

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA

Letícia Lazzarotto

**EFEITO NEUROPROTETOR DA LACOSAMIDA SOBRE PARÂMETROS  
COMPORTAMENTAIS, BIOQUÍMICOS E MITOCONDRIAIS EM  
CAMUNDONGOS**

Porto Alegre

2019

Letícia Lazzarotto

**EFEITO NEUROPROTETOR DA LACOSAMIDA SOBRE PARÂMETROS  
COMPORTAMENTAIS, BIOQUÍMICOS E MITOCONDRIAIS EM  
CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia e Terapêutica.

Orientador: Profa. Dra. Patrícia Pereira

Porto Alegre

2019

### CIP - Catalogação na Publicação

Lazzarotto, Leticia

Efeito neuroprotetor da lacosamida sobre parâmetros comportamentais, bioquímicos e mitocondriais em camundongos / Leticia Lazzarotto. -- 2019.

82 f.

Orientadora: Patrícia Pereira.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Lacosamida. 2. Epilepsia. 3. Pentilenotetrazol. 4. Neuroinflamação. 5. Estresse oxidativo. I. Pereira, Patrícia, orient. II. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:

FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA

A Banca examinadora abaixo assinada aprova a dissertação de mestrado intitulada

**EFEITO NEUROPROTETOR DA LACOSAMIDA SOBRE PARÂMETROS  
COMPORTAMENTAIS, BIOQUÍMICOS E MITOCONDRIAIS EM  
CAMUNDONGOS**

Elaborada por

**LETÍCIA LAZZAROTTO**

Como requisito parcial para a obtenção do título de

Mestre em Farmacologia e Terapêutica

Aprovado em: \_\_\_\_ de \_\_\_\_ de \_\_\_\_.

---

Profa. Dra. Patrícia Pereira (Presidente da banca)

---

Profa. Dra. Adriana Simon Coitinho (UFRGS)

---

Prof. Dr. Régis Adriel Zanette (UFRGS)

---

Profa. Dra. Liciane Medeiros (La Salle)

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gratidão a Deus pelo dom da vida e pela força de seguir em frente a cada novo dia.

Aos meus pais, Edite e Paulo, pelo amor, incentivo e confiança infinitos.

À professora Dra. Patrícia Pereira, meu sincero agradecimento pelo acolhimento, confiança, orientação e amizade.

Às colegas de laboratório, Pricila, Fernanda, Gabriela, Débora, Luciane e Jordana pela amizade, conversas, ensinamentos e ajuda.

Aos professores do PPG Farmacologia e Terapêutica, pelo conhecimento transmitido. Aos funcionários, em especial a Ieda por toda a dedicação.

À técnica de laboratório Chris Krebs pela amizade, auxílio e paciência.

À amiga e colega Simone, por todas as nossas conversas, almoços compartilhados, confidências e desabafos desde a graduação.

Aos meus colegas de PPGFT, em especial a Edson e Josimar, pela amizade, angústias e risadas compartilhadas.

Ao departamento de Farmacologia/ICBS por disponibilizar a infraestrutura e seus funcionários.

Aos meus colegas de trabalho, pelo apoio e incentivo durante esses dois anos.

A todos que de alguma forma acreditaram e contribuíram para esta conquista. A todos vocês, meu profundo agradecimento!

*“Nunca toque numa vida se não pretende romper o coração.”*

*Mário Quintana*

## RESUMO

Lacosamida (LCM) é um fármaco anticonvulsivante de terceira geração, aprovado como terapia adjuvante no tratamento de crises de início focal com ou sem generalização secundária em pacientes adultos. O mecanismo de ação, ainda não completamente elucidado, concentra-se na inativação lenta de canais de sódio dependentes de voltagem, proporcionando estabilização de membranas hiperexcitáveis. Possui características farmacocinéticas favoráveis como rápida absorção oral, biodisponibilidade de aproximadamente 100% e baixo potencial para interações medicamentosas. O presente estudo (número de aprovação 34.134) teve como objetivo explorar o perfil farmacológico de LCM em convulsões induzidas por pentilenotetrazol (PTZ) no modelo de *Kindling* bem como sobre parâmetros de estresse oxidativo, função mitocondrial, genotoxicidade e mutagenicidade, apoptose neuronal e neuroinflamação. Um total de 142 camundongos machos CF-1 (com idade de 45 dias e peso entre 30-50 g) foram divididos em seis grupos experimentais: salina ( $n = 24$ ), salina-PTZ ( $n = 23$ ), diazepam-PTZ ( $n = 24$ ), LCM 20 mg/kg-PTZ ( $n = 24$ ), LCM 30 mg/kg-PTZ ( $n = 24$ ) e LCM 40 mg/kg-PTZ ( $n = 23$ ). Os animais receberam em dias alternados, por um período de 11 dias, injeções intraperitoneais de solução salina e diazepam (2 mg/kg) 30 minutos antes do estímulo subconvulsivo (PTZ 50 mg/kg, s.c.); LCM (20, 30 ou 40 mg/kg) foi administrada por gavagem uma hora antes da administração de PTZ. No último dia de tratamento, os animais foram eutanasiados e os tecidos coletados (hipocampo para medidas bioquímicas e teste cometa alcalino, sangue periférico também para teste cometa alcalino e medula óssea para o teste de micronúcleos). Os parâmetros avaliados durante 30 minutos foram a latência para a primeira convulsão (LFS) e a porcentagem de convulsões. Os resultados demonstraram que LCM não impediu a ocorrência de convulsões nem aumentou a LFS, com exceção do terceiro dia de tratamento, no qual observou-se aumento na LFS e diminuição da porcentagem de convulsões no grupo LCM 40 mg/kg-PTZ, comportamento que não se repetiu ao longo do protocolo. Observou-se nos três grupos tratados com LCM diminuição na formação de espécies reativas de oxigênio como também diminuição na atividade da superóxido dismutase e da catalase, sugerindo que LCM pode exercer efeito através de outras defesas antioxidantes. Além disso, nos grupos tratados com as maiores doses de LCM foi observada melhora na atividade enzimática do complexo mitocondrial I-III em comparação ao grupo salina e salina-PTZ, provavelmente devido ao efeito antioxidante promovido por LCM. A dose de 30 mg/kg também foi capaz

de melhorar a atividade do complexo II em comparação ao grupo controle salina-PTZ. Nos grupos LCM 20 mg/kg-PTZ e 30 mg/kg-PTZ observou-se proteção ao ácido desoxirribonucleico (ADN) no hipocampo, uma vez que não houve diferença em comparação ao grupo salina; em sangue periférico não houve diferença entre os grupos. Também não foi observada mutagenicidade em nenhum dos grupos de tratamento. LCM nas três doses não exerceu efeito significativo sobre a expressão de Bcl-2; no entanto, LCM 20 mg/kg induziu aumento na expressão de ciclo-oxigenase-2 quando comparado ao grupo salina. Para concluir, apesar de LCM não prevenir o comportamento convulsivo, este composto mostrou potencial para reduzir a produção de radicais livres e o dano ao ADN causado por PTZ no modelo de *kindling* em camundongos.

**Palavras-chave:** lacosamida, epilepsia, pentilenotetrazol, estresse oxidativo, neuroinflamação, camundongos



## ABSTRACT

Lacosamide (LCM) is a third generation antiepileptic drug, approved as adjunctive therapy in the treatment of focal onset seizures with or without secondary generalization in adult patients. The mechanism of action, still not completely elucidated, focuses on the slow inactivation of voltage-dependent sodium channels, providing stabilization of hyperexcitable membranes. It has favorable pharmacokinetic characteristics such as rapid oral absorption, bioavailability around 100% and low potential for drug interactions. The present study (authorization number 34.134) aimed to explore the pharmacological profile of LCM in pentylenetetrazol (PTZ) induced seizures in the kindling model, as well as on oxidative stress parameters, mitochondrial function, genotoxicity and mutagenicity, neuronal apoptosis and neuroinflammation in mice. A total of 142 CF-1 male mice (45 days old and weighing between 30-50 g) were divided into six experimental groups: saline ( $n = 24$ ), saline-PTZ ( $n = 23$ ), diazepam-PTZ ( $n = 24$ ), LCM 20 mg/kg-PTZ ( $n = 24$ ), LCM 30 mg/kg-PTZ ( $n = 24$ ) and LCM 40 mg/kg-PTZ ( $n = 23$ ). Animals were given intraperitoneal injections of saline and diazepam (2 mg/kg) 30 minutes before the subconvulsive stimuli (PTZ 50 mg/kg, s.c.); LCM (20, 30 or 40 mg/kg) was administered by gavage one hour before PTZ administration. On the last day of treatment, the animals were euthanized and the tissues were collected (hippocampi for biochemical analysis and alkaline comet assay, peripheral blood also for alkaline comet assay and bone marrow for micronucleus test). The parameters evaluated during 30 minutes were the latency for the first seizure (LFS) and the percentage of seizures. The results showed that LCM did not prevent seizures or increase LFS, except for the third day of treatment, in which there was an increase in LFS and a decrease in the percentage of seizures in the group treated with LCM 40 mg/kg, behavior that not repeated throughout the protocol. In all three groups treated with LCM, there was a decrease in the formation of reactive oxygen species, as well as a decreased in the activity of superoxide dismutase and catalase activity, suggesting that another mechanism may be involved in this antioxidant activity. In addition, in the groups treated with the highest doses of LCM, an improvement in the enzymatic activity of the mitochondrial complex I-III was observed in comparison to the saline and saline-PTZ groups, probably due to the antioxidant effect promoted by LCM. The 30 mg/kg dose was also able to improve complex II activity compared to the saline-PTZ control group. In the LCM 20 mg/kg-PTZ and 30 mg/kg-PTZ groups, deoxyribonucleic acid (DNA) protection was observed in the hippocampi, as there was

no difference compared to the saline group; in peripheral blood there was no difference between groups. No mutagenicity was observed in any of the treatment groups. LCM had no significant effect on Bcl-2 expression; however, LCM 20 mg/kg induced an increase in cicloxygenase-2 expression when compared to the saline group. In conclusion, although LCM is not able to prevent the convulsive behavior, this compound exhibit potential to reduce free radicals and the genotoxic damage caused by the PTZ-kindling model in mice.

**Keywords:** lacosamide, epilepsy, pentylenotetrazol, oxidative stress, neuroinflammation, mice

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Classificação expandida dos tipos de crise epilética.....	4
<b>Figura 2</b> Efeitos do GABA e do glutamato na transmissão do impulso nervoso dos neurônios transmissores aos neurônios receptores. ....	7
<b>Figura 3</b> Número de anticonvulsivantes e ano de introdução .....	9
<b>Figura 4</b> Principais mecanismos de inativação de radicais livres .....	17
<b>Figura 5</b> Estrutura química da lacosamida .....	21
<b>Figura 6</b> Ativação e inativação dependente da voltagem em canais de sódio.....	22

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> Fármacos antiepiléticos, indicações terapêuticas, mecanismos de ação e efeitos adversos .....	11
<b>Tabela 2</b> Principais propriedades farmacocinéticas da lacosamida .....	23
<b>Tabela 3</b> Frequências dos efeitos adversos de anticonvulsivantes .....	24

## LISTA DE FÓRMULAS E ABREVIATURAS

<b>ACOs</b>	Anticoncepcionais orais
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AMPA</b>	Alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>AP-1</b>	Fator ativador de proteína-1
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>BDNF</b>	Fator neurotrófico derivado do cérebro
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Íon cálcio
<b>CAT</b>	Catalase
<b>COX-1</b>	Ciclo-oxigenase-1
<b>COX-2</b>	Ciclo-oxigenase-2
<b>CYP450</b>	Citocromo P450
<b>ELT</b>	Epilepsia do lobo temporal
<b>EROs</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>ERNs</b>	Espécies reativas de nitrogênio
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>GABA</b>	Ácido gama-aminobutírico
<b>GPx</b>	Glutathiona peroxidase
<b>HO<sub>2</sub>·</b>	Radical hidroperoxil
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrogênio
<b>IL-1β</b>	Interleucina-1β
<b>IL-6</b>	Interleucina-6
<b>ILEA</b>	Liga Internacional contra a Epilepsia
<b>K<sup>+</sup></b>	Íon potássio
<b>LMC</b>	Lacosamida
<b>MAP quinase</b>	Proteína-quinase ativada por mitógeno
<b>Na<sup>+</sup></b>	Íon sódio

