inibição mediada por receptores GABA<sub>A</sub>, originada de interneurônios intrínsecos e projeções gabaérgicas extrínsecas do colículo inferior está envolvida na gênese da crise audiogênica (para revisão ver Faingold, 2004). Microinjeção bilateral de antagonistas de receptores NMDA no colículo inferior também bloqueia crises, sugerindo outro mecanismo neuroquímico importante para o início da crise (Faingold e cols., 1992). Da mesma maneira que o colículo inferior é mais sensível aos inibidores de receptores NMDA, o colículo superior o é aos agonistas noradrenérgicos

comparado ao colículo inferior e formação reticular pontina (Faingold & Casseber, 1999).

Como vimos, os sistemas glutamatérgicos bem como gabaérgicos têm um importante papel na etiopatogenia das crises audiogênicas (Faingold e cols., 1992; Garcia-cairasco, 2002). Dimmock e Baker, em 1994, avaliaram a atividade do BrBS no sistema gabaérgico e observaram que as concentrações de GABA ou GABA-T encefálicas não sofrem alteração após doses de 100 a 600 mg/kg de BrBS em ratos. No entanto, o BrBS foi capaz de inibir a ligação de [<sup>3</sup>H]GABA ao receptor associado a canais de cloreto em 21 %. Esses autores também observaram efeito inibitório na recaptação de adenosina e ausência de deslocamento de [<sup>3</sup>H]flunitrazepam em sítios benzodiazepínicos. A incapacidade do BrBS em inibir crises de bicuculina e estriquinina também indica pouco ou fraco efeito gabaérgico.

Outros neurotransmissores também estão envolvidos na crise aguda, como noradrenalina, serotonina, e histamina. (Dailey & Jobe, 1985; Faingold, 1999; Faingold & Casseber, 1999; Feng & Faingold, 2000). Assim, pode-se inferir possíveis interferências do BrBS nesses diferentes sistemas, apesar de não se conhecer as suas atividades na liberação desses neurotransmissores encefálicos.

De maneira semelhante ao BrBS, fármacos validados na clínica, como a fenitoína e carbamazepina são eficazes na inibição do componente tônico em modelos genéticos de crise audiogênica (Dailey & Jobe, 1985; Gower, 1995;

Moraes e cols., 2005). Entretanto, os diferentes componentes observados na crise respondem diferentemente a esses fármacos. Os GEPR-9, que apresentam crises tônicas semelhantes ao IS = 1 dos WARs, têm maior sensibilidade a fármacos como a fenitoína e carbamazepina comparado ao GEPR-3 que apresentam crise mioclônicas. Esse padrão de resposta pode refletir o mecanismo anticonvulsivante desses fármacos. Ambas fenitoína e carbamazepina suprimem disparos neuronais repetitivos sem influenciar a inibição gabaérgica. O efeito anticonvulsivante também pode estar relacionado a outros mecanismos de ação como, por exemplo, a alteração de neurotransmissores encefálicos (Dailey & Jobe, 1985). Considerando que o padrão de resposta anticonvulsivante da fenitoína e carbamazepina em GEPR se assemelha aos antidepressivos tricíclicos, a serotonina parece contribuir para o mecanismo de ação desses fármacos no modelo audiogênico (Dailey e Jobe, 1985; Graumlich e cols., 1999). Além disso, os GEPR-9 exibem aumentos maiores na serotonina extracelular encefálica em resposta a menores doses de carbamazepina (Dailey e cols., 1997; Graumlich e cols., 1999).

As crises audiogênicas também são sensíveis a fármacos como benzodiazepínicos, topiramato e levetiracetam, como mostrado em animais audiogênicos da linhagem Wistar AS (Gower e cols., 1995; Rigoulot e cols., 2003). Esses animais também foram úteis na avaliação da remacemida, fármaco que bloqueia receptores NMDA e inativa canais para sódio voltagem dependente. Esse mesmo fármaco, remacemida, foi ineficaz em crises

induzidas por antagonistas gabaérgicos como o PTZ, bicuculina e picrotoxina (para revisão ver Nehlig & Boehrer, 2003).

Em relação ao gênero, Doretto e cols. (2003) analisaram o tempo de latência de C1 e IS em várias gerações de animais da colônia WAR. As diferenças entre os sexos para esses parâmetros não foram significativas. No entanto, em GEPRs, as fêmeas apresentam menor latência de tempo de C1 e CVT e maior IS comparadas aos machos (Mishra e cols., 1988). Da mesma maneira, Maguire e cols, em 2005, observaram variação da excitabilidade neuronal em diferentes fases do ciclo estral, com maior inibição tônica mediada pelo receptor  $\delta$  GABA<sub>A</sub> na fase lútea.

## **5.2 Crise induzida por PTZ endovenoso em ratos**

O BrBS aumentou a latência de maneira moderada nos três diferentes tipos de comportamento - abalo mioclônico, mioclonia parcial e tônico-clônica. O padrão da curva de resposta segue o modelo de regressão quadrática, isto é, apresenta efeito apenas em doses intermediárias.

O padrão de curva quadrática observado no BrBS se assemelha aos resultados encontrados por Löscher e cols. (1991) para fenitoína, carbamazepina e primidona no comportamento de mioclonia. Essa característica permitiu a diferenciação entre esses fármacos e outros como o fenobarbital, valproato e etosuximida. Além disso, foi observado dissociação do comportamento de mioclonias generalizadas e perda do reflexo de

posicionamento para fenitoína, carbamazepina e primidona (Löscher e cols.,1991).

O modelo de curva encontrado nesse protocolo pode ser consequência da interação do BrBS e do PTZ, tanto do ponto de vista farmacodinâmico como farmacocinético. A ligação de fármacos às proteínas plasmáticas pode ser um mecanismo farmacocinético envolvido nesse padrão de resposta. Moléculas que se ligam em porcentagem elevada à proteínas plasmáticas podem competir com outros compostos que também se ligam fortemente às proteínas (Rang e cols., 2001). Maiores concentrações de BrBS poderia reduzir a ligação de PTZ às proteínas plasmáticas, aumentando a sua quantidade livre, com consequente aumento de PTZ disponível no sítio de ação.

