

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

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

LISTA DE TABELAS

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

LISTA DE FÓRMULAS E ABREVIATURAS

ACOs	Anticoncepcionais orais
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMPA	Alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AP-1	Fator ativador de proteína-1
ATP	Adenosina trifosfato
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
Ca²⁺	Íon cálcio
CAT	Catalase
COX-1	Ciclo-oxigenase-1
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
CYP450	Citocromo P450
ELT	Epilepsia do lobo temporal
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GPx	Glutathiona peroxidase
HO₂·	Radical hidroperoxil
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
IL-1β	Interleucina-1β
IL-6	Interleucina-6
ILEA	Liga Internacional contra a Epilepsia
K⁺	Íon potássio
LMC	Lacosamida
MAP quinase	Proteína-quinase ativada por mitógeno
Na⁺	Íon sódio

Na⁺/K⁺ ATPase	Bomba de sódio/potássio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NF-κB	Fator nuclear-κB
NMDA	N-metil D-aspartato
NT-3	Neurotrofina 3
O₂	Oxigênio molecular
O₂^{·-}	Radical superóxido
OH[·]	Radical hidroxila
¹O₂	Oxigênio singlete
PTZ	Pentilenotetrazol
P2MRC	Proteína 2 mediadora de resposta a colapsina
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TNFR1	Receptor TNF tipo 1
UQ	Coenzima Q
UQH₂	Coenzima Q reduzida

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	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 β	19
1.3.2	TNF- α	19
1.3.3	COX	20
1.4	LACOSAMIDA	20
1.5	MODELO DE KINDLING.....	24
2	OBJETIVOS	25
2.1	OBJETIVO GERAL	25
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3	ARTIGO CIENTÍFICO	26
4	DISCUSSÃO	56
5	CONCLUSÃO	59
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
	ANEXOS	68

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).