<b>Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase</b>	Bomba de sódio/potássio
<b>NADH</b>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
<b>NF-κB</b>	Fator nuclear-κB
<b>NMDA</b>	N-metil D-aspartato
<b>NT-3</b>	Neurotrofina 3
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxigênio molecular
<b>O<sub>2</sub><sup>·-</sup></b>	Radical superóxido
<b>OH<sup>·</sup></b>	Radical hidroxila
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>	Oxigênio singlete
<b>PTZ</b>	Pentilenotetrazol
<b>P2MRC</b>	Proteína 2 mediadora de resposta a colapsina
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>SOD</b>	Superóxido dismutase
<b>TNF-α</b>	Fator de necrose tumoral alfa
<b>TNFR1</b>	Receptor TNF tipo 1
<b>UQ</b>	Coenzima Q
<b>UQH<sub>2</sub></b>	Coenzima Q reduzida

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	2
1.1	EPILEPSIA .....	2
1.1.1	Classificação .....	3
1.1.2	Fisiopatologia.....	5
1.1.2.1	Glutamato e GABA .....	6
1.1.3	Tratamento farmacológico .....	8
1.2	ESTRESSE OXIDATIVO .....	15
1.3	NEUROINFLAMAÇÃO .....	18
1.3.1	IL-1 $\beta$ .....	19
1.3.2	TNF- $\alpha$ .....	19
1.3.3	COX .....	20
1.4	LACOSAMIDA .....	20
1.5	MODELO DE KINDLING. ....	24
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	25
2.1	OBJETIVO GERAL .....	25
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	25
<b>3</b>	<b>ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	26
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	27
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	30
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	31
	<b>ANEXO</b> .....	39

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 EPILEPSIA

Epilepsia é uma desordem neurológica crônica associada a uma significativa taxa de morbidade e mortalidade (Otte et al., 2012). Caracteriza-se por convulsões recorrentes não provocadas, resultantes de desequilíbrio na atividade elétrica neural, ainda vagamente compreendida, entre neurotransmissão excitatória e inibitória (Zsurka & Kunz, 2015). No entanto, nos últimos anos tem-se apreciado o papel do estresse oxidativo e da neuroinflamação na etiologia das doenças neurodegenerativas e desordens neurológicas, incluindo a epilepsia (Majak & Pitkänen, 2004), constituindo novos focos de pesquisa para o tratamento desta patologia.

De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (2018), estima-se que 50 milhões de pessoas são acometidas por esta desordem que desconhece raça, idade, padrões sociais ou limites geográficos (Silva, 2014). No Brasil, a epilepsia na infância apresenta uma variação na prevalência de 11,9 a 21 casos em cada 1000 crianças, taxas semelhantes a outros países em desenvolvimento (Noronha et al., 2007). Sintomas clínicos de uma crise epilética aguda abrangem disfunção neurológica que ocasiona distúrbios de cognição, consciência, movimentos involuntários, manifestações psíquicas, sensoriais e de comportamento, resultante da atividade hipersincrônica, excessiva e repetitiva de neurônios no córtex cerebral (Duncan, 2011). Comorbidades como depressão, ansiedade, comprometimento de aprendizado e memória acompanham a epilepsia e decorrem da interconectividade entre redes neurais.

Apesar da introdução de novos fármacos antiepiléticos, muitos ainda apresentam efeitos adversos e interações medicamentosas importantes, impedindo o uso continuado dos mesmos. Dados epidemiológicos sugerem que um terço dos pacientes com epilepsia são refratários aos tratamentos disponíveis (OMS, 2018), levando em consideração que, os medicamentos existentes não tratam os mecanismos fisiopatológicos em si, apenas suprimem as crises convulsivas. A busca por um melhor entendimento do processo de epileptogênese é necessária e permite que alvos terapêuticos sejam descobertos e assim, fármacos mais eficazes e com menos efeitos adversos sejam desenvolvidos (de Vries et al., 2016).



### 1.1.1 Classificação

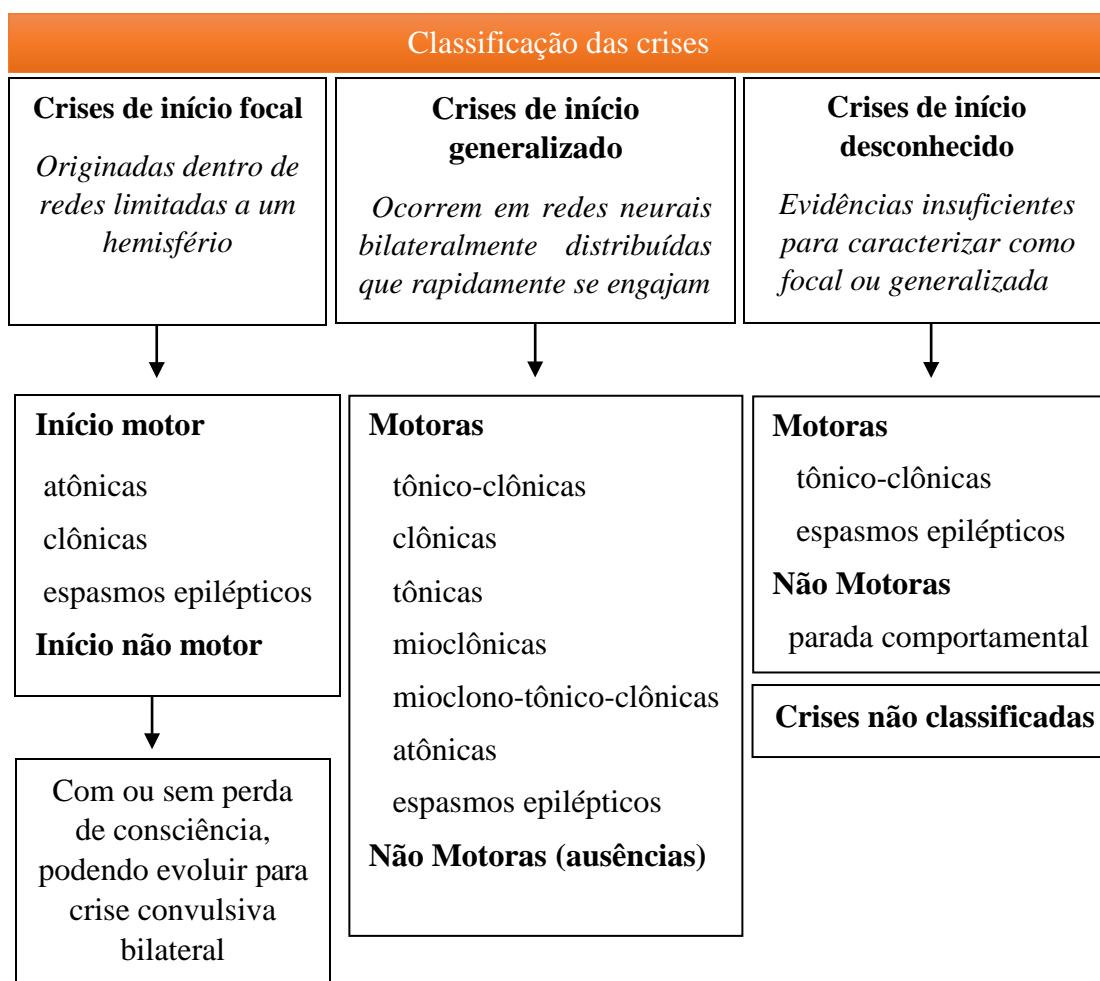
Em 2014, a ILEA (Liga Internacional Contra a Epilepsia) propôs uma definição operacional de epilepsia para aplicação na prática clínica, sendo epilepsia definida como qualquer uma das condições a seguir (Fisher et al., 2014):

- I. pelo menos duas crises epiléticas espontâneas não provocadas ocorrendo em um intervalo superior a 24 horas;
- II. uma crise não provocada e uma probabilidade de novas crises (cerca de 60%) semelhantes ao risco geral de recorrência após duas crises espontâneas;
- III. pelo menos duas crises num contexto de epilepsia reflexa.

A classificação da epilepsia é feita de acordo com as características das crises, podendo ser em dois grandes eixos, topográfico e etiológico. No eixo topográfico, de acordo com a classificação de 2017 (Fischer et al., 2017), as crises se dividem em início focal, generalizado ou ainda desconhecido, como esquematizado na **Figura 1**.

Nas crises focais ocorre descarga neuronal em um local restrito do encéfalo, restringindo-se a um hemisfério cerebral e as manifestações clínicas são dependentes do local de início, bem como da velocidade de propagação da descarga epileptogênica. As crises dividem-se em focais de início motor (atônicas, clônicas, espasmos epiléticos) ou ainda de início não motor (parada comportamental). Também pode ocorrer perda de consciência (Fischer et al., 2017). A epilepsia focal mais comumente encontrada é a epilepsia do lobo temporal (ELT), que atinge pelo menos 20% dos pacientes epiléticos e é considerada a mais refratária dentre as existentes (Reddy & Kuruba, 2013).

Crises epiléticas generalizadas originam-se concomitantemente nos dois hemisférios. De forma geral, são geneticamente determinadas e acompanhadas de alteração da consciência. Como seus principais exemplos temos as crises motoras (mioclônica, tônica, clônica e tônico-clônica - antigamente denominada “grande mal” em que ocorre contração tônica e sustentada de toda a musculatura corporal) e não motoras (crises de ausência, antigamente denominada “pequeno mal”) (Fischer et al., 2017).



**Figura 1** Classificação expandida dos tipos de crise epilética

Adaptado de Fischer et al. (2017)

Quanto a etiologia, as epilepsias podem ser divididas em estrutural/metabólica, genética, infecciosa e de origem desconhecida. O conceito de epilepsia estrutural refere-se a anormalidades visíveis em estudos de neuroimagem que são responsáveis por causar crises nos pacientes como, por exemplo, acidente vascular cerebral, trauma, infecção e também malformações no córtex cerebral (Gaillard et al., 2009). Nesse mesmo contexto, alterações metabólicas (glicose, cálcio, sódio, magnésio) ou bioquímicas como porfiria, uremia, aminoacidopatias ou crises por dependência de piridoxina são capazes de dar origem a crises epiléticas. É provável que a grande maioria das epilepsias metabólicas possui base genética, mas algumas podem ser adquiridas, tais como a deficiência cerebral de folato (Gaillard et al., 2009).

Epilepsia genética é resultado direto de defeito (s) genético (s) conhecido ou presumido (s) em que as convulsões são a principal expressão desta alteração, por exemplo, esclerose tuberosa e malformações do desenvolvimento cortical. No entanto, não é excluída a possibilidade de que fatores ambientais possam contribuir para a expressão da doença (Berg et al., 2010).

A etiologia mais comum em todo o mundo é a epilepsia que ocorre como resultado de infecção (Vezzani et al., 2016). Infecções como neurocisticercose, vírus da imunodeficiência humana, malária e toxoplasmose cerebral e infecções congênitas causadas pelo Zika vírus e citomegalovírus possuem grande potencial de causar crises epiléticas. Por último, epilepsias de causa desconhecida devem ser vistas de forma neutra e indicar que a natureza da causa subjacente ainda é desconhecida; podem ser oriundas de um defeito genético fundamental em sua essência ou ainda a consequência de uma outra alteração ainda não reconhecida (Berg et al., 2010).

Estimativas sugerem que cerca de 80% dos casos de epilepsia ocorrem em países em desenvolvimento (OMS, 2018), onde se encontra um número maior de pessoas desnutridas, com doenças infecciosas e com deficiência no atendimento médico, sendo que grande parte dos pacientes permanece sem o tratamento adequado (Megiddo et al., 2016).

### 1.1.2 Fisiopatologia

Apesar da fisiopatologia da epilepsia ainda ser pouco compreendida, sabe-se que há um desequilíbrio no mecanismo excitatório e inibitório do sistema nervoso central (SNC). Ambos os neurotransmissores glutamato e ácido gama-aminobutírico (GABA) possuem papel crucial no fenômeno da epilepsia (Eyo et al., 2017).

A enzima transmembrana  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase, com o objetivo de manter o potencial de repouso, libera íon sódio ( $\text{Na}^+$ ) para o meio extracelular e íon potássio ( $\text{K}^+$ ) para o meio intracelular, em uma proporção de  $3\text{Na}^+/2\text{K}^+$ , fazendo com que o interior da membrana fique com uma carga elétrica negativa em relação ao seu exterior (polarizada). Com o estímulo nervoso, ocorre a despolarização (potencial de ação), processo no qual ocorre a abertura de canais de  $\text{Na}^+$ , ocasionando a sua entrada para o ambiente intracelular. Em seguida, com a saída de  $\text{K}^+$  pela abertura de seus canais e através do transporte ativo de  $\text{Na}^+$  para o meio extracelular através da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase, ocorre a

repolarização da membrana. Essa excitabilidade intrínseca do sistema nervoso que é controlada pela abertura ou bloqueio dos canais iônicos dependentes de voltagem e que são regulados pelo influxo de cátions para o interior do neurônio tem papel importante no surgimento das crises.