Dimmock & Baker (1994), ao avaliar o efeito anticonvulsivante do BrBS em camundongos após PTZ s.c., observou efeito anticonvulsivante aproximadamente duas vezes maior que o valproato (215 mg/kg vs 371 mg/kg; 2.56 vs 6,62 ; ED<sub>50</sub>; slope). No entanto, esses autores não observaram atividade anticonvulsivante em ratos, em doses abaixo de 250 mg/Kg. Esse efeito, também não ocorreu após administração de fenitoína e carbamazepina. Esses autores também avaliaram o efeito de BrBS, após PTZ, i.v., em camundongos, observando aumento do limiar para crises clônicas (220 mg/Kg), sem produzir efeitos pró-convulsivantes em doses altas.

Ao contrário dos achados de Dimmock & Baker (1994), o BrBS aumentou o limiar de PTZ, i.v., em ratos, para os três comportamentos avaliados – abalo, mioclonia parcial e tônico-clônica, na dose 200 mg/kg. As espécies utilizadas – camundongo e rato – ou a via de administração – i.v e s.c. – podem explicar essas diferenças encontradas na resposta do BrBS no modelo de PTZ.

A infusão i.v., por ser contínua, permite a observação dos diferentes componentes clônico e tônico, parcial e generalizado em um mesmo animal (Löscher e cols., 1991). Esse tipo de infusão do PTZ i.v. permitiu a avaliação do efeito do BrBS em diferentes tipos de comportamento convulsivo utilizando um menor número de animais. Além disso, considerar vários tipos de comportamento, ao invés de apenas um ponto de corte específico, facilita a comparação do BrBS com outros fármacos.

A avaliação de cada comportamento nos revela um processo específico de propagação e inibição da crise convulsiva induzida pelo PTZ (Browning & Nelson, 1986; Gale, 1988). A interferência do BrBS no limiar para abalo e crises parciais reflete atividade no início da crise convulsiva, em áreas prosencefálicas. Por outro lado, a inibição da crise generalizada tônico-clônica induzida por PTZ sugere que o BrBS inibe a propagação e generalização da crise, atuando em áreas do tronco encefálico. Segundo Meldrum (1988), a expressão seqüencial do componente tônico relaciona-se a eventos progressivos em grupos neuronais do tronco encefálico.



O PTZ tem mostrado ser um modelo preditivo da eficácia clínica de fármacos contra crises parciais, generalizadas de ausência, mioclônicas e tônico-clônicas (Kitano e cols., 2005). Sabemos que compostos que suprimem a condutância do  $Ca^{2+}$  através de canais tipo T de baixo limiar (trimetadona, etosuximida ou ácido valpróico) e os que aumentam a condutância do cloreto, mediado pelo receptor  $GABA_A$  (benzodiazepínicos) são efetivos nesse modelo (Rho & Sankar, 1999). Entretanto, fármacos ineficazes em crise de ausência (fenitoína, carbamazepina e primidona) apresentam resultados controversos em relação a sua eficácia em crises induzidas por PTZ s.c ou i.v.. Fármacos como a gabapentina, que não atuam em crises de ausência, bloqueiam crises induzidas por PTZ. Esse modelo também foi eficaz na identificação de fármacos que inibem crises mioclônicas, como o fenobarbital, mas apresenta resultados contraditórios na avaliação de outros fármacos com mecanismos similares, como vigabatrina e progabide (para revisão ver Löscher e cols., 1991).

Essas colocações mostram a existência de grande variabilidade na resposta de um mesmo fármaco testado no modelo de PTZ. Essa variabilidade deve-se, em grande parte, às diferenças nas espécies, linhagem, gênero, temperatura ambiente, dieta, ritmo circadiano, sazonal e/ou hormonal durante a avaliação laboratorial do fármaco anticonvulsivante (Löscher e cols., 1991), critérios esses, que foram respeitados e mantidos constantes durante o nosso protocolo.

### 5.3 Crise induzida por PTZ em cães

Neste experimento, observou-se a presença de crises clônicas parciais em todos os animais após a infusão de PTZ i.v. Alguns desses apresentaram crises tônico-clônicas mesmo após a interrupção do PTZ. Da mesma maneira Sechi e cols., em 1997, observaram crises clônicas que progrediam para tônico-clônicas, em cães, após PTZ dose única (200-300 mg/kg ; i.v.). Adicionalmente, esses autores avaliaram os parâmetros eletroencefalográficos, encontrando picos isolados bilaterais nos primeiros 30 s, seguidos de polipontas, mais prolongadas durante as crises clônicas, separados por períodos variáveis de supressão eletroencefalográfica. Durante as crises tônico-clônicas, foram observadas repetidas descargas de picos paroxísticas generalizadas, de 50 a 60 s.

Sechi e cols, em 1997, ainda observaram hipóxia e aumento de temperatura aos 10 e 30 minutos após o PTZ. Ao contrário desses autores, no nosso estudo, não foi encontrado variação na temperatura após 30 min da infusão de PTZ i.v. Esse tempo de recuperação – 30 min – foi suficiente para a estabilização tanto da temperatura como da frequência cardíaca nos cães experimentais. Devemos considerar que neste trabalho, foi realizada a interrupção da crise com diazepam, i.v., no momento do primeiro abalo mioclônico. Essa variável pode ser responsável pela boa recuperação dos animais no nosso experimento. As frequências respiratórias mantiveram-se elevadas em relação aos níveis normais. Essa alteração foi observada antes e depois do protocolo de infusão.

Podemos observar no limiar de PTZ dos cães nos diferentes dias que o uso repetido do mesmo animal 5 (cinco) vezes com intervalos de 1 (uma) semana para infusão dessa droga via i.v., não promoveu abrasamento químico. Löscher e cols. (2004) também utilizaram o mesmo animal em várias infusões de PTZ, com intervalos de 7 dias entre as aplicações, sem notar efeito de abrasamento químico. Essa observação foi essencial para validação do desenho experimental escolhido neste estudo – cruzado – permitindo o uso de um menor número de animais experimentais, sem interferências no limiar de PTZ causadas pelas administrações anteriores de BrBS e PTZ.