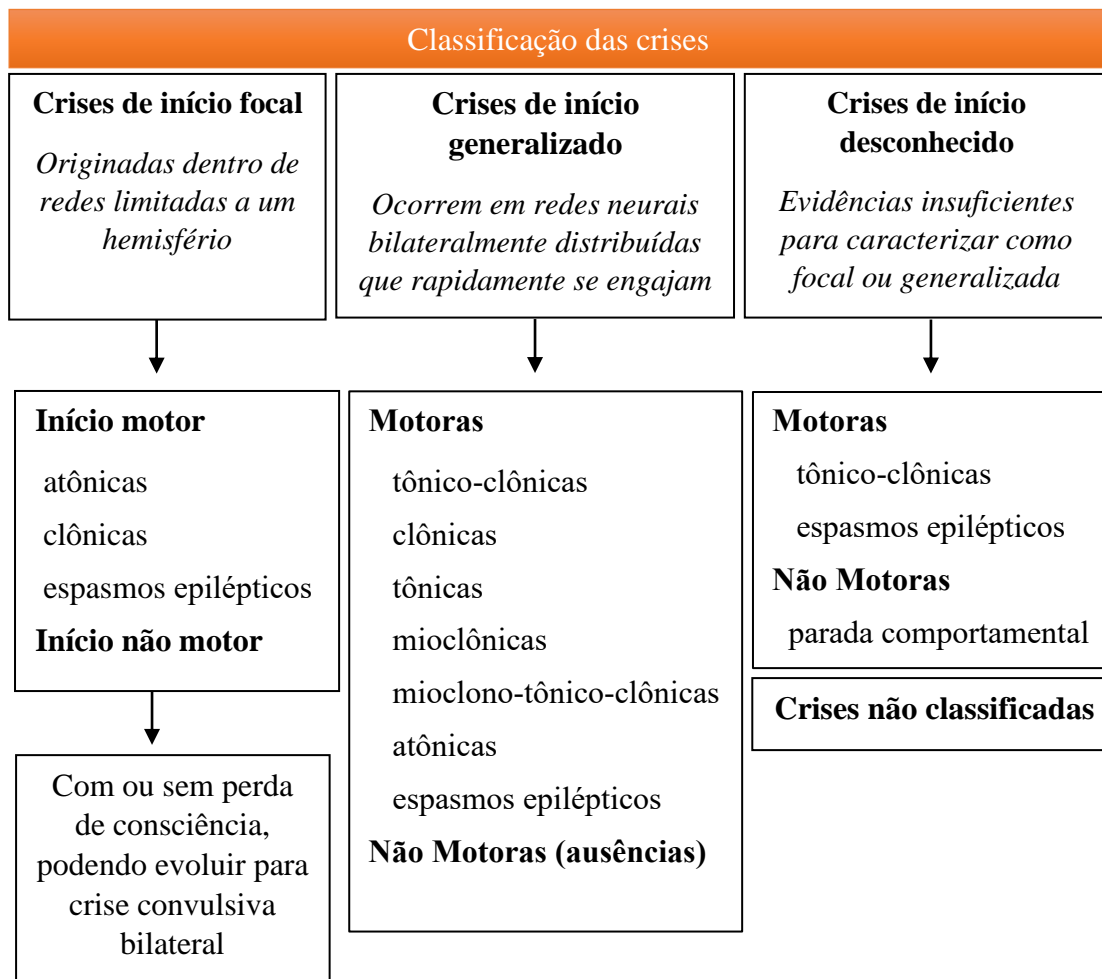


Figura 1 Classificação expandida dos tipos de crise epilética

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 Na^+/K^+ ATPase, com o objetivo de manter o potencial de repouso, libera íon sódio (Na^+) para o meio extracelular e íon potássio (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 Na^+ , ocasionando a sua entrada para o ambiente intracelular. Em seguida, com a saída de K^+ pela abertura de seus canais e através do transporte ativo de Na^+ para o meio extracelular através da Na^+/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⁺ 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⁺ 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 (Ca²⁺) 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_A (canais iônicos dependentes de ligantes), que medeiam rápidos potenciais pós-sinápticos inibitórios por aumentar o influxo de cloreto e receptores GABA_B (receptores acoplados à proteína G) que medeiam lentos potenciais pós-sinápticos inibitórios por aumentar a condutância de potássio e diminuir a entrada de Ca²⁺ (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).

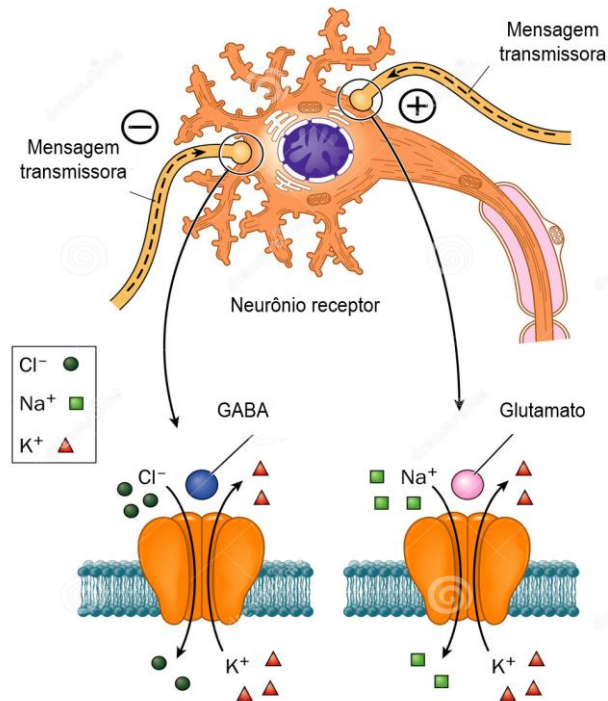


Figura 2 Efeitos do GABA e do glutamato na transmissão do impulso nervoso dos neurônios transmissores aos neurônios receptores

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 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) 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.