Os canais de Na<sup>+</sup> dependentes de voltagem são um dos principais responsáveis pela despolarização rápida e desordenada da membrana neuronal nas crises convulsivas, sendo que mutações em subunidades desses canais no SNC foram reportadas em algumas formas de epilepsia (Porto et al., 2007). Já os canais de K<sup>+</sup> dependentes de voltagem participam da repolarização e hiperpolarização da membrana, evitando a repetição no potencial de ação. Mutações nos genes que codificam esses canais provocam diminuição da repolarização, ocasionando hiperexcitabilidade (Porto et al., 2007).

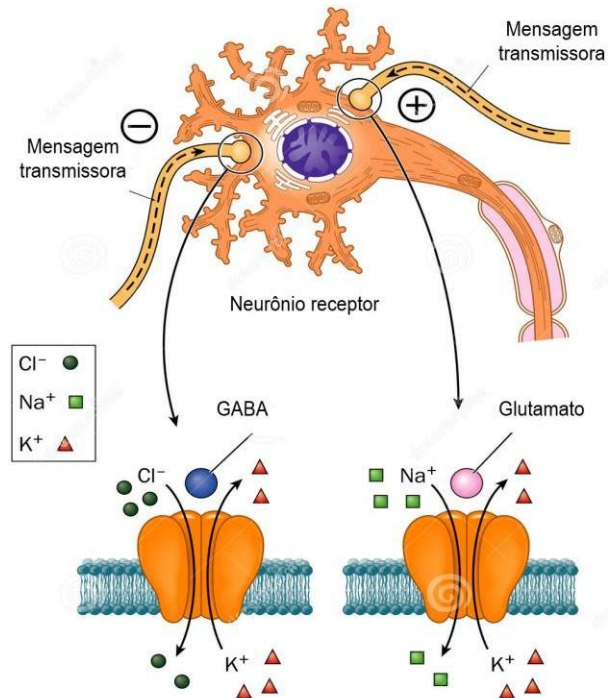
### 1.1.2.1 Glutamato e GABA

Glutamato é o principal neurotransmissor responsável pelo potencial pós-sináptico excitatório enquanto que GABA é capaz de gerar potenciais inibitórios por hiperpolarizar membranas (**Figura 2**). Receptores glutamatérgicos são divididos em ionotrópicos [ligados a canais de cálcio (Ca<sup>2+</sup>) como N-metil-D-aspartato (NMDA), alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA) e cainato] e metabotrópicos (acoplados à proteína G). O receptor NMDA tem relevante atuação nas alterações despolarizantes capazes de produzir descargas epiléticas (França, 1998).

Em relação a receptores GABAérgicos, estes dividem-se em receptores GABA<sub>A</sub> (canais iônicos dependentes de ligantes), que medeiam rápidos potenciais pós-sinápticos inibitórios por aumentar o influxo de cloreto e receptores GABA<sub>B</sub> (receptores acoplados à proteína G) que medeiam lentos potenciais pós-sinápticos inibitórios por aumentar a condutância de potássio e diminuir a entrada de Ca<sup>2+</sup> (Hui Yin et al., 2013).

No entanto, convulsões epiléticas não são resultantes apenas do excesso de excitação, e sim do desequilíbrio de influências excitatórias e inibitórias (Scharfman, 2007). Em alguns casos, a incapacidade do sistema inibitório pode estar na origem da perturbação epilética (Ogiwara et al., 2007), ou seja, a ineficiência de GABA também pode produzir maior excitabilidade neuronal. Assim, anormalidades da neurotransmissão como aumento da transmissão excitatória, diminuição da transmissão inibitória ou ambas

as situações têm como consequência alterações na excitabilidade de neurônios, promovendo crises convulsivas (Meldrum, 1984).



**Figura 2** Efeitos do GABA e do glutamato na transmissão do impulso nervoso dos neurônios transmissores aos neurônios receptores

Adaptado de <https://es.dreamstime.com/foto-de-archivo-neurotransmisores-implicados-en-epilepsia-image12522920>

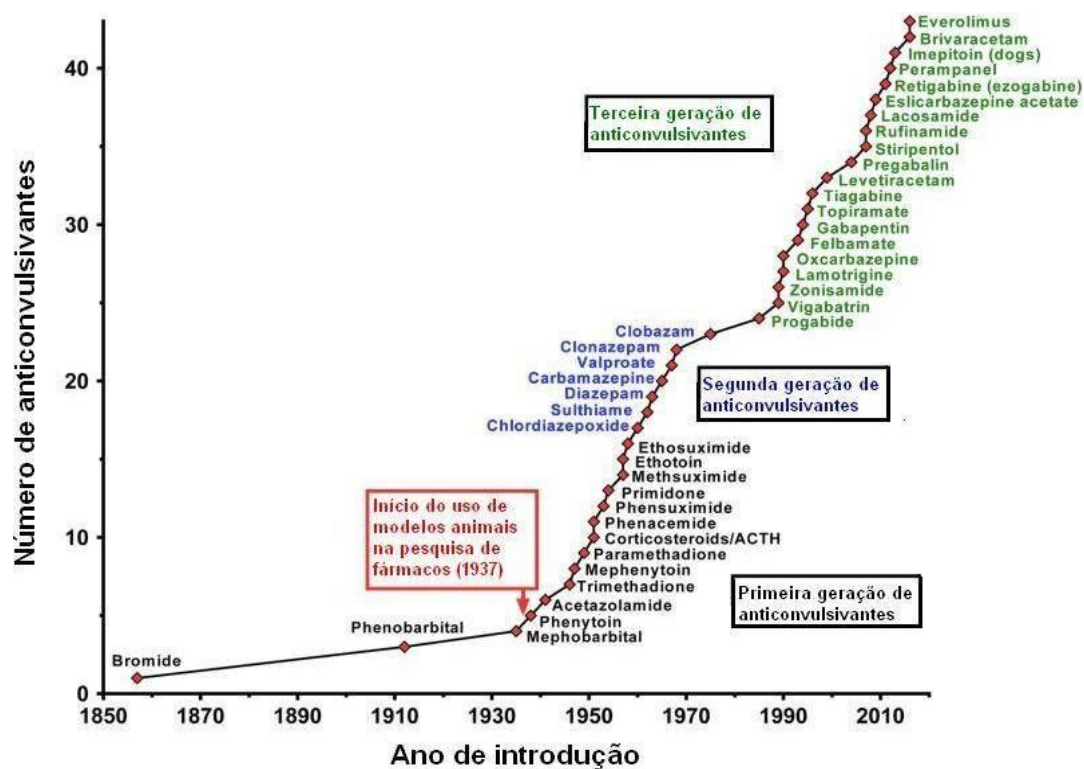
Nos últimos anos, a neuroinflamação e o estresse oxidativo têm ganhado destaque na fisiopatologia da epilepsia. Sabe-se que a resposta inflamatória promove ativação das células da glia (microglia e astrócitos), liberando mediadores pró-inflamatórios como interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) que juntamente com radicais livres provenientes do estresse oxidativo contribuem para a excitotoxicidade e estão envolvidos em uma significativa perda de células neuronais após insultos cerebrais provenientes de crises convulsivas (Vezzani et al., 2016).

### 1.1.3 Tratamento farmacológico

Os fármacos antiepiléticos, também conhecidos como anticonvulsivantes, são usados para tratar a epilepsia bem como alterações convulsivas não epileptiformes (Rang & Dale, 2012). Podem ser definidos como substâncias capazes de diminuir a incidência e a severidade das crises em pacientes portadores de síndromes epiléticas. A escolha terapêutica deve levar em consideração o tipo de crise, a idade e o sexo do paciente e as comorbidades associadas. De forma geral, a epilepsia é completamente controlada em aproximadamente dois terços dos pacientes (OMS, 2018).

Os antiepiléticos (**Tabela 1**) atuam basicamente inibindo a despolarização neuronal anormal ou sua propagação. Apesar de reduzirem drasticamente a recorrência de crises com o tratamento a longo prazo, não atuam sobre os mecanismos de epileptogênese. Fármacos antiepiléticos podem ter múltiplos mecanismos de ação, sendo os principais: potencialização da ação de GABA (por meio de ações sobre receptores ou na síntese, recaptação e degradação do GABA), bloqueio dos canais de sódio voltagem dependentes, bloqueio dos canais de cálcio do tipo T, interferência na atividade da proteína vesicular SV2A e modulação glutamatérgica (Gomez & Torres, 2017).

O sal de brometo de potássio foi o primeiro fármaco antiepilético utilizado, baseando-se na ideia errônea de que pacientes com epilepsia apresentavam hipersexualidade (Porto et al., 2007) (**Figura 3**). A partir da década de 1990, antiepiléticos de terceira geração forneceram aos médicos e pacientes mais opções para o tratamento dos diversos tipos de convulsões, além de apresentarem menos efeitos adversos e interações farmacológicas (Löscher et al., 2013), representando um avanço no tratamento da epilepsia. Fármacos de segunda geração como diazepam, carbamazepina e valproato de sódio ainda são amplamente utilizados.



**Figura 3** Número de anticonvulsivantes e ano de introdução

Fonte: Löscher (2017)

No entanto, apesar do aparato de fármacos disponíveis, um número considerável de pacientes continua sem redução significativa das crises. Além disso, interações entre fármacos antiepiléticos e outros grupos farmacológicos são relativamente frequentes, sendo que interações tanto de natureza farmacocinética quanto farmacodinâmica podem levar ao abandono do tratamento pelos efeitos adversos secundários ou insucesso terapêutico. O valproato de sódio, por exemplo, é inibidor enzimático de amplo espectro (Gomez & Torres, 2017), reduzindo o metabolismo e aumentando concentrações séricas dos fármacos afetados, tornando-os tóxicos.

Os anticoncepcionais orais (ACO) representam um grupo farmacológico que potencialmente interage com anticonvulsivantes. Fármacos como fenobarbital, fenitoína e carbamazepina podem reduzir o efeito de ACOs pela indução metabólica das enzimas hepáticas do citocromo P450 (CYP450) (Gomez & Torres, 2017). Anticonvulsivantes de terceira geração como levetiracetam, gabapentina, zonisamida, lacosamida e retigabina contornam esse problema, ou seja, não alteram as concentrações séricas de etinilestradiol

ou de progestógenos exógenos como levonorgestrel (Gomez & Torres, 2017), tornando-se uma alternativa ao uso concomitante com ACOs.

Grupos de fármacos que modulam o neurotransmissor GABA causam fadiga, diminuição cognitiva e ganho de peso, além de possuírem propriedades ansiolíticas e antimaníacos. Já fármacos que interferem mais especificamente com o neurotransmissor glutamato causam perda de peso e possíveis efeitos ansiogênicos e antidepressivos. Topiramato com propriedades tanto GABAérgicas quanto glutamatérgicas possui perfil misto. Carbamazepina, oxcarbazepina e valproato têm mostrado resultados positivos como estabilizadores de humor no tratamento de transtorno bipolar e agressão (Kaminski et al., 2014; Habibi et al., 2016).

É importante observar que os efeitos adversos mais comuns, citados na **Tabela 1**, costumam ser dose-dependentes, ou seja, quanto maior a dose diária utilizada, mais intensos os sintomas.