Apesar da tendência de aumento do limiar nos comportamentos de mioclonias parcial e generalizada, não houve diferenças entre as doses de BrBS e o controle (CMC 0,5%). Por outro lado, esse composto mostrou-se eficaz no mesmo modelo químico em ratos (protocolo anterior) e em camundongos (Dimmock & Baker, 1994). Löscher e cols.(1991) observaram diferenças entre espécies – camundongo vs rato – ao analisar a potência de diferentes fármacos anticonvulsivantes. Os autores também observaram que nessas espécies o tempo de efeito pico dos fármacos depende da dose examinada, sendo que em altas doses mais tempo é necessário pra alcançar a concentração máxima no sangue e encéfalo.

Considerando as diferenças específicas, a farmacocinética pode ser a responsável por esses resultados em cães. O tempo de meia-vida pode diferir entre espécies. A etosuximida, por exemplo, exibe um maior tempo de

ação em ratos quando comparado a camundongos, podendo explicar as suas diferenças de potências anticonvulsivantes entre essas espécies (Löscher e cols., 1991). O diazepam apresenta um metabolismo de primeira passagem (pré-sistêmico) mais rápido em camundongos comparado a ratos. Como o metabólito é menos potente que a pró-droga, isso pode levar à falsas conclusões na comparação de potência do diazepam nessas diferentes espécies (Löscher e cols., 1991)

O cão, apesar de ser amplamente utilizado em modelos farmacocinéticos, apresenta diferenças na metabolização e eliminação de fármacos comparados a outras espécies como o rato e o homem. Assim, o BrBS pode estar atuando como uma pró-droga, podendo apresentar diferenças na potência entre o metabólito e a droga mãe. O metabolismo de primeira passagem após infusão oral pode acelerar ou retardar a eliminação do fármaco.

Também devemos considerar interações farmacocinéticas do PTZ com o BrBS nos cães. Um estudo farmacocinético do PTZ em cães realizado por Jun, 1976, mostrou um declínio biexponencial de PTZ plasmático, sugerindo que o perfil farmacocinético dessa droga em cães segue um modelo corporal de dois compartimentos. A principal via de eliminação ocorreu pela biotransformação hepática. Estudos posteriores sobre a farmacocinética do BrBS em cães poderão elucidar essas questões.

Sechi e cols., em 1997, mostraram as variações de aminoácidos no sangue, LCR e fluido intersticial do cérebro de cães SRD após PTZ, dose única. O perfil dos níveis de aminoácidos no fluido intersticial evidenciou um aumento dos neurotransmissores - glutamato e aspartato - nos primeiros 10 min, assim como de glicina, taurina, glutamina e fosfoserina, mais evidentes nos minutos seguintes. Segundo os autores, esse aumento de glutamato e aspartato pode ser devido a uma excessiva liberação sináptica ou ativação de vias bioquímicas nas células neuronais ou gliais. A glicina pode estar envolvida na manutenção das crises, devido a seu efeito modulador nos receptores NMDA, potenciando a resposta excitatória (Sechi e cols., 1997).

A resposta à infusão de PTZ nas diversas doses de BrBS foi diferente para os diferentes animais. A resposta pode ser dividida em dois grupos distintos: os cães 1, 2, 3 apresentaram maiores limiares que os cães 4 e 5. Essa diferença pode refletir as possíveis individualidades presentes na resposta ao tratamento anticonvulsivante como observado na clínica de pequenos animais. Podemos descartar influência de raça e idade, sendo que todos os animais utilizados eram SRD e jovens. A análise dos dados referentes aos exames físicos, patologias clínicas e anatomohistopatológicos torna-se importante para interpretação das diferenças encontradas entre os grupos de animais.

O animal 1 não apresentou alterações evidentes ao exame físico e eritrograma. O leucograma, realizado antes do experimento, relatou aumento de eosinófilos e linfopenia. A eosinofilia é relativamente comum em pequenos

animais e pode ter várias causas, uma delas é a presença de parasitas. Apesar da medicação antiparasitária e eliminação de endo e ectoparasitas confirmada na necrópsia, houve persistência do aumento de eosinófilos ao término do experimento. Outras causas que podem ser levantadas são distúrbios alérgicos, infecciosos sistêmicos ou outros parasitos não sensíveis ao antiparasitário administrado. A existência prévia de eosinofilia, que persistiu nesse animal após a administração dos fármacos, não sugere ação antiinflamatória do PTZ ou BrBS. O perfil renal mostrou uréia aumentada após o experimento, com nível de creatinina normal. O perfil hepático evidenciou discreta elevação de AST, antes do experimento, que não persistiu após o seu término. Quando associado aos outros testes de função hepática (albumina, fosfatase alcalina, proteínas e ALT), essa elevação de AST não demonstra alteração no metabolismo hepático e colestase, embora tenha sido observada degeneração hidrópica difusa, moderada à acentuada, associada à discreta retenção de pigmentos biliares, não observada nos demais animais.

O animal 2 não apresentou alterações evidentes ao exame físico e eritrograma. Foi observado linfopenia e discreto aumento de AST ao término do experimento.

O animal 3 não apresentou alterações evidentes ao exame físico, eritrograma, perfil bioquímico. O leucograma mostrou aumento de eosinófilos ao término do experimento. Não foram encontrados endo e/ou ectoparasitas.

O animal 4 não apresentou alterações ao exame físico e eritrograma. Este animal apresentou eosinofilia e azotemia antes do experimento. Ao término de todo o experimento os níveis de eosinófilos e creatinina voltaram aos valores normais. A uréia manteve-se aumentada associada à discreta elevação de AST. O exame macroscópico diagnosticou cálculo dentário em grande quantidade nos molares, além de focos de inflamação pulmonar e renal, alterações que geram modificações fisiológicas. Essas alterações podem ter interferido tanto na ação convulsivante do PTZ, evidenciado pelo menor limiar observado nesse animal, como também na sua refratariedade ao tratamento pelo anticonvulsivante BrBS.

O animal 5 não apresentou alterações ao exame físico, eritrograma e perfil renal. Foi observado linfopenia, aumento de eosinófilos e AST ao término do experimento. À análise morfológica observou-se meningoencefalite linfoplasmocitária moderada. Esses achados sugerem a ocorrência de encefalopatia viral, como a cinomose. Uma vez que essas áreas fazem parte do substrato neural envolvido na crise de PTZ, esses achados podem justificar o menor limiar observado nesse animal, tornando-o mais susceptível à crise convulsiva.