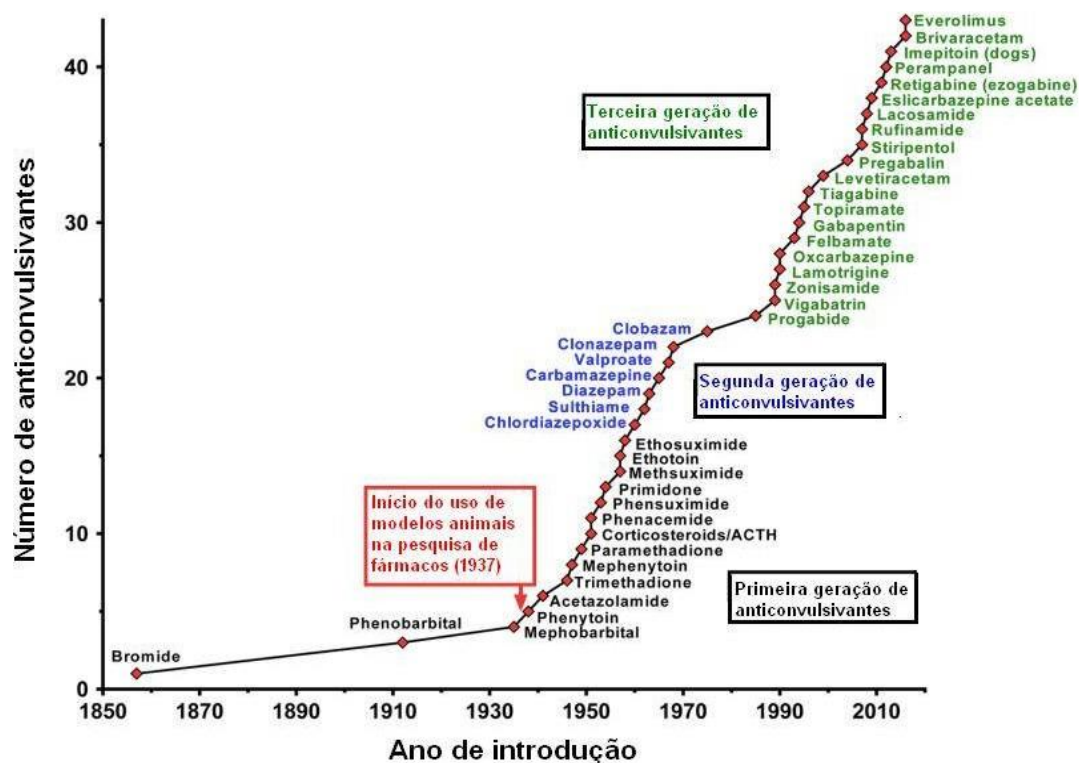


Figura 3 Número de anticonvulsivantes e ano de introdução

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

	Indicações	Mecanismo de ação	Efeitos adversos
Fármacos de 1ª geração			
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 ⁺ 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 ²⁺ tipo T	Náusea, vômito, sedação, perda de peso
Fármacos de 2ª geração			
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 ⁺ 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 ⁺ 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+} voltagem 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 ₃ 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 antilutamatérgicas	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 ⁺ e redução das correntes de Ca ²⁺ 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 ²⁺ , 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 ⁺ 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 ⁺ dependentes de voltagem	Sonolência, tontura, fadiga, cefaleia
Vigabatrina (2009)	Adjuvante para crises focais refratárias em adultos e espasmos infantis	Inibição irreversível da GABA-transaminase	Constrição 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 ⁺ 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 ⁺ 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)(UQH₂) para o citocromo *c* e deste os elétrons chegam ao seu destino final, o oxigênio molecular (O₂) na citocromo *c* oxidase (complexo IV) (Nelson & Cox, 2011).