**Tabela 1** Fármacos antiepiléticos, indicações terapêuticas, mecanismos de ação e efeitos adversos

	<b>Indicações</b>	<b>Mecanismo de ação</b>	<b>Efeitos adversos</b>
<b>Fármacos de 1ª geração</b>			
Fenobarbital (1912)	Crises focais e generalizadas	Modulação GABAérgica	Sedação, alteração de humor (principalmente depressão)
Fenitoína (1936)	Crises focais e generalizadas	Bloqueio dos canais de Na <sup>+</sup> dependentes de voltagem	Hipersensibilidade cutânea, hipertrofia gengival, anemia megaloblástica e hirsutismo
Primidona (1954)	Crises focais e generalizadas	Potencialização GABAérgica	Indutor enzimático, sedação, hipersensibilidade cutânea
Etossuximida (1960)	Crises focais e generalizadas	Bloqueio dos canais de Ca <sup>2+</sup> tipo T	Náusea, vômito, sedação, perda de peso
<b>Fármacos de 2ª geração</b>			
Diazepam (1963)	Estado de mal epilético	Potencialização GABAérgica	Sedação, induz tolerância farmacológica
Valproato de sódio/ Ácido valproico (1970)	Crises focais e generalizadas, incluindo ausências	Potencialização GABAérgica, bloqueio dos canais de Na <sup>+</sup> modulação de vias do glutamato	Náusea, vômitos, dispepsia, elevação transitória das transaminases hepáticas, alopecia e aumento do peso; indutor enzimático de amplo espectro
Carbamazepina (1974)	Crises focais com ou sem generalização; modulador de humor na doença bipolar	Inativação dos canais de Na <sup>+</sup> tipo 2, inibindo a descarga neuronal rápida	Sedação, cefaleia, tremor, ataxia, náusea e vômito; pode precipitar ou agravar crises de ausência

### Fármacos de 3ª geração

Gabapentina (1994)	Adjuvante para crises focais com ou sem generalização; dor neuropática e fobia social	Modulação dos canais de $Ca^{2+}$ dependentes, redução da liberação de monoaminas e glutamato efeitos GABAérgicos indiretos	Sonolência, tontura, ataxia, fadiga; em crianças pode ocorrer infecção viral, hostilidade e labilidade emocional
Lamotrigina (1995)	Monoterapia ou adjuvante para crises focais e generalizadas incluindo ausência e síndrome de Lennox-Gastaut; tratamento da doença bipolar	Bloqueio dos canais de $Na^+$ , modulação de glutamato e aspartato, antagonismo serotoninérgico em receptores 5-HT <sub>3</sub> e inibição modesta da recaptação de monoaminas	Vômito, incoordenação motora, dispepsia, náusea, tontura, ansiedade, insônia, perda de peso; pode precipitar ou agravar crises mioclônicas
Tiagabina (1997)	Adjuvante para crises focais em adolescentes > 12 anos e adultos	Bloqueio do receptor de GABA (GAT-1) e sua recaptação nos neurônios e glia	Tontura, sonolência, tremor; risco de crise epilética em pacientes não epiléticos
Topiramato (1997)	Crises focais ou generalizadas tônico-clônicas e síndrome de Lennox-Gastaut; profilaxia da enxaqueca	Bloqueio dos canais de $Na^+$ , ações GABAérgicas e antiglutamatérgicas	Parestesias, perda de peso, sonolência, anorexia, tontura, tremor, problema de memória, depressão e humor; risco de acidose metabólica por inibir a anidrase carbônica
Levetiracetam (1999)	Adjuvante para crises focais em adultos e crianças > 4 anos; epilepsia mioclônica juvenil, epilepsia idiopática	Efeito GABAérgico e antikingling, reduções das correntes de $K^+$ , ligação com a proteína SV2	Sonolência, fadiga, problemas de coordenação motora, humor, comportamento ou ansiedade
Oxcarbazepina (2000)	Monoterapia ou adjuvante para crises focais em adultos e crianças > 4 anos	Inativação dos canais de $Na^+$ tipo 2, inibindo a descarga neuronal rápida	Sedação, cefaleia, tonturas, tremor, fadiga

Zonisamida (2000)	Adjuvante para crises focais em adultos	Bloqueio dos canais de Na <sup>+</sup> e redução das correntes de Ca <sup>2+</sup> tipo T	Sonolência, anorexia, tonturas, cefaleia, náusea, agitação ou irritabilidade
Pregabalina (2005)	Adjuvante para crises focais em adultos; dor neuropática, fibromialgia e ansiedade generalizada	Modulação de canais de Ca <sup>2+</sup> , redução da liberação de monoaminas e glutamato, efeitos GABAérgicos indiretos	Tontura, sonolência, edema periférico, boca seca, astenia, visão borrada; potencial de abuso e dependência
Estiripentol (2007)	Adjuvante para crises focais e generalizadas refratárias incluindo ausências atípicas intratáveis, síndrome de Dravet	Modulador alostérico direto do receptor de GABAA em sítio distinto dos benzodiazepínicos; efeito sinérgico com outros antiepiléticos por inibição de CYP-450	Náuseas, vômitos, dor epigástrica, anorexia, insônia dose-dependente, irritabilidade, hiperatividade, letargia, labilidade emocional
Lacosamida (2008)	Adjuvante para crises focais refratárias em pacientes > 16 anos	Inativação lenta aprimorada dos canais de Na <sup>+</sup> dependentes de voltagem	Tontura, vertigem, alteração da coordenação motora, náuseas, vômitos e transtornos visuais
Rufinamida (2008)	Adjuvante para síndrome de Lennox-Gastaut em pacientes > 4 anos	Inativação lenta dos canais de Na <sup>+</sup> dependentes de voltagem	Sonolência, tontura, fadiga, cefaleia
Vigabatrina (2009)	Adjuvante para crises focais refratárias em adultos e espasmos infantis	Inibição irreversível da GABA-transaminase	Constricção do campo visual por retinopatia GABAérgica
Ezogabina/ Retigabina (2011)	Adjuvante para crises parciais em adultos refratárias a outros antiepiléticos e com benefícios superando o risco de efeitos adversos oftalmológicos	Reduz a excitabilidade neuronal potencializando a atividade dos canais de K <sup>+</sup> KCNQ	Lentificação cognitiva, visão dupla, alterações da fala, fadiga, ganho de peso, sintomas urinários, erupção cutânea, descoloração dos lábios e sintomas digestivos

Perampanel (2012)	Adjuvante para crises focais e generalizadas em adultos e crianças > 12 anos	Antagonismo não competitivo sobre receptores glutamatérgicos pós-sinápticos AMPA	Tontura, sonolência, cefaleia, ganho de peso; sintomas psiquiátricos com agressividade, irritabilidade, e ideação suicida
Acetato de eslicarbazepina (2013)	Adjuvante para crises focais refratárias em adultos	Bloqueio dos canais de Na <sup>+</sup> dependentes de voltagem	Tontura, sonolência, náuseas, cefaleia, visão borrada, fadiga

Adaptado de Gomez & Torres (2017); Löscher et al. (2013)

## 1.2 ESTRESSE OXIDATIVO

A mitocôndria é a principal fonte de geração de radicais livres, uma vez que o metabolismo de respiração celular normal gera espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs). EROs podem ser definidos como moléculas que possuem elétrons desemparelhados no seu orbital mais externo.

A cadeia respiratória mitocondrial é constituída por um conjunto de complexos multienzimáticos bioquimicamente conectados (complexos I, II, III, IV e V) localizados na membrana interna da mitocôndria, além dos transportadores de elétrons, coenzima Q (UQ) e citocromo *c*, e das proteínas ferro-enxofre. Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido (NADH) e o succinato, provenientes do ciclo do ácido cítrico, ao alcançarem a cadeia respiratória, transferem seus elétrons para a coenzima Q numa reação catalisada pelos complexos I (NAD desidrogenase) e II (succinato desidrogenase). O complexo III (citocromo *c* oxiredutase) transporta os elétrons da coenzima Q reduzida (ubiquinol)(UQH<sub>2</sub>) para o citocromo *c* e deste os elétrons chegam ao seu destino final, o oxigênio molecular (O<sub>2</sub>) na citocromo *c* oxidase (complexo IV) (Nelson & Cox, 2011).

No complexo IV ocorre a redução completa uma molécula de O<sub>2</sub> em duas moléculas de água, exigindo a presença de quatro elétrons. Devido a configuração eletrônica triplete da molécula de oxigênio, esta tem tendência em receber um elétron de cada vez e o oxigênio não é liberado antes da obtenção de sua redução total (Turrens, 1997), fazendo com que a produção de EROs por meio da redução monoelétrica do O<sub>2</sub> pelo complexo IV seja praticamente inexistente.

Portanto, a produção mitocondrial de EROs ocorre nos passos intermediários da cadeia respiratória, sendo os principais sítios de formação os complexos I e III (Adam-Vizi & Chinopoulos, 2006; Kowaltowski et al., 2009). A passagem de elétrons do complexo I para a UQH<sub>2</sub> e desta para o complexo III pode fazer com que o radical Q passe um elétron diretamente ao O<sub>2</sub>. Uma série de intermediários tóxicos e reativos pode ser formada (Boveris & Cadenas, 1975), incluindo o radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), radical peroxil (ROO<sup>•</sup>), radical hidropoxil (HO<sub>2</sub><sup>•</sup>), radical hidroxila (OH<sup>•</sup>), e espécies de radicais sem elétrons livres tais como, peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e o oxigênio singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), que são facilmente convertidos em radicais livres (Halliwell & Gutteridge, 1984).

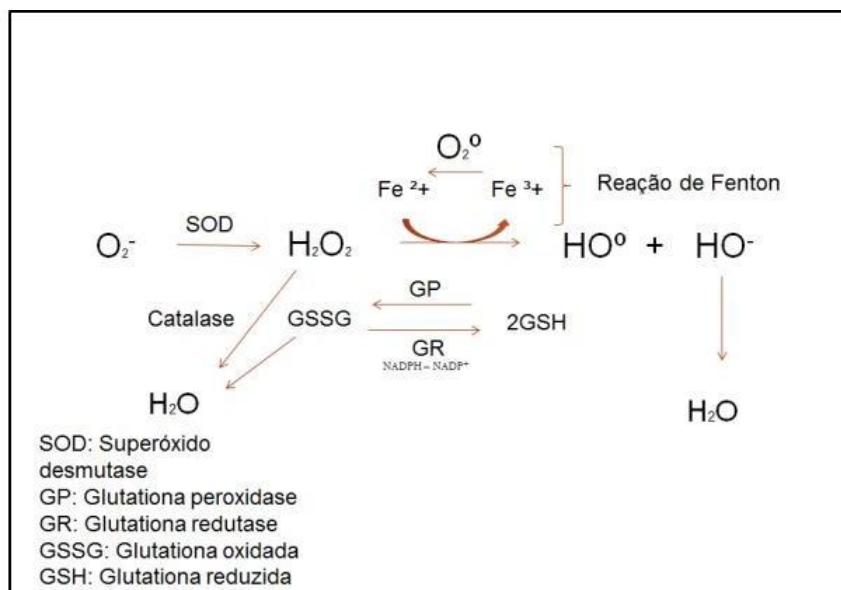
Apesar da regulação redox envolvendo EROs ser essencial para a modulação de funções celulares (principalmente em astrócitos e microglia), tais como ativação da cascata da proteína quinase ativada por mitógeno (MAP-quinase), transporte de íons,

mobilização de cálcio e ativação de apoptose (Aguiar et al., 2012), as EROs têm sido relacionadas a uma variedade de condições neurológicas agudas e crônicas, incluindo convulsões (Dal-Pizzol et al., 2000).

Em condições fisiológicas, mecanismos de defesa atuam para manter o equilíbrio entre produção e eliminação de EROs. No entanto, quando há um desequilíbrio nesse sistema ocorre o fenômeno chamado de estresse oxidativo, que pode causar danos em componentes celulares como lipídios, proteínas e ácido desoxirribonucleico (ADN). O tecido cerebral, devido a uma maior taxa de consumo de oxigênio, ao alto conteúdo de ácidos graxos, a baixas quantidades de antioxidantes e a uma menor capacidade regenerativa, torna-se mais suscetível a este processo (Aguiar et al., 2012).

Como forma de eliminar EROs, o organismo possui defesas antioxidantes, representadas por sistemas enzimáticos e não-enzimáticos. Os principais antioxidantes não-enzimáticos, adquiridos de forma exógena pela absorção de alimentos, podem ser divididos em: vitaminas lipossolúveis (vitamina A, vitamina E, betacaroteno), vitaminas hidrossolúveis (vitamina C, vitaminas do complexo B) e oligoelementos (zinco, cobre, selênio, magnésio). Santos e colaboradores (2008) estudaram os efeitos neuroprotetores da vitamina C em ratos após convulsões induzidas por pilocarpina e verificaram que, o pré-tratamento com esta vitamina antes da administração do agente convulsivante foi capaz de aumentar a latência para a primeira convulsão e diminuir a mortalidade ocasionada pela pilocarpina, bem como diminuir os níveis de peroxidação lipídica, processo responsável pela ruptura de membranas celulares, formação de resíduos químicos como o malondialdeído e mutações no ADN (Halliwell & Gutteridge, 1989).