À análise morfológica do fígado observou-se degeneração hidrópica difusa em todos os animais, que variou de discreta a acentuada. Essa alteração não pode ser explicada pelos momentos de hipóxia secundária às crises convulsivas induzidas pelo PTZ, uma vez que a hipóxia acarreta degeneração hidrópica multifocal. Outra possibilidade seria ação tóxica dos

fármacos empregados, BrBS e PTZ, considerando a biotransformação hepática do PTZ como mostrado por Jun (1976). Porém, neste experimento não foi possível comprovar e distinguir o agente agressor. Embora não haja evidências de insuficiência hepática, esses resultados acentuam a necessidade de acompanhamento crônico de parâmetros hematológicos e bioquímicos de animais sob tratamento farmacológico.

#### **5.4 Discussão geral**

Para cada tipo ou conjunto de manifestações epilépticas há um conjunto específico de medicações mais efetivas e adequadas (Melo, 1999).

Uma vez que a ativação de circuitos subcorticais e corticais específicos são cruciais para iniciar, disparar e controlar a propagação da atividade convulsiva (Gale, 1988), é importante identificá-los a fim de definir o papel anticonvulsivante na atividade do BrBS

Este estudo mostrou que o BrBS atua tanto em comportamentos procursivos, como no componente tônico-clônico de crise audiogênica e crises parciais e tônico-clônicas induzidas por PTZ em ratas.

A progressão de mioclonia parcial (facial e membros anteriores) para crise tônica envolve o recrutamento de neurônios até o envolvimento de todo o



encéfalo, resultando em convulsões tônicas (Browning, 1994). Considerando que o componente tônico de diferentes modelos animais de epilepsia compartilham substratos anatômicos (Browning, 1985), podemos inferir alguns substratos neuronais mesencefálicos sensíveis ao BrBS como a formação reticular, substância cinzenta periaquedutal e substância negra (Browning, 1985).

A substância negra representa um sítio no qual a transmissão mediada pelo GABA pode controlar a propagação de diversos tipos de crises com diferentes origens e mecanismos de indução. A transmissão gabaérgica na substância negra tem a função de limitar a propagação da crise. O efeito de rede da atividade gabaérgica na substância negra é de desinibição de neurônios alvo de regiões como tálamo, tecto (colículo) e tegmento (Gale, 1988).

Os mecanismos de ação dos fármacos anticonvulsivantes incluem além de efeitos nos sistemas de neurotransmissores, interferência em mecanismos de disparo neuronal repetitivo, em redes neuronais e em transporte iônico neuronal (White, 1999; Faingold, 2004). A combinação desses efeitos presentes em cada agente individual juntamente com as suas propriedades farmacocinéticas determinam a utilidade de cada fármaco no uso clínico (Faingold & Browning, 1987; Dimmock e cols., 1993).

Segundo Melo (1999), “o somatório da eficácia em vários sistemas pode ser suficiente para um grande efeito anticonvulsivante, ao passo que os efeitos tóxicos ocorrendo em baixa intensidade em sistemas variados e independentes podem não se somar e não representar um problema de fato. Assim, fármacos anticonvulsivantes eficientes parecem depender de mecanismos de ação múltiplos e não únicos”.

Os possíveis mecanismos de ação do BrBS devem ser investigados, podendo incluir algumas vias neuroquímicas - colinérgicas, dopaminérgicas, opióides, serotoninérgicas ou adrenérgicas, ou até mesmo sobre receptores glutamatérgicos NMDA ou AMPA/Cainato. Essas vias estão envolvidas na etiopatogenia dos modelos utilizados. Novos estudos são necessários para esclarecer tanto a atividade encefálica como as bases moleculares alvos desse novo composto.

Outro composto da mesma família, o 4[4-fluorofenoxy]benzaldeído semicarbazona, o qual apresenta atividade anticonvulsivante potente no modelo de eletrochoque máximo e moderada no modelo de PTZ, é um potente bloqueador de canais para sódio voltagem dependente, interagindo seletivamente em estados inativados do canal (Ramu e cols., 2000).

## **6. Conclusão**

Este trabalho representa um passo importante na definição da eficácia anticonvulsivante do composto BrBS. Os resultados mostram a necessidade de continuidade nesses estudos, definindo o seu perfil farmacocinético e farmacodinâmico de maneira a permitir a sua inclusão na gama farmacológica de anticonvulsivantes disponíveis aos pacientes – seres humanos e cães.

## 7. Referências bibliográficas

Aiken S P & Brown W M. **Treatment of epilepsy: existing therapies and future development.** *Frontiers in Bioscience*, v.5, n.1, p.124-52, 2000.

Beraldo H., Sinisterra R.D., Teixeira L.R., Vieira R.P., and Doretto M.C. **An effective anticonvulsant prepared following a host-guest strategy that uses hydroxypropyl-beta-cyclodextrin and benzaldehyde semicarbazone.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* v.296, p.241-46, 2002.

Beraldo H. **Semicarbazonas e Tiosemicarbazonas: o amplo perfil farmacológico e usos clínicos.** *Química Nova*. v.27, n.3, p.461-471, 2004.

Berendt M. and Dam M. **Re: Clinical presentations of naturally occurring canine seizures: similarities to human seizures.** *Epilepsy & Behavior* v.4, p.198-199, 2003.

Berendt M. **Clinical Neurology in Small animals - Localization, Diagnosis an Treatment.** K.G.Braund (Ed.). *International Veterinary Information Service (www ivis.org)*, Ithaca, Nova York, EUA. Ref Type: Internet Communication, 2004.

Browning R. A. **Role of brain stem reticular formation in tonic clonic seizure: lesion and pharmacological studies.** *Federation Proceedings*, v. 44, p. 2425-31, 1985.

Browning R. A. & Nelson D. K. **Modification of electroshock and pentylenetetrazol seizure patterns in rats after precollicular transections.** *Experimental Neurology*, v.93, p.546-556, 1986.

Browning R. A. **Effects of lesions on seizures in experimental animals.** In: *Epilepsy and reticular formation: The role of reticular core in convulsive Seizures.* Fromm G, H, Faingold C. L., Browning R. A., Burnham W. M. Alan R. Liss edition: New York, pp 137-162, 1987.

Browning R. A., Maggio R., Sahibzada N., Gale K. **Role of brainstem structures in seizure initiated from the deep prepiriform cortex in rats.** *Epilepsia*, v.34, p.393-407, 1993.

Chandler K. **Canine epilepsy: can we learn from human seizure disorders?** *The Veterinary Journal*, v172, n.2,p.207-17, 2006.

**Commission on classification and terminology of the International League against Epilepsy. Proposal for revised classification of epileptic and epilepsies syndromes.** *Epilepsia*, v.30, n.4, p.389-99, 1989.

Dailey J. W. & Jobe P. C. **Anticonvulsant drugs and the genetically epilepsy-prone rat.** *Federation Proceedings*, v.44, n.10, p.2640-44, 1985.

Dailey J W, Reith M E A, Yan Q S, Li M Y, Jobe P C. **Anticonvulsant doses of carbamazepine increase hippocampal extracellular serotonin in genetically epilepsy-prone rats: dose response relationships.** *Neuroscience Letters*, v. 227, p.13-16, 1997.

Dimmock J. R., Sidhu K. K., Thayer R. S., e col. **Anticonvulsant activities of some aryl semicarbazones displaying potent oral activity in the maximal electroshock screen in rats accompanied by high protect indices.** *Journal of Medicinal Chemistry*. v.36, p. 2243-52, 1993.

Dimmock J.R. & Baker G.B. **Anticonvulsant Activities of 4-Bromobenzaldehyde Semicarbazone.** *Epilepsia* v.35, p.648-655, 1994.

Dimmock J.R., Sidhu K.K., Tumber S.D. **Some aryl semicarbazones possessing anticonvulsant activities.** *European Journal of Medicinal Chemistry*. v.30, p.287-301, 1995.

Doretto, M.C., Garcia-Cairasco, N., Pimenta, N.J., Souza, D.A., Tatsuo, M.A. **Dipyrone, a novel anticonvulsant agent? Insights from three experimental epilepsy models.** *Neuroreport*. v.9, n.10, p.2415-21, 1998.

Doretto M.C., Burger R.L., Mishra P.K., Garcia-Cairasco N., Dailey J.W., Jobe P.C. **A microdialysis study of amino acid concentrations in the extracellular fluid of the substantia nigra of freely behaving GEPR-9s:**

**relationship to seizure predisposition.** *Epilepsy Research*, v.17, n.2, p.157-65, 1994.

Doretto M.C., Fonseca C.G., Lobo R.B., Terra V.C., Oliveira J.A.C. Garcia-Cairasco N. **Quantitative study of the response to genetic selection of the Wistar Audiogenic Rat strain (WARS).** *Behavior Genetics*, v.33, p. 33-42, 2003.

Dyer K.R. & Shell L.G. **Anticonvulsant therapy: a practical guide to medical management of epilepsy in pets.** *Veterinary Medicine*, v.88, 647-653, 1993.

Engel J. **Concepts of epilepsy.** *Epilepsia*. v.36(suppl.1), p.23-29, 1995.

Faingold C.L., Browning R.A. **Mechanisms of anticonvulsant drug action. I. Drugs primarily used for generalized tonic-clonic and partial epilepsies.** *European Journal Pediatrics*, v.146, n.1, p.2-7, 1987.

Faingold C.L. & Caspary D.M. **Effect of convulsant drugs on the brainstem.** In: *Epilepsy and reticular formation: The role of reticular core in convulsive Seizures.* Fromm G, H, Faingold C. L., Browning R. A., Burnham W. M. Alan R. Liss edition: New York Ed. Alan R. Liss, p. 39-80, 1987.

Faingold C.L., Naritoku D.K., Copley C.A., Randall M.E., Riaz A., Anderson C.A., Arnerić S.P. **Glutamate in the inferior colliculus plays a critical role**

**in audiogenic seizure initiation.** *Epilepsy Research.* v.13, n.2, p.95-105, 1992.

Faingold C.L. **Neuronal networks in the genetically epilepsy prone rat.** *Advances in Neurobiology.* v.79, p.311-21, 1999.

Faingold C.L., Casebeer D. **Modulation of the audiogenic seizure network by noradrenergic and glutamatergic receptors of the deep layers of superior colliculus.** *Brain Research,* v.821, p.392-99, 1999.

Faingold C.L. **Emergent properties of CNS neuronal networks as targets for pharmacology: application to anticonvulsant drug action.** *Progress in Neurobiology.* v.72, p.55-85, 2004.

Feng H.J. & Faingold C.L. **Modulation of audiogenic seizure by histamine and adenosine receptors in the inferior colliculus.** *Experimental Neurology,* 163, p.264-270, 2000.

Fernandes P.T. & Li Min Li. **Percepção de estigma na epilepsia.** *Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology.* v. 12, n.4, 2006.

Fisher R.S. **Animal Model of Epilepsies.** *Brain Research Review.* v.14, p.245-78, 1989.



Fisher R.S., Emde B.W., Blume W., Elger C., Genton P., Lee P., Engel J. **Epileptic seizures and epilepsy: Definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE).** *Epilepsia*, v.46, p.470-472, 2005.

Gale K. **Progression and generalization of seizure discharge: anatomical and neurochemical substrates.** *Epilepsia*, v.29,suppl. 2, p.15-34, 1988.

Garcia-Cairasco N, Sabbatini R.M. **Role of the substantia nigra in audiogenic seizures: a neuroethological analysis in the rat.** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.16, p.171-183, 1983.

Garcia-Cairasco, N., Terra, V.C., Doretto, M.C., **Midbrain substrates of audiogenic seizures in rats.** *Behavioral Brain Research*, v.58, p.57-67, 1993.

Garcia-Cairasco N., Wakamatsu H., Oliveira J.A.C., Gomes E.L.T., Del Bel E.A., Mello L.E.A. **Neuroethological and morphological (Neo -Tim staining) correlates of limbic recruitment during the development of audiogenic kindling in seizure susceptible Wistar rats.** *Epilepsy Research*, v.26, p.177-192, 1996.

Garcia-Cairasco N. **A critical review on the participation of inferior colliculus in acoustic-motor and acoustic-limbic networks involved in**

**the expression of acute and kindled audiogenic seizures.** *Hearing Research*, v.168, p.208-222, 2002.

Giorgi O, Orlandi M, Lecca D, Corda M. **MK-801 prevents chemical kindling induced by pentylenetetrazol in rats.** *European Journal of Pharmacology*, v.193, p.363-65, 1991.

Gower A.J., Hirsh E., Boehrer A., Noyer M., Marescaux C. **Effects of levetiracetam, a novel antiepileptic drug, on convulsant activity in two genetic rat models of epilepsy.** *Epilepsy Research*. v.22, p.207-13, 1995.

Graumlich J.F., McLaughlin R.G., Birkhahn D., Shah N., Burk A., Jobe P.C., Dailey J.W. **Carbamazepine pharmacokinetics-pharmacodynamics in genetically epilepsy-prone rats.** *European Journal of Pharmacology*, v.369, p.305-11, 1999.

Green A.R. & Murray T.K. **A simple intravenous infusion method in rodents for determining the potency of anticonvulsants acting through GABAergic mechanisms.** *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. v.41, n.12, p.879-80, 1989.

Gross R.A. **A brief history of epilepsy and its therapy in the western hemisphere.** *Epilepsy Research*, v.12, p.65-74, 1992.

Guilhoto L.M.F.F., Muszkat R.S., Yacubian E.M.T. **Consenso Terminológico da Associação Brasileira de Epilepsia (ABE)**. *Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology*, v.12, n.3, p.175-77, 2006.

Huang R., Bell-Horner C.L., Dibas M.I., Covey D.F. Drewe J.A. e Dillon G.H. **Pentylentetrazole-induced inhibition of recombinant aminobutyric acid type A (GABAA) receptors: mechanism and site of action**. *Pharmacology and Experimental Therapeutics*. v.298, n.3, p.986-995, 2001.

Isoherrane N. Woodhead J. H., White H. S., Bialer M. **Anticonvulsant Profile of Valroceimide (TV1911): A New Antiepileptic drug**. *Epilepsia*, v.42, n.7, p.831-36, 2001.

Jun H.W. **Pharmacokinetic Studies of Pentilenetetrazol in Dogs**. *Journal of Pharmaceutic Sciences*. v. 65, n.7, p.1038-41, 1976.

Kiesmann M., Marescaux C., Vergnes M., Micheletti G., Depaulis A., Warster J.M. **Audiogenic seizures in Wistar rats before and after repeated auditory stimuli: clinical, pharmacological, and electroencephalographic studies**. *Journal of Neural Transmission*, v.72, n.3, p.235-244, 1988

Kitano Y., Komiyama C., Makino M., Takasuna K., Takawasa A., Sakurada S. **Anticonvulsant properties of novel nootropic agente nefetiracetam in seizures models of mice and rats**. *Epilepsia*, v.46, n.6, p.811-818, 2005

Knowles K. **Idiopathic epilepsy.** *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, v.13, p.144-151, 1998.

Lees G.V. & Jones E.G. Adaptado por J.O. McNamara. **Epilepsy.** *Neurobiology of Disease*, v.7, p.549-551, 2000.

Licht B. G., Licht M. H., Harper T. M., Lin S. L., Curtin J. J., Hyson L. L., and Willard K. **Clinical presentations of naturally occurring canine seizures: similarities to human seizures.** *Epilepsy & Behavior*, v.3, p.460-470, 2002.

Löscher W., Fassbender C.P., Nolting B. **The role of technical, biological and pharmacological factors in the laboratorial evaluation of anticonvulsivant drugs. III. Pentylenetetrazole seizure models.** *Epilepsy Research*, v.8, p.78-94, 1991

Löscher W & Fiedler M. **The role of technical, biological and pharmacological factors in the laboratorial evaluation of anticonvulsivant drugs: VI Seasonal influences on maximal electroshock and pentylenetetrazol seizure threshold.** *Epilepsy Research*, v.25, p.03-10, 1996.

Löscher, W. **Animal models of intractable epilepsy.** *Progress in Neurobiology*, v.53, n.2, p.239-58, 1997

Löscher, W. **New visions in the pharmacology of anticonvulsion.** *European Journal of Pharmacology*, v.342, p.1-13, 1998.

Löscher W. **Animal models of epilepsy for the development of antiepileptic and disease modifying drugs. A comparison of the pharmacology of kindling and post- status epilepticus models of temporal lobe epilepsy.** *Epilepsy Research*.v.50, p.105-23, 2002.

Löscher W & Leppik I. E. **Critical re-evaluation of previous preclinical strategies for the discovery and the development of new antiepileptic drugs.** *Epilepsy Research*, v.50, n.1, p.17-20, 2002.

Löscher W., Potschka H., Rieck T., Tipold T., and Rundfeldt T. **Anticonvulsant efficacy of the low-affinity partial benzodiazepine receptor agonist ELB 138 in a dog seizure model and in epileptic dogs with spontaneously recurrent seizures.** *Epilepsia*, v. 45, p.1228-1239, 2004.

Magistris M.R., Mouradian M.S. Gloor P. **Generalized convulsions induced by pentylenetetrazol in the cat: participation of forebrain, brainstem, and spinal cord.** *Epilepsia*, v.29, n.4, p.379-388, 1988.

Maguire J.L., Stell B.M., Rafizadeh M., Mody Istvan. **Ovarian cycle-linked changes in GABA<sub>A</sub> receptors mediating tonic inhibition alter seizure susceptibility and anxiety.** *Nature Neuroscience*, v.8, n.6, 2005

March P.A. **Seizures: Classification, etiologies, and pathophysiology.** *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, v. 13, n.3, p.119-131, 1998.

McKeown M.J. & McNamara J.O. **When do epileptic seizures really begin?** *Neuron*, v.30, p.1-9, 2001.

Meldrum B.S. **In vivo and in vitro models of epilepsy and their relevance to man.** In: *Anatomy of epileptogenesis*. Ed. John Libbey: Paris, p.27-42, 1988.

Melo L. E. A. M. **O desenvolvimento de novas estruturas moleculares.** In: *Tratamento medicamentoso das epilepsias*. Yacubian E. M. T. São Paulo: Lemos editorial, p.107-116, 1999.