No complexo IV ocorre a redução completa uma molécula de O₂ 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 O₂ 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 UQH₂ e desta para o complexo III pode fazer com que o radical Q passe um elétron diretamente ao O₂. Uma série de intermediários tóxicos e reativos pode ser formada (Boveris & Cadenas, 1975), incluindo o radical superóxido (O₂^{·-}), radical peroxil (ROO[·]), radical hidropoxil (HO₂[·]), radical hidroxila (OH[·]), e espécies de radicais sem elétrons livres tais como, peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o oxigênio singlete (¹O₂), 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).

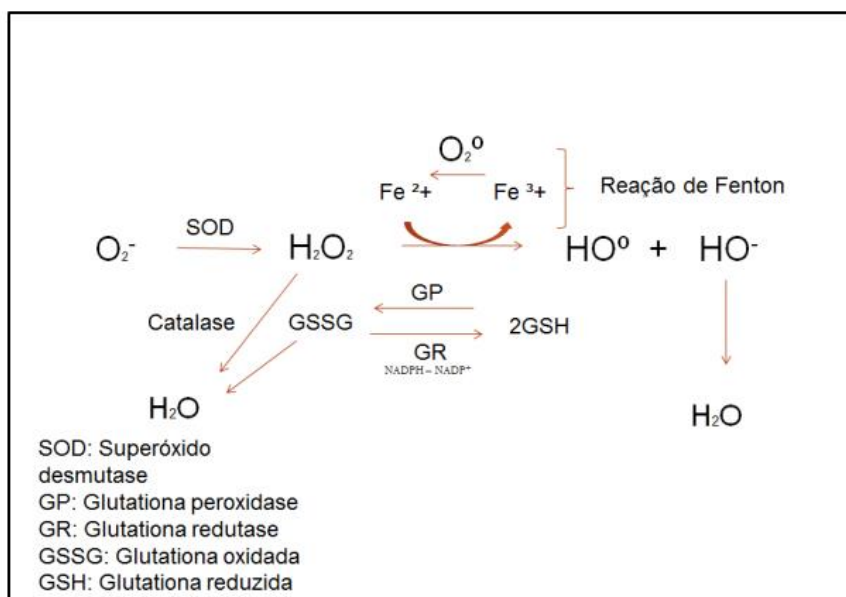


Figura 4 Principais mecanismos de inativação de radicais livres

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 glutaciona reduzida (GSH), catalisada pela enzima glutaciona peroxidase (GPx), capta o HO^{\cdot} ou H_2O_2 , levando a formação de glutaciona 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 β , IL-6 e TNF- α e de fatores transcricionais como ativador de proteína-1 (AP1) e fator nuclear- κ B (NF- κ 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- α e IL-1 β 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 β , TNF α 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 β

A interleucina-1 β 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 A₂, ciclo-oxigenase-2 (COX-2), óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e prostaglandina E₂ (Dinarello, 2009). No SNC a principal origem da IL-1 β 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- α

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- α 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- α 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- α também é capaz de causar desequilíbrio na neurotransmissão excitatória e inibitória ao alterar receptores glutamatérgicos e GABAérgicos. Assim, o aumento de TNF- α 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).

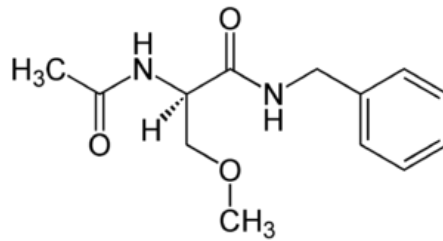


Figura 5 Estrutura química da lacosamida
(R-2-acetamido-N-benzil-3-metoxipropionamida)

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.