Entre as enzimas antioxidantes estão: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutationala peroxidase (GPx) (**Figura 4**). Entre estas, a SOD e CAT são as mais importantes por formarem as primeiras linhas de defesa antioxidante do organismo (Aguiar et al., 2012). Estudos reportam que a prolongada excitação dos neurônios durante as convulsões pode resultar em morte de células gliais e neuronais (Arnaiz et al., 1998), cujo possível mecanismo envolve superprodução de EROs como também diminuição das defesas antioxidantes enzimáticas (Berg et al., 1995; Naffah-Mazzacoratti et al., 2001).



**Figura 4** Principais mecanismos de inativação de radicais livres

Fonte: Paes (2017). A SOD transforma o radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). O  $H_2O_2$  pode ser convertido em água ( $H_2O$ ) pela enzima CAT e ou se transformar em radical hidroxil ( $HO^{\cdot}$ ) e radical hidroxila ( $OH^-$ ) devido a reação de Fenton. A hidroxila pode se complexar com  $H^+$  presentes na célula e se transformar em  $H_2O$ . A glutatona reduzida (GSH), catalisada pela enzima glutatona peroxidase (GPx), capta o  $HO^{\cdot}$  ou  $H_2O_2$ , levando a formação de glutatona oxidada (GSSG) que libera uma molécula de  $H_2O$ .

Dessa forma, o estresse oxidativo bem como a disfunção mitocondrial (ocasionada pela produção excessiva de EROs) são considerados possíveis mecanismos na patogênese da epilepsia. Além disso, o estresse oxidativo pode ser causa e/ou consequência do processo inflamatório, sendo os astrócitos as células-chave para ambos os processos (Jensen et al., 2013). O estresse oxidativo contribui para a excitotoxicidade do glutamato, o qual é responsável por aumentar a expressão de genes pró-inflamatórios, inibir a expressão de fatores neurotróficos e levar a célula a apoptose, comprometendo a plasticidade neuronal, condição comum na epilepsia (Réus et al., 2015).

### 1.3 NEUROINFLAMAÇÃO

A inflamação pode ser descrita como a resposta imune inata desencadeada por lesões, infecções ou qualquer estímulo nocivo, capaz de promover a síntese e liberação de mediadores inflamatórios, como citocinas e quimiocinas (Ashley et al., 2012). A inflamação aguda é uma resposta imediata em que ocorre infiltração leucocitária no tecido danificado a fim de remover o estímulo nocivo e reparar o tecido. Já a inflamação crônica estende-se por um longo período, desencadeando prejuízos ao organismo por destruir tecidos e promover excesso de reparo tecidual (Medzhitov, 2008).

A neuroinflamação é o processo inflamatório que ocorre no SNC e tem por objetivo prevenir o dano e recuperar o tecido danificado (Glass et al., 2010). No entanto, a resposta inflamatória a longo prazo tem sido relacionada a desordens neurológicas e doenças neurodegenerativas (Ellwardt & Zipp, 2014).

No SNC, microglia e astrócitos são consideradas células de resposta imune inata, responsáveis pela sobrevivência ou morte celular. Inicialmente, a microglia ativada expressa vários receptores e moléculas de adesão, e pode entrar em replicação aumentando em número, e posteriormente, se o estímulo persistir, pode adquirir capacidade de célula apresentadora de antígenos, fagocítica e pró-inflamatória, por meio da secreção de citocinas como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  e de fatores transcricionais como ativador de proteína-1 (AP1) e fator nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) (Carson et al., 2006; Lu et al., 2014).

Os astrócitos são as células gliais mais abundantes no SNC, participando da regulação e transmissão sináptica e constituindo a sinapse tripartite (Perea et al., 2009). Além disso, participam da barreira hematoencefálica, captando nutrientes para o SNC (Abbott et al., 2006), do metabolismo de aminoácidos e suporte energético para os neurônios (Simpson et al., 2007), regulam a concentração de glutamato na fenda sináptica (Araque et al., 1999) e a homeostase iônica extracelular ao tamponar íons e água (Roberta & Rossella, 2010). Também estimulam a gliose reativa, ativando a microglia e amplificando a resposta inflamatória mediante estímulos nocivos (Sukumari-Ramesh et al., 2010). A proteína ácida fibrilar glial (GFAP) e a proteína S100B são utilizadas como marcadores de resposta de astrogliose, relacionada a neurodegeneração (Hol & Pekny, 2015) e a epileptogênese (de Oliveira et al., 2008).

Alguns estudos sugerem que a inflamação envolvendo células gliais ativadas e aumento da expressão de mediadores inflamatórios específicos podem contribuir para



epileptogênese devido a alteração da excitabilidade neuronal, favorecendo assim o estabelecimento de uma rede de hiperexcitabilidade neuronal crônica que pode gerar crises espontâneas recorrentes (Wang et al., 2015). Zhao e colaboradores (2018) demonstraram que após a injeção intraventricular de meio condicionado por microglia ativada em ratos, foi observado mudança de comportamento e presença de ondas epileptiformes no eletroencefalograma, com consequente aumento de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  e assim, evidenciar o envolvimento da microglia na epileptogênese, cujo mecanismo pode estar associado ao aumento de glutamato (Zhao et al., 2018).

Por último, a análise dos níveis de IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e ciclo-oxigenase 1 e 2 (COX-1 e COX-2) em tecidos cerebrais como o hipocampo, permite avaliar o papel da resposta inflamatória durante o processo de epileptogênese (De Simoni et al., 2000; Ravizza et al., 2005; Rizzi et al., 2003).

### 1.3.1 IL-1 $\beta$

A interleucina-1 $\beta$  também conhecida como IL-1F2, relaciona-se às doenças de resposta inflamatória local e sistêmica bem como às respostas autoimunes. É capaz de ativar a transcrição de genes relacionados a resposta inflamatória como fosfolipase A<sub>2</sub>, ciclo-oxigenase-2 (COX-2), óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e prostaglandina E<sub>2</sub> (Dinarello, 2009). No SNC a principal origem da IL-1 $\beta$  é a microglia, e sua síntese ocorre na presença de patógenos ou moléculas associadas a dano celular como, por exemplo, nas lesões neuronais causadas por crises epiléticas (Simi et al., 2007). A excitotoxicidade provocada por esta citocina contribui para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas agudas e crônicas (Simi et al., 2007; Shaftel et al., 2008).

### 1.3.2 TNF- $\alpha$

Fator de necrose tumoral alfa é uma citocina pró-inflamatória predominantemente sintetizada e liberada pela microglia, mas também por astrócitos e neurônios (Welser-Alves & Milner, 2013). A elevação da forma solúvel de TNF- $\alpha$  é considerada um marcador de lesão aguda e crônica, ou seja, sinaliza a neuroinflamação na fisiopatologia de doenças neurodegenerativas como acidente vascular cerebral isquêmico, doença de Alzheimer e doença de Parkinson (McCoy & Tansey, 2008).

A forma de TNF- $\alpha$  solúvel liga-se ao receptor TNFR1 e ativa resposta de toxicidade e morte celular tanto via apoptose quanto necrose. A ativação de TNFR1 nas células gliais induz excitotoxicidade ao promover alterações nas junções comunicantes das células e liberação de glutamato (Olmos & Lladó, 2014). TNF- $\alpha$  também é capaz de causar desequilíbrio na neurotransmissão excitatória e inibitória ao alterar receptores glutamatérgicos e GABAérgicos. Assim, o aumento de TNF-  $\alpha$  induz excitotoxicidade glutamatérgica ocasionando morte neuronal (Zhu et al., 2010).

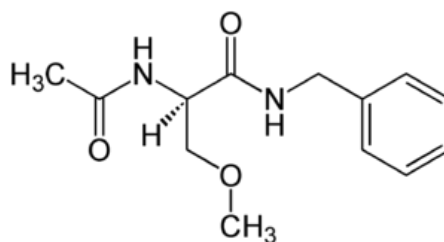
### 1.3.3 COX

A expressão e atividade da enzima ciclo-oxigenase regula a síntese de prostaglandinas. Há duas formas de COX, a COX-1 dita constitutiva, responsável pelas funções fisiológicas e a COX-2 induzível, isto é, regulada por mediadores inflamatórios e responsável por mecanismos fisiopatológicos decorrentes da inflamação. Nas desordens neuronais ocorre aumento dos níveis de COX-2 em neurônios e células da glia (Andreasson, 2010), promovendo excitotoxicidade glutamatérgica (Oliveira et al., 2008). A modulação da atividade da COX-2 utilizando anti-inflamatórios como o ácido acetilsalicílico, por exemplo, ou qualquer inibidor específico desta enzima pode ser uma opção terapêutica para o tratamento de doenças neurodegenerativas e desordens neurológicas, como a epilepsia (Salvadori et al., 2012).

## 1.4 LACOSAMIDA

A lacosamida (LCM) é um fármaco anticonvulsivante aprovado pela agência regulatória americana *Food and Drug Administration* (FDA) no ano de 2008 e no Brasil pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em 2016, como terapia adjuvante no tratamento de crises de início focal com ou sem generalização secundária em pacientes a partir de 17 anos de idade, uma vez que, atualmente, não existem dados de segurança e eficácia para faixas etárias inferiores (Beyreuther et al., 2007).

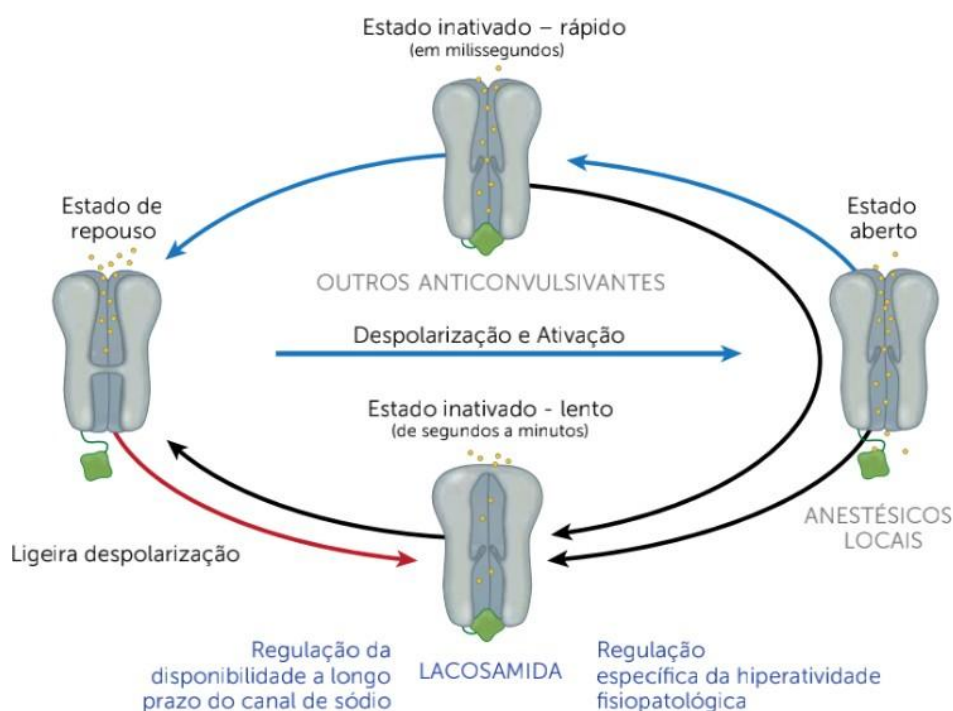
Este fármaco é classificado como um aminoácido funcionalizado (**Figura 5**), apresentando um centro quiral que possibilita a existência da molécula nos enantiômeros R ou S. A atividade anticonvulsivante, no entanto, reside exclusivamente no enantiômero R, sendo a LCM análoga ao aminoácido D-serina (de Biase et al., 2017).



**Figura 5** Estrutura química da lacosamida  
(R-2-acetamido-N-benzil-3-metoxipropionamida)

Fonte: de Biase et al. (2017)

Seu mecanismo de ação, ainda não completamente elucidado, concentra-se no aumento seletivo da inativação lenta dos canais de sódio dependentes de voltagem (**Figura 6**), sem afetar a inativação rápida, produzindo estabilização das membranas neuronais hiperexcitáveis, mecanismo esse facilitado pela proteína 2 mediadora de resposta a colapsina (P2MRC) (Beyreuther et al., 2007), uma fosfoproteína envolvida na diferenciação neuronal e no controle do crescimento axonal induzidos por fatores como fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) ou neurotrofina-3 (NT-3) (Yoshimura et al., 2005). Czech e colaboradores (2004) mostraram que P2MCR está desregulado no cérebro de pacientes com epilepsia refratária, no entanto a função da ligação da P2MRC na eficácia anticonvulsivante da LCM ainda é desconhecida.



**Figura 6** Ativação e inativação dependente da voltagem dos canais de sódio

Adaptado de Beyreuther et al. (2007). Em potencial de repouso, os canais de sódio são fechados, podendo ser abertos por despolarização rápida da membrana. Após a despolarização, os canais fecham-se dentro de alguns milissegundos e entram no estado inativado rápido. O canal encontra-se então “indisponível” para ser ativado até passar por um curto período de repolarização. Após a repolarização, o canal fica mais uma vez disponível para ser aberto. Em condições de ligeira despolarização prolongada ou atividade neuronal repetitiva, os canais de sódio podem entrar em um estado inativado lento ao fecharem o poro pelo lado interno. Fármacos podem tanto bloquear os canais abertos (anestésicos locais), aumentar a inativação rápida ou aumentar a inativação lenta (lacosamida).

Em relação as características farmacocinéticas (**Tabela 2**), LMC apresenta perfil favorável e desejável a um anticonvulsivante. É rápida e completamente absorvida após administração oral, tem perfil farmacocinético linear e baixa ligação a proteínas plasmáticas, o que permite que LCM atravesse a barreira hematoencefálica e não se acumule nos tecidos. Tem baixo potencial para interações medicamentosas visto que não exerce efeito de inibição ou indução sobre enzimas do CYP450 (UCB Pharma, VIMPAT®).

**Tabela 2** Principais propriedades farmacocinéticas da lacosamida

<b>Absorção oral rápida</b>	Rapidamente absorvida com efeito de primeira passagem negligenciável; pico plasmático atingido entre 0,5 e 4 horas; sem efeitos de alimentos na absorção
<b>Biodisponibilidade</b>	~ 100%
<b>Cinética linear</b>	Alcançado após 3 dias de administração oral duas vezes ao dia
<b>Volume de distribuição</b>	~ 0,6 L/kg
<b>Baixa ligação a proteínas plasmáticas</b>	Ligação < 15%
<b>Meia-vida plasmática</b>	~ 13 horas
<b>Excreção renal</b>	95% excretada na urina; ~ 40% secretado inalterado e ~ 30% como metabólito inativo
<b>Potencial baixo para interações medicamentosas clinicamente significativas</b>	Baixo potencial para induzir ou inibir enzimas do CYP450; inexistência de interações com etinilestradiol e levonorgestrel, digoxina, carbamazepina e valproato de sódio
<b>Parcialmente metabolizada pelo CYP2C19</b>	O-desmetil-lacosamida é o principal metabólito inativo

Fonte: UCB Pharma, VIMPAT®

Dentre os efeitos adversos muito comuns (mais de 10% dos pacientes) estão tonturas e cefaleia. Reações comuns (entre 1 e 10% dos pacientes) destacam-se insônia, estado de confusão, nistagmo, distúrbios de equilíbrio, problemas de memória, tremor, sonolência, visão dupla, vômitos, constipação, dispepsia, boca seca, prurido e *rash* cutâneo, distúrbio ao andar, fraqueza e irritabilidade (UCB Pharma, VIMPAT®).

Na **Tabela 3** estão dispostas as frequências comparadas dos efeitos adversos comuns observados nos fármacos LCM, lamotrigina, topiramato, gabapentina e vigabatrina. Apesar de presentes, os efeitos adversos da LCM apresentam baixa incidência e são dose-dependentes.

**Tabela 3** Frequências de efeitos adversos de anticonvulsivantes

<b>Medicamento</b>	<b>Sonolência</b>	<b>Náusea</b>	<b>Tontura</b>	<b>Ataxia</b>	<b>Fadiga</b>	<b>Cefaleia</b>
<b>Lacosamida</b>	4%	4%	7%	0%	1%	6%
<b>Lamotrigina</b>	0%	15%	26%	15%	9%	23%
<b>Topiramato</b>	12%	0%	7%	0%	6%	4%
<b>Gabapentina</b>	14%	0%	8%	0%	6%	8%
<b>Vigabatrina</b>	17%	9%	22%	7%	26%	33%

Fonte: UCB Pharma, VIMPAT®

## 1.5 MODELO DE KINDLING

*Kindling* ou abrasamento é um modelo crônico de epilepsia descrito pela primeira vez por Graham V. Goddard em 1969 (Goddard et al., 1969). O princípio do método consiste na administração repetitiva e intermitente de estímulos elétricos ou químicos subconvulsivantes que levam à amplificação progressiva das convulsões, resultando em atividade convulsiva generalizada (McNamara, 1984).

Conforme descrito por Goddard, o estímulo subconvulsivo inicial não produz nenhum sinal comportamental ou eletrográfico de convulsões. Quando aplicado por repetidas vezes em ratos, induz convulsões completas (Goddard et al., 1969). O princípio “convulsões geram convulsões” (Ben-Ari, 2006), descreve com precisão o princípio subjacente e o resultado do modelo de *Kindling*.

A indução do *Kindling* químico é um modelo de fácil execução que envolve a administração de substâncias químicas pró-convulsivantes (Dhir, 2012), como o pentilenotetrazol. Este é um agente antagonista do receptor GABA<sub>A</sub> que induz convulsões severas após sua administração (Orloff et al., 1949).

O modelo de *Kindling* utilizando PTZ é amplamente aceito na busca de novos fármacos antiepiléticos e as taxas de animais que atingem o estado epilético no modelo podem variar entre 20 e 80% (Bascuñana et al., 2016).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil farmacológico de lacosamida em modelo experimental de epilepsia, bem como sobre parâmetros de estresse oxidativo, função mitocondrial, genotoxicidade e mutagenicidade, apoptose neuronal e neuroinflamação em camundongos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito da lacosamida sobre:

- A percentagem de convulsões e o tempo de latência para a primeira convulsão induzidas pelo agente convulsivante PTZ no modelo de *Kindling* em camundongos;
- Parâmetros de estresse oxidativo: produção de radicais livres e atividade das enzimas antioxidantes catalase e superóxido dismutase em hipocampo;
- Função mitocondrial: atividade enzimática dos complexos mitocondriais I-III, II e II-III em hipocampo;
- Expressão de proteínas Bcl-2 e COX-2 pela técnica de *Western Blotting* em hipocampo;
- Genotoxicidade, no ensaio do cometa alcalino em hipocampo e em sangue periférico;
- Mutagenicidade, no teste de micronúcleos em medula óssea.

### **3 ARTIGO CIENTÍFICO**

---

**Lacosamide improves biochemical, genotoxic and mitochondrial parameters after PTZ-kindling model in mice**

Status: submetido na revista Pharmacology Biochemistry and Behavior



## 4 DISCUSSÃO

Epilepsia é uma desordem neurológica crônica caracterizada por convulsões espontâneas e recorrentes, sendo sua fisiopatologia ainda não completamente elucidada. Evidências sugerem uma relação intrínseca entre epilepsia, neuroinflamação, estresse oxidativo, excitotoxicidade e morte neuronal (de Vries et al., 2016).

Faltam evidências para afirmar se estresse oxidativo e neuroinflamação são causas ou consequências da epilepsia. No entanto, sabe-se que uma superprodução de radicais livres e a liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  por células gliais ativadas (gliose reativa) podem resultar em convulsões prolongadas. Como consequência, ocorre disfunção mitocondrial em tecidos cerebrais que procedem à morte neuronal e subsequente epileptogênese (Carmona-Aparicio et al., 2015).

Apesar do grande número de fármacos disponíveis comercialmente, sabe-se que um terço dos pacientes são refratários ao tratamento (OMS, 2018). Além disso, apesar de reduzirem drasticamente a recorrência de crises com tratamento a longo prazo, não atuam sobre mecanismo de epileptogênese. Outro ponto importante é o grande número de interações medicamentosas e efeitos adversos causados por fármacos antiepiléticos, o que impede a adesão medicamentosa pelo paciente. Lacosamida é um fármaco anticonvulsivante aprovado pelo órgão regulador brasileiro (ANVISA) no ano de 2016 como tratamento adjuvante em crises focais com ou sem generalização secundária em pacientes adultos. Seu perfil farmacocinético se aproxima de um fármaco ideal por apresentar rápida absorção oral e biodisponibilidade próxima a 100%, além de não induzir enzimas do citocromo P450, diminuindo as chances de interação farmacocinética entre os fármacos (Beyreuther et al., 2007). Essas características despertaram interesse em nosso estudo, e os achados estão apresentados em um artigo.

Primeiramente foi avaliado o efeito de LCM sobre o modelo de *kindling* químico utilizando o agente convulsivante PTZ. Verificou-se que as três doses utilizadas de LCM (20, 30 e 40 mg/kg) não foram capazes de prevenir o comportamento convulsivo com base na porcentagem de convulsões e no tempo de latência para a primeira convulsão. Esse mesmo efeito também foi observado por Stöhr et al. (2007), em que LCM foi inefetiva quando utilizado PTZ de forma aguda por via subcutânea.

Após, testou-se o efeito de LCM sobre a produção de EROs, utilizando o método de oxidação de H<sub>2</sub>DCF-DA descrito por LeBel et al. (1992) e sobre a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT. O tratamento de 11 dias com LCM foi capaz de

diminuir a formação de EROs promovida por PTZ, sendo que as atividades de SOD e CAT diminuíram, sugerindo que outro mecanismo pode estar envolvido nesta atividade antioxidante promovida por LCM.

O principal sítio de formação de EROs é a mitocôndria. A cadeia respiratória mitocondrial é constituída por um conjunto de complexos enzimáticos bioquimicamente conectados (complexos I, II, III, IV e V) em que a maior produção de EROs ocorre nos passos intermediários da cadeia respiratória, complexo I-III (Kowaltowski et al., 2009). O complexo II também foi reportado como um importante sítio de formação de EROs (Orr et al., 2012). Danos ou mutações nesses complexos podem aumentar a produção de EROs (Murphy et al., 2009). Embora o tratamento com PTZ não tenha diminuído significativamente a atividade dos complexos mitocondriais em comparação ao grupo salina, outros estudos relataram atividade mitocondrial diminuída com tratamento utilizando dose subconvulsiva crônica de PTZ (Bhardwaj & Kumar, 2016a; Bhardwaj & Kumar, 2016b), apoiando a hipótese de disfunção mitocondrial durante a epileptogênese. Neste estudo, LCM 30 e 40 mg/kg melhoraram a atividade do complexo I-III em comparação com os grupos salina e salina + PTZ. Da mesma forma, LCM 30 mg/kg melhorou a atividade complexo II em comparação com o grupo salina + PTZ. Sugere-se que a ação antioxidante de LCM provavelmente seja responsável por melhorar a atividade do complexo I-III em comparação com o grupo de tratamento salina, demonstrando efeito neuroprotetor.

A produção exacerbada de EROs também causa danos a componentes celulares como o ADN (Aguiar et al., 2012). Em nosso estudo, PTZ foi responsável por aumentar o dano ao ADN no hipocampo dos camundongos no ensaio do cometa alcalino, como também demonstrado por Frantz et al. (2017). O tratamento por 11 dias com LCM 20 e 30 mg/kg diminuiu o índice de dano (ID) e a frequência de dano (FD) ao ADN promovida por PTZ no hipocampo; em sangue periférico não houve diferença estatística no ID e na FD entre os grupos. Esse efeito observado no hipocampo se deve provavelmente a detoxificação de EROs promovida por LCM. Em outro estudo utilizando valproato de sódio, fármaco antiepilético que age sobre canais de sódio da mesma forma que a LCM, o ensaio cometa em sangue e hipocampo de ratos mostrou que esse fármaco possui propriedade antigenotóxica e que esta ocorre através de mecanismo antioxidante (Andreazza et al., 2008).

O teste do micronúcleo, recomendado internacionalmente para avaliar a segurança dos fármacos (Mavournin et al., 1990) também foi realizado para avaliar a possibilidade

de aumento na frequência de micronúcleos por algum dos tratamentos aplicados. Resultados mostraram que não houve diferença estatística na relação eritrócitos policromáticos/eritrócitos normocromáticos dos grupos tratados em relação ao grupo Sal/Sal, indicando que os tratamentos não foram tóxicos para medula óssea. As frequências de micronúcleos em eritrócitos policromáticos também não foram estatisticamente diferentes entre os grupos, demonstrando que PTZ sozinho e as combinações PTZ + LCM e PTZ + DZP não induzem mutações cromossômicas.

Para avaliar a influência de LCM na apoptose neuronal, investigamos a expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 pela técnica de *Western Blotting*. Sabe-se que convulsões repetidas também podem levar à perda de células neuronais, o que contribui ainda mais para a epileptogênese (Carmona-Aparicio et al., 2015). A ativação da via apoptótica intrínseca pela família Bcl-2 de proteínas apoptóticas (Bax, Bim, Bid) é a principal observada na epilepsia (Graham et al., 1996). Os resultados demonstraram que nenhum dos tratamentos aplicados modificaram a expressão de Bcl-2 em comparação ao grupo controle salina. Contudo, a apoptose neuronal podendo ser causa ou consequência da epilepsia, torna-se um potencial alvo alternativo para o tratamento desta desordem (Méndez -Armenta et al., 2014).

Por último, para investigar se LCM neuromodula a inflamação, foi estudado seu efeito sobre a expressão da enzima COX-2, também pela técnica de *Western Blotting*. A COX-2 é um importante mediador da neuroinflamação, convertendo o ácido araquidônico em prostaglandinas (PG), potentes mediadores da sinalização inflamatória (Rojas et al., 2014). A indução de enzimas COX leva a um aumento especialmente da PGE<sub>2</sub>, que pode facilitar a liberação de glutamato do nervo terminal (Mirjany et al., 2002) e favorecer a excitabilidade neuronal. No grupo tratado com LCM 20 mg/kg houve um aumento significativo da expressão de COX-2 quando comparado ao grupo salina. Podemos sugerir que o aumento da expressão de COX-2 e a consequente produção de prostaglandinas podem ter contribuído para a ineficácia de LCM no modelo de *kindling* aplicado.

## 5 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram que, embora LCM não seja capaz de impedir o estabelecimento do “estado de *kindling*”, este composto exibe potencial para reduzir os radicais livres e o dano genotóxico causado pelo agente convulsivante PTZ. LCM também foi capaz de melhorar a atividade do complexo enzimático mitocondrial I-III (principal sítio de formação de EROs) quando comparado ao grupo controle salina provavelmente devido à sua ação antioxidante. Esses achados sugerem que LCM possui efeito neuroprotetor, o qual pode ser importante para a prevenção e manejo de desordens neurológicas como a epilepsia.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott, N.J., Rönnbäck, L., Hansson, E. (2006). Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nature Reviews Neuroscience*. 7, 41-53.
- Adam-Vizi, V., Chinopoulos, C. (2006) Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends in Pharmacological Sciences*. 27, 639-645.
- Aguiar, C.C., Almeida, A.B., Araújo, P.V., de Abreu, R.N., Chaves, E.M., do Vale, O.C., Macêdo, D.S., Woods, D.J., Fonteles, M.M., Vasconcelos, S.M. (2012) Oxidative stress and epilepsy: literature review. *Oxidative Med Cell Longevity*. 2012: 795259.
- Andreasson, K. (2010) Emerging roles of PGE 2 receptors in models of neurological disease. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*. 91, 104-112.
- Andreazza, A.C., Kauer-Sant'Anna, M., Frey, B.N., Stertz, L., Zanotto, C., Ribeiro, L., Giasson, K., Valvassori, S.S., Réus, G.Z., Salvador, M., Quevedo, J., Gonçalves, C.A., Kapczinski, F. (2008) Effects of mood stabilizers on DNA damage in an animal model of mania. *Journal of Psychiatry & Neuroscience*. 33, 516-524.
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R.P., Haydon, P.G. (1999) Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neuroscience*. 22, 208-215.
- Arnaiz, L.S., Travacio, M., Llesuy, S., Arnaiz, G. (1998) Regional vulnerability to oxidative stress in a model of experimental epilepsy. *Neurochemical Research*. 23, 1477-1483.
- Ashley, N.T., Weil, Z.M., Nelson, R.J. (2012) Inflammation: Mechanisms, Costs, and Natural Variation. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 43, 385-406.
- Bascuñana, P., Javela, J., Delgado, M., Fernández de la Rosa, R., Shiha, A.A., García-García, L., Pozo, M.A. (2016) [(18)F] FDG PET Neuroimaging Predicts Pentylentetrazole (PTZ) Kindling Outcome in Rats. *Molecular Imaging and Biology*. 18, 733-740.
- Ben-Ari, Y. (2006) Seizures beget seizures: the quest for GABA as a key player. *Critical Reviews in Neurobiology*. 18, 135-144.
- Berg, M., Bruhn, T., Frandsen, A., Schousboe, A., Diemer, N.H. (1995) Kainic acid-induced seizures and brain damage in the rat: role of calcium homeostasis. *Journal of Neuroscience Research*. 40, 641-646.
- Berg, A.T., Berkovic, S.F., Brodie, M.J., Buchhalter, J., Cross, J.H., van Emde Boas, W., Engel, J., French, J., Glauser, T.A., Mathern, G.W., Moshé, S.L., Nordli, D., Plouin, P., Scheffer, I.E. (2010) Revised terminology and concepts for

- organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia*. 51, 676-685.
- Beyreuther, B.K., Freitag, J., Heers, C., Krebsfänger, N., Scharfenecker, U., Stöhr, T. (2007) Lacosamide: a review of preclinical properties. *CNS Drug Reviews*. 13, 21-42.
- Boveris, A., Cadenas, E. (1975) Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin insensitive respiration. *FEBS Letters*. 54, 311-314.
- Bhardwaj, M., and Kumar, A. (2016a) Neuroprotective mechanism of Coenzyme Q10 against PTZ induced kindling and associated cognitive dysfunction: Possible role of microglia inhibition. *Pharmacological Reports*. 68, 1301-1311
- Bhardwaj, M., and Kumar, A. (2016b) Neuroprotective Effect of Lycopene Against PTZ-induced Kindling Seizures in Mice: Possible Behavioural, Biochemical and Mitochondrial Dysfunction. *Phytotherapy Research*. 30, 306-13.
- Carmona-Aparicio, L., Pérez-Cruz, C., Zavala-Tecuapetla, C., Granados-Rojas, L., Rivera-Espinosa, L., Montesinos-Correa, H., Hernández-Damián, J., Pedraza-Chaverri, J., Sampieri, A. 3rd, Coballase-Urrutia, E., Cárdenas-Rodríguez, N. (2015) Overview of Nrf2 as Therapeutic Target in Epilepsy. *International Journal of Molecular Sciences*. 16, 18348-18367.
- Carson, M.J., Thrash, J.C., Walter, B. (2006) The cellular response in neuroinflammation: The role of leukocytes, microglia and astrocytes in neuronal death and survival. *Clinical Neuroscience Research*. 6, 237-245.
- Coelho, V.R., Vieira, C.G., de Souza, L.P., Moysés, F., Basso, C., Papke, D.K., Pires, T.R., Siqueira, I.R., Picada, J.N., Pereira, P. (2015) Antiepileptogenic, antioxidant and genotoxic evaluation of rosmarinic acid and its metabolite caffeic acid in mice. *Life Science*. 122, 65-71.
- Czech, T., Yang, J.W., Csaszar, E., Kappler, J., Baumgartner, C., Lubec, G. (2004) Reduction of hippocampal collapsin response mediated protein-2 in patients with mesial temporal lobe epilepsy. *Neurochemical Research*. 29, 2189-2196.
- Dal-Pizzol, F., Klamt, F., Vianna, M.M., Schröder, N., Quevedo, J., Benfato, M.S., Moreira, J.C., Walz, R. (2000) Lipid peroxidation in hippocampus early and late after status epilepticus induced by pilocarpine or kainic acid in Wistar rats. *Neuroscience Letters*. 291, 179-182.
- de Biase, S., Valente, M., Gigli, G. L., Merlino, G. (2017) Pharmacokinetic drug evaluation of lacosamide for the treatment of partial-onset seizures. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. 13, 997-1005.
- de Oliveira, D.L., Fischer, A., Jorge, R.S., da Silva, M.C., Leite, M., Gonçalves, C.A., Quillfeldt, J.A., Souza, D.O., e Souza, T.M., Wofchuk, S. (2008) Effects of earlylife LiCl-pilocarpine-induced status epilepticus on memory and anxiety in

- adult rats are associated with mossy fiber sprouting and elevated CSF S100B protein. *Epilepsia*. 49, 842-52.
- De Simoni, M.G., Perego, C., Ravizza, T., Moneta, D., Conti, M., Marchesi, F., De Luigi, A., Garattini, S., Vezzani, A. (2000) Inflammatory cytokines and related genes are induced in the rat hippocampus by limbic status epilepticus. *European Journal of Neuroscience*. 12, 2623-2633.
- de Vries, E.E., van den Munckhof, B., Braun, K.P., van Royen-Kerkhof, A., de Jager, W., Jansen, F.E. (2016) Inflammatory mediators in human epilepsy: A systematic review and meta-analysis. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 63,177-190.
- Dhir, A. (2012) Pentylentetrazol (PTZ) kindling model of epilepsy. *Current Protocols in Neuroscience*. 9:9.37.
- Dinarello, C.A. (2009) Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. *Annual Review of Immunology*. 27, 519-550.
- Duncan, J.S. (2011) The evolving classification of seizures and epilepsies. *Epilepsia*. 52, 1204-1209.
- Ellwardt, E., Zipp, F. (2014) Molecular mechanisms linking neuroinflammation and neurodegeneration in MS. *Experimental Neurology*. 262, 8-17.
- Eyo, U.B., Murugan, M., Wu, L.J. (2017) Microglia-Neuron Communication in Epilepsy. *Glia*. 65, 5-18.
- Fisher, R.S., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., Bogacz, A., Cross, J.H., Elger, C.E., Engel, J. Jr., Forsgren, L., French, J.A., Glynn, M., Hesdorffer, D.C., Lee, B.I., Mathern, G.W., Moshé, S.L., Perucca, E., Scheffer, I.E., Tomson, T., Watanabe, M., Wiebe, S. (2014) ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*. 55, 475-82.
- Fisher, R.S., Cross, J.H., French, J.A., Higurashi, N., Hirsch, E., Jansen, F.E., Lagae, L., Moshé, S.L., Peltola, J., Roulet Perez, E., Scheffer, I.E., Zuberi, S.M. (2017) Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*. 58, 522-530.
- França, G.V. (1998) Epilepsia – Aspectos médico-legais. *Medicina Legal*. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 351-353.
- Frantz, A.L., Regner, G.G., Pflüger, P., Coelho, V.R., da Silva, L.L., Viau, C.M., de Souza, M.S., da Silva, J.B., Picada, J.N., Saffi, J., Pereira, P. (2017) Manual acupuncture improves parameters associated with oxidative stress and inflammation in PTZ-induced kindling in mice. *Neuroscience Letters*. 661, 33-40.

- Gaillard, W.D., Chiron, C., Cross, J.H., Harvey, A.S., Kuzniecky, R., Hertz-Pannier, L., Vezina, L.G. (2009) Guidelines for imaging infants and children with recent-onset epilepsy. *Epilepsia*. 50, 2147-2153.
- Glass, C.K., Saijo, K., Winner, B., Marchetto, M.C., Gage, F.H. (2010) Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell*. 140, 918-934.
- Goddard, G.V., McIntyre, D.C., Leech, C.K. (1969) A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. *Experimental Neurology*. 25, 295-330.
- Gomez, R., Torres, I.L.S. (2017) *Farmacologia Clínica*. 1 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 349-366.
- Graham, S.H., Chen, J., Stetler, R.A., Zhu, R.L., Jin, K.L., Simon, R.P. (1996) Expression of the proto-oncogene Bcl-2 is increased in the rat brain following kainate-induced seizures. *Restorative Neurology Neuroscience*. 9, 243-250.
- Habibi, M., Hart, F., Bainbridge, J. (2016) The Impact of Psychoactive Drugs on Seizures and Antiepileptic Drugs. *Current Neurology and Neuroscience Reports*. 16, 71.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M. (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal*. 219, 1-14.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1989) *Free radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Clarendon Press. p-543.
- Hol, E.M., Pekny, M. (2015) Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Current Opinion in Cell Biology*. 32, 121-130.
- Hui Yin, Y., Ahmad, N., Makmor-Bakry, M. (2013) Pathogenesis of epilepsy: challenges in animal models. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 16, 1119-1132.
- Jensen, C.L., Massie, A., De Keyser, J. (2013) Immune players in the CNS: the astrocyte. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. 8, 824-839.
- Kaminski, R.M., Rogawski, M.A., Klitgaard, H. (2014) The Potential of Antiseizure Drugs and Agents that Act on Novel Molecular Targets as Antiepileptogenic Treatments. *Neurotherapeutics*. 11, 385-400.
- Kowaltowski, A.J., de Souza-Pinto, N.C., Castilho, R.F., Vercesi, A.E. (2009) Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine*. 4, 333-343.
- LeBel, C.P., Ischiropoulos, H., Bondy, S.C. (1992) Evaluation of the probe 20,7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chemical Research in Toxicology*. 5, 227-231.