Mishra P.K., Dailey J.W., Reigel C.E., Tomsic M.L., Jobe P.C. **Sex-specific distinctions in audiogenic convulsions exhibited by severe seizure genetically epilepsy-prone rats (GEPR-9s).** *Epilepsy Research*, v.2, n.5, p.309-16, 1988.

Moraes, M.F.D. **Epilepsia Experimental: estudos eletrofisiológicos e comportamentais em modelos animais de crises convulsivas audiogênicas.** 1-265. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da universidade de São Paulo. Ref Type: Thesis/Dissertation, 1998.

Moraes M.F.D., Galvis-Alonso O.Y., Garcia-Cairasco N. **Audiogenic kindling in the Wistar rat: a potential model for recruitment of limbic structures.** *Epilepsy Research*, v.39, n.3, p.251-9, 2000.

Moraes M.F.D., Chavali M., Mishra P.K., Jobe P.C. , Garcia-cairasco N. **A comprehensive electrographic and behavioral analysis of generalized tonic-clonic seizures of GEPR-9s.** *Brain Research*, v.1033, p.1-12, 2005.

Naritoku D. K., Mecozzi L. B., Aiello M. T., **Faingold C.L. Repetition of audiogenic seizure in genetically epilepsy- prone rats induced cortical epileptiform activity and adicional seizure behaviors.** *Experimental Neurology*, v.115, n.3, p.317-24, 1992.

Nehlig A. & Boehrer A.. **Effects of remacemide in two models of genetically determined generalized epilepsy, the GAERS and audiogenic Wistar AS.** *Epilepsy Research*, v.52, p. 253-61, 2003.

Nelson R.W & Couto C.G. **Fundamentos de medicina interna de pequenos animais.** Ed. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, 1994.

Ochoa J. G., Riche W. **Antiepileptic drugs: an overview.** Technical report, emedicine, <http://www.emedicine.com/Neuro/topic692.htm>, novembro de 2005.

Pandeya S. N., Yogeeswari P., and Stables J. P. **Synthesis and anticonvulsant activity of 4-bromophenyl substituted aryl semicarbazones.** *European Journal of Medicinal Chemistry*, v.35, p.879-886, 2000.

Pimenta, N. J. G., **Comparação do efeito anticonvulsivante da dipirona com drogas de primeira linha no tratamento de crises tônico-clônicas generalizadas.** Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. 2004.

Podell M. **Seizures in dogs.** *Veterinary Clinics of North America-Small Animal Practice*, v.26, 779-809, 1996.

Pohl M. & Mares P. **Flunarizine influence metrazol-induced seizures in development rats.** *Epilepsy Research*, v.1, p.302-5, 1987.

Racine R. J. **Modification of seizure activity by electrical stimulation. motor seizure.** *Electroencephalographic Clinical Neurophysiology*, v.32, p.281-294, 1972.

Ramu K., Lam G. N., Hughes H. **In vivo metabolism and mass balance of 4[4-fluorofenoxy]benzaldehyde semicarbazonas in rats.** *Drug metabolism and disposition*, v.28, n.10, p.1153-1161, 2000.



Rang H. P., Dale M. M., Ritter J. M. **Farmacologia**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 56, 2001.

Rigoulot M. A., Boehrer A., Nehlig A. **Effects of topiramate in two models of genetically determined generalized epilepsy, the GAERS and the audiogenic Wistar AS**. *Epilepsia*, v.46, n.1, p.14-19, 2003.

Rho J. M. & Sankar R. **The pharmacologic basis of antiepileptic drug action**. *Epilepsia*. v.40, n.11, p.1471-83, 1999.

Ryan M. & Baumann R. .J. **Use and monitoring of bromides in epilepsy treatment**. *Pediatric Neurology*, v. 21, p.523-528, 1999.

Shell L. G. **Seizures in dogs and cats: Taking a logical approach to an age-old problem**. *Veterinary Medicine*, v.88, p. 620-628, 1993.

Stables J. P., Bertram E. H., White H. S., Couter D. A. e cols. **Models for epilepsy and epileptogenesis: Report from the NIH workshop, Bethesda, Maryland**, *Epilepsia*, v.43, n.11, 1410-1420, 2002.

Sechi, G., Rosati G. Deiana G. A., Petruzzi, V., Deriu F., Correddu P., Riu P. L. D. **Co-variation of free amino acids in brain interstitial fluid during pentylenetetrazole-induced convulsive status epilepticus**. *Brain Research*, v.764, p.230-36, 1997.

Sedgwick, C. J. **Allometric scaling and emergency care: the importance of body size.** In: Fowler, M E. *Zoo & Wild animal Medicine: current therapy* 3. 3 ed. Denver: Saunders company, 1993.

Sousa, S. M. M. **Cálculo alométrico para animais silvestres.** 1-23. Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. Ref. Type: Seminário, 2006.

Teixeira, L. R.; Sinisterra, R. D.; Vieira R. P.; Doretto M. C.; Beraldo H. **Inclusion of Benzaldehyde Semicarbazone into hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin Produces a Very Effective Anticonvulsivant Formulation.** *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry.* v.47, p.77-82, 2003.

Triola M. F. **Introdução à estatística.** 7 ed. Rio de Janeiro: LTC, 1999.

Turski W. A., Cavalheiro E. A., Coimbra C., Penha P. M., Ikonomidou-Turski C., Turski L. **Only certain antiepileptic drugs prevent seizures induced by pilocarpina.** *Brain Research,* v.434, p.281-305, 1987.

Velisek L., Kubova H., Pohl M., Stankova L., Mares P. e Schickerova R. **Pentylentetrazol-induced seizures in rats: an ontogenetic study.** *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol,* v. 346, p.588-91, 1992.

Vergnes M., Kiesmann M., Marescaux C., Depaulis A., Mucheletti G. **Kindling of audiogenic seizures in the rat.** *Internal Journal of Neuroscience*, v.36, n.3, p.167-76, 1987.

Walsh L. A., Li M., Zhao T., Chiu T. H. Rosenberg H. C. **Acute Pentylenetetrazol Injection Reduces Rat GABA<sub>A</sub> Receptor mRNA Levels and GABA Stimulation of Benzodiazepine Binding with No Effect on Benzodiazepine Binding Site Density** *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. v.289, p.1626-1633, 1999.

White, H. S. **Comparative anticonvulsant and mechanistic profile of the established and newer antiepileptic drugs.** *Epilepsia*, v.40,s.5, p.2-10, 1999.