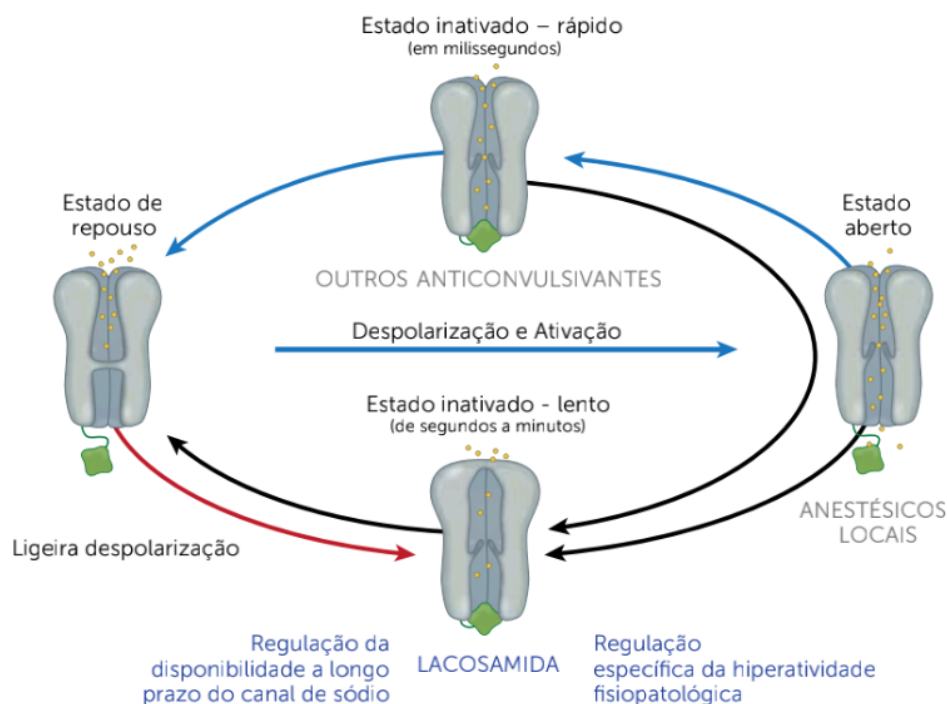


Figura 6 Ativação e inativação dependente da voltagem dos canais de sódio

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

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

Medicamento	Sonolência	Náusea	Tontura	Ataxia	Fadiga	Cefaleia
Lacosamida	4%	4%	7%	0%	1%	6%
Lamotrigina	0%	15%	26%	15%	9%	23%
Topiramato	12%	0%	7%	0%	6%	4%
Gabapentina	14%	0%	8%	0%	6%	8%
Vigabatrina	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_A 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

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

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

Letícia Lazzarotto^a, Pricila Pflüger^a, Gabriela Gregory Regner^a, Fernanda Marcélia Santos^a, Débora Gonçalves Aguirre^a, Verônica Bidinotto Brito^b, Dinara Jaqueline Moura^b, Nayane Mendes dos Santos^c, Jaqueline Nascimento Picada^c, Belisa Parmeggiani^d, Guilhian Leipnitz^d, Patrícia Pereira^{a*}

^aLaboratory of Neuropharmacology and Preclinical Toxicology, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

^b Laboratory of Genetic Toxicology, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

^cLaboratory of Genetic Toxicology, Lutheran University of Brazil, Canoas, RS, Brazil.

^d Postgraduate Program in Biological Sciences: Biochemistry, Department of Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

*Corresponding author at: Laboratory of Neuropharmacology and Preclinical Toxicology, Department of Pharmacology, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Sarmiento Leite 500/305, Porto Alegre, RS, CEP 90050-170, Brazil. Tel/Fax.: +55 51 33083121.

Email address: patriciapereira@ufrgs.br

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Abstract

Background Epilepsy is the most common neurological disorder, affecting 50 million people worldwide. Evidences suggest an intrinsic relationship between epilepsy, neuroinflammation, oxidative stress, excitotoxicity and neuronal death. The aim of this study was to evaluate the effect of lacosamide (LCM) on seizures induced by pentylenetetrazol (PTZ) investigating biochemical and mitochondrial alterations related to their mechanism.

Methods Male CF