- Löscher, W., Klitgaard, H., Twyman, R.E., Schmidt, D. (2013) New avenues for antiepileptic drug discovery and development. *Nature Reviews Drug Discovery*. 12, 757-776.
- Löscher, W. (2017) Animal Models of Seizures and Epilepsy: Past, Present, and Future Role for the Discovery of Antiseizure Drugs. *Neurochemical Research*. 42(7), 873-1888.
- Luo, Z., Fang, Y., Zhang, L. (2015) The effects of antiepileptic drug valproic acid on apoptosis of hippocampal neurons in epileptic rats. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 28, 319-324.
- Lu, Y., He, M., Zhang, Y., Xu, S., Zhang, L., He, Y., Chen, C., Liu, C., Pi, H., Yu, Z., Zhou, Z. (2014) Differential Pro-Inflammatory Responses of Astrocytes and Microglia Involve STAT3 Activation in Response to 1800 MHz Radiofrequency Fields. *PLoS One*. 9, 1-12.
- Majak, K., Pitkänen, A. (2004) Do seizures cause irreversible cognitive damage: evidence from animal studies. *Epilepsy & Behavior*. 5, 35-44.
- Mavournin, K.H., Blakey, D.H., Cimino, M.C., Salamone, M.F., Heddle, J.A. (1990) The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research*. 239, 29-80.
- McCoy, M.K., Tansey, M.G. (2008) TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease. *Journal of Neuroinflammation*. 5, 45.
- McNamara, J.O. (1984) Kindling: An animal model of complex partial epilepsy. *Annals of Neurology*. 16:S72S76
- Medzhitov, R. (2008) Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 454, 428-435.
- Megiddo, I., Colson, A., Chisholm, D., Dua, T., Nandi, A., Laxminarayan, R. (2016) Health and economic benefits of public financing of epilepsy treatment in India: An agent-based simulation model. *Epilepsia*. 57, 464-474.
- Meldrum, B. (1984) Amino acids neurotransmitters in new approaches to anticonvulsant drug action. *Epilepsia* 22, 140-149.
- Méndez-Armenta, M., Nava-Ruíz, C., Juárez-Rebollar, D., Rodríguez-Martínez, E., Gómez, P.Y. (2014) Oxidative stress associated with neuronal apoptosis in experimental models of epilepsy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2014:293689.
- Mirjany, M., Lap, H.O., Maria, G., Pasinetti. (2002) Role of cyclooxygenase-2 in neural cell activity and glutamate-mediated excitotoxicity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 301, 494-500.

- Murphy, M.P. (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*. 417, 1-13.
- Naffah-Mazzacoratti, M.G., Cavalheiro, E.A., Ferreira, E.C., Abdalla, D.S.P., Amado, D., Bellissimo, M.I. (2001) Superoxide dismutase, glutathione peroxidase activities and the hydroperoxide concentration are modified in the hippocampus of epileptic rats. *Epilepsy Research*. 46, 121-128.
- Nelson, D.L., Cox, M.M. (2011) Lehninger: Princípios de Bioquímica. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 441-460.
- Noronha, A.P.P., Vendramini, C.M.M. (2003) Parâmetros Psicométricos: Estudo Comparativo entre Teses de Inteligência e de Personalidade. *Psicologia: Reflexão e Crítica*. 16, 166-182.
- Ogiwara, I., Miyamoto, H., Morita, N., Atapour, N., Mazaki, E., Inoue, I., Takeuchi, T., Itohara, S., Yanagawa, Y., Obata, K., Furuichi, T., Hensch, T.K., Yamakawa, K. (2007) Nav1.1 localizes to axons of aralbumin-positive inhibitory interneurons: a circuit basis for epileptic seizures in mice carrying an scn1a gene mutation. *Journal of Neuroscience*. 27, 5903-5914.
- Oliveira, M.S., Furian, A.F., Royes, L.F., Figuera, M.R., Fiorenza, N., Castelli, M., Machado, P., Bohrer, D., Veiga, M., Ferreira, J., Cavalheiro, E.A., Melo, C.F. (2008) Cyclooxygenase-2/PGE 2 pathway facilitates pentylentetrazol-induced seizures. *Epilepsy Research*. 2, 14-21.
- Olmos, G., Lladó, J. (2014) Tumor necrosis factor alpha: a link between neuroinflammation and excitotoxicity. *Mediators of Inflammation*. 2014:861231
- Organização Mundial da Saúde (2018). Acesso em 10 abril de 2019. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy>
- Orloff, M.J., Williams, H.L., Pfeiffer, C.C. (1949) Timed intravenous infusion of metrazol and strychnine for testing anticonvulsant drugs. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 70, 254-257.
- Orr, A.L., Quinlan, C.L., Perevoshchikova, I.V., Brand, M.D. (2012) A refined analysis of superoxide production by mitochondrial sn-glycerol 3-phosphate dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*. 287, 42921-42935.
- Otte, W.M., van Eijsden, P., Sander, J.W., Duncan, J.S., Dijkhuizen, R.M., Braun, K.P. (2012) A meta-analysis of white matter changes in temporal lobe epilepsy as studied with diffusion tensor imaging. *Epilepsia*. 53, 659-667.
- Paes, L.C.F. (2017) Efeito anticonvulsivante e antioxidante do peptídeo sintético LS9 em modelo de convulsão induzido pelo pentilenotetrazol. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

- Perea, G., Navarrete, M., Araque, A. (2009) Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neuroscience*. 32, 421-431
- Porto, L.A., Siqueira, J.S., Seixas, L.N., Almeida, J.R.G.S., Quintans, L.J. (2007) O papel dos canais iônicos nas epilepsias e considerações sobre as drogas antiepilépticas – uma breve revisão. *Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology*. 13, 169-175.
- Rang, H.P., Dale, M.M. (2012) *Farmacologia*. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 540-543.
- Ravizza, T., Rizzi, M., Perego, C., Richichi, C., Vel, J., Mosh, S.L., De Simoni, M.G., Vezzani, A. (2005) Inflammatory Response and Glia Activation in Developing Rat Hippocampus after Status Epilepticus. *Epilepsia*. 46, 113-117.
- Reddy, D.S., Kuruba, R. (2013) Experimental models of status epilepticus and neuronal injury for evaluation of therapeutic interventions. *International Journal of Molecular Sciences*. 14, 18284-18318.
- Réus, G.Z., Fries, G.R., Stertz, L., Badawy, M., Passos, I.C., Barichello, T., Kapczinski, F., Quevedo, J. (2015) The role of inflammation and microglial activation in the pathophysiology of psychiatric disorders. *Neuroscience*. 300, 141-154.
- Rizzi, M., Perego, C., Aliprandi, M., Richichi, C., Ravizza, T., Colella, D., Velísková, J., Moshé, S.L., De Simoni, M.G., Vezzani, A. (2003) Glia activation and cytokine increase in rat hippocampus by kainic acid-induced status epilepticus during postnatal development. *Neurobiology of Disease*. 14, 494-503.
- Roberta, A., Rossella, B. (2010) Aquaporins and Glia. *Current Neuropharmacology*. 8, 84-89.
- Rojas, A., Jiang, J., Ganesh, T., Yang, M.S., Lelutiu, N., Gueorguieva, P., Dingledine, R., (2014) Cyclooxygenase-2 in epilepsy. *Epilepsia*. 55, 17-25.
- Salvadori, M.G.S., Banderó, C.R.R., Jesse, A.C., Rambo, L.M., Bueno, L.M., Bortoluzzi, V.T., Oliveira, M.S., Mello, C.F. (2012) Prostaglandin E2 potentiates methylmalonate-induced seizures. *Epilepsia*. 53, 189-198.
- Santos, L.F.L., Freitas, R.L.M., Xavier, S.M.L., Saldanha, G.B., Freitas, R.M. (2008) Neuroprotective actions of vitamin C related to decreased lipid peroxidation and increased catalase activity in adult rats after pilocarpine-induced seizures. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 89, 1-5.
- Scharfman, H.E. (2007) The neurobiology of epilepsy. *Current Neurology and Neuroscience Reports*. 7, 348-354.
- Shaftel, S.S., Griffin, W.S., O'Banion, M.K. (2008) The role of interleukin-1 in neuroinflammation and Alzheimer disease: an evolving perspective. *Journal of Neuroinflammation*. 12, 1-12.
- Simi, A., Lerouet, D., Pinteaux, E., Brough, D. (2007) Mechanisms of regulation for interleukin-1b in neurodegenerative disease. *Neuropharmacology*. 52, 1563-1569

- Simpson, I.A., Carruthers, A., Vannucci, S.J. (2007) Supply and demand in cerebral energy metabolism: the role of nutrient transporters. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 27, 1766-1791.
- Silva, A.P.S.C.L. (2014) Utilização de plantas medicinais no tratamento e/ou prevenção da epilepsia: uma prospecção tecnológica. *GEINTEC*. 4, 876-883.
- Stöhr, T., Kupferberg, H.J., Stables, J.P., Choi, D., Harris, R.H., Kohn, H., Walton, N., White, H.S. (2007) Lacosamide, a novel anti-convulsant drug, shows efficacy with a wide safety margin in rodent models for epilepsy. *Epilepsy Research*. 74, 147-54.
- Sukumari-Ramesh, S., Laird, M.D., Singh, N., Vender, J.R., Alleyne, C.H., Dhandapani, K.M. (2010) Astrocyte-derived glutathione attenuates hemin-induced apoptosis in cerebral microvascular cells. *Glia*. 58, 1858-1870.
- Turrens, J.F. (1997) Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Bioscience Reports*. 17, 3-8.
- UCB Pharma, Vimpat® (lacosamide). EMA Summary of Product Characteristics. Acesso em 10 de abril de 2019. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/vimpat-epar-product-information\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/vimpat-epar-product-information_en.pdf)
- Vezzani, A., Fujinami, R.S., White, H.S., Preux, P.M., Blümcke, I., Sander, J.W., Löscher, W. (2016) Infections, inflammation and epilepsy. *Acta Neuropathologica*. 131, 211-234.
- Wang, N., Mi, X., Gao, B., Gu, J., Wang, W., Zhang, Y., Wang, X. (2015) Minocycline inhibits brain inflammation and attenuates spontaneous recurrent seizures following pilocarpine-induced status epilepticus. *Neuroscience*. 287, 144-156.
- Welser-Alves, J. V., Milner, R. (2013) Microglia are the major source of TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  in postnatal glial cultures; regulation by cytokines, lipopolysaccharide, and vitronectin. *Neurochemistry International*. 63, 1-16.
- Yoshimura, T., Kawano, Y., Arimura, N., Kawabata, S., Kikuchi, A., Kaibuchi, K. (2005) GSK-3 $\beta$  regulates phosphorylation of CRMP-2 and neuronal polarity. *Cell*. 120, 137-149.
- Zhao, H., Zhu, C., Huang, D. (2018) Microglial activation: an important process in the onset of epilepsy. *American Journal of Translational Research*. 10, 2877-2889.
- Zhu, W., Zheng, H., Shao, X., Wang, W., Yao, Q., Li, Z. (2010) Excitotoxicity of TNF  $\alpha$  derived from KA activated microglia on hippocampal neurons in vitro and in vivo. *Journal of Neurochemistry*. 114, 386-396.
- Zsurka, G., Kunz, W.S. (2015) Mitochondrial dysfunction and seizures: the neuronal energy crisis. *Lancet Neurology*. 4, 956-66.

## ANEXOS



**UFRGS**  
UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA**

Comissão De Ética No Uso De Animais



### **CARTA DE APROVAÇÃO**

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

**Número:** 34134

**Título:** AVALIACAO DO EFEITO NEUROPROTETOR DE LACOSAMIDA SOBRE PARAMETROS COMPORTAMENTAIS, BIOQUIMICOS E MITOCONDRIAIS

**Vigência:** 01/01/2018 à 31/12/2019

**Pesquisadores:**

**Equipe UFRGS:**

PATRÍCIA PEREIRA - coordenador desde 01/01/2018

***A Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 19/03/2018 - Sala 330 do Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro - Porto Alegre - RS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 154 camundongos machos CF-1, de 60 dias, fornecidos pelo Centro de Reprodução e Pesquisa (CREAL) da UFRGS e mantidos no biotério setorial do Departamento de Farmacologia da UFRGS (camundongário), de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.***

Porto Alegre, Quinta-Feira, 29 de Março de 2018

MARCELO MELLER ALIEVI  
Coordenador da comissão de ética