White, H. S. **Preclinical development of antiepileptic drugs: past, present, and future directions.** *Epilepsia*, v.44, suppl.7, p.2-8, 2003.

Yacubian E. M. T. **Tratamento medicamentoso das epilepsias.** Ed. Lemos: São Paulo, 1999.

## Anexos

### Peso

Cães	Semanas					Média	DPM
	1	2	3	4	5		
1	6,00	5,80	5,50	5,30	5,90	5,70	0,29
2	8,30	8,10	8,00	7,90	8,60	8,18	0,28
3	8,85	9,00	8,50	8,70	8,80	8,77	0,19
4	10,50	11,00	10,90	10,90	10,80	10,82	0,19
5	6,60	6,70	6,70	6,60	6,70	6,66	0,05
<b>Média</b>	8,05	8,12	7,92	7,88	8,16	-	-
<b>DPM</b>	1,80	2,03	2,04	2,13	1,92	-	-

**Tabela 6.** Média  $\pm$  DPM em kg do peso de todos os animais durante o experimento de PTZ. \*  $p \leq 0,05$ .

### Temperatura

Dia	Antes					Depois				
	Cães									
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	38,7	39,4	38,7	38,9	39,8	38,4	39,1	39,0	39,0	39,5
3	39,0	38,7	38,7	38,0	39,9	38,6	38,7	38,8	39,0	39,4
4	39,0	39,2	38,7	39,2	39,6	38,7	38,8	39,2	38,5	39,0
5	38,3	39,3	38,9	39,2	39,0	38,9	38,0	39,0	38,7	39,1
<b>Média</b>	38,8	39,2	38,8	38,8	39,6	38,7	38,7	39,0	38,8	39,3
<b>DVM</b>	0,3	0,3	0,1	0,6	0,4	0,2	0,5	0,2	0,2	0,2

**Tabela 7.** Média  $\pm$  DPM em °C da temperatura retal de todos os animais antes e depois de cada protocolo de PTZ. \*  $p \leq 0,05$ .

## Frequência cardíaca

Dia	Antes					Depois				
	Cães									
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
<b>1</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>2</b>	106	124	116	120	120	120	140	112	104	120
<b>3</b>	134	112	124	134	104	100	104	116	132	116
<b>4</b>	84	120	116	96	124	96	88	126	108	96
<b>5</b>	140	120	120	140	100	102	120	120	108	126
<b>Média</b>	116	119	119	123	112	105	113	119	113	115
<b>DVM</b>	26	5	4	20	12	11	22	6	13	13

**Tabela 8.** Média  $\pm$  DPM em batimentos por minuto (BPM) da frequência cardíaca de todos os animais antes e depois de cada protocolo de PTZ. \*  $p \leq 0,05$ .

## Frequência Respiratória

Dia	Antes					Depois				
	Cães									
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
<b>1</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>2</b>	-	-	-	-	-	60	48	80	-	120
<b>3</b>	168	156	184	156	104	80	100	-	84	84
<b>4</b>	84	120	116	96	124	72	100	64	-	100
<b>5</b>	140	152	172	138	92	160	180	152	180	160
<b>Média</b>	131	143	157	130	107	93	107	99	132	116
<b>DVM</b>	43	20	36	31	16	45	54	47	68	33

**Tabela 9.** Média  $\pm$  DPM em movimentos por minuto da frequência respiratória de todos os animais antes e depois de cada protocolo de PTZ. \*  $p \leq 0,05$ .

### Mioclonia parcial

Cão	Limiar de PTZ					Média	DPM
	0	50	100	150	200		
1	31,4	30,5	41,4	38,1	39,0	36,1	4,8
2	28,5	30,9	34,0	37,6	37,5	33,7	4,0
3	31,9	32,8	34,8	39,0	33,8	34,5	2,8
4	20,5	19,2	15,3	18,4	22,1	19,1	2,6
5	15,5	29,3	24,6	26,2	18,6	22,8	5,7
<b>Mediana</b>	<b>28,5</b>	<b>30,5</b>	<b>34,0</b>	<b>37,6</b>	<b>33,8</b>		
<b>1° quartil</b>	<b>20,5</b>	<b>29,3</b>	<b>24,6</b>	<b>26,2</b>	<b>22,1</b>		
<b>3° quartil</b>	<b>31,4</b>	<b>31,0</b>	<b>34,8</b>	<b>38,1</b>	<b>37,5</b>		

**Tabela 10.** Efeito de dose única de BrBS ou CMC 0,5%(controle) no limiar de PTZ, em mg/kg, para mioclonia parcial. O limiar foi calculado duas horas após a administração do BrBS ou CMC 0,5% via oral. Os dados paramétricos foram expressos como média  $\pm$  DPM e os dados não paramétricos foram expressos como mediana seguidos de 1° e 3° quartis.

### Abalo mioclônico generalizado

Cão	Limiar de PTZ					Média	DPM
	0,0	50,0	100,0	150,0	200,0		
1	31,7	31,3	46,3	42,5	39,0	38,1	6,6
2	28,9	33,4	38,0	42,0	37,5	36,0	5,0
3	31,9	32,6	34,8	48,0	37,2	36,9	6,5
4	29,7	19,2	21,1	18,4	36,1	24,9	7,7
5	18,4	34,5	29,6	29,8	29,1	28,3	5,9
<b>Mediana</b>	<b>29,7</b>	<b>32,6</b>	<b>34,8</b>	<b>42,0</b>	<b>37,2</b>		
<b>1° quartil</b>	<b>28,9</b>	<b>31,3</b>	<b>29,6</b>	<b>29,8</b>	<b>36,1</b>		
<b>3° quartil</b>	<b>31,7</b>	<b>33,4</b>	<b>38,0</b>	<b>42,5</b>	<b>37,5</b>		

**Tabela 11.** Efeito de dose única de BrBS ou CMC 0,5%(controle) no limiar de PTZ, em mg/kg, para abalo mioclônico generalizado. O limiar foi calculado duas horas após a administração do BrBS ou CMC 0,5% via oral. Os dados paramétricos foram expressos como média  $\pm$  DPM e os dados não paramétricos foram expressos como mediana seguidos de 1° e 3° quartis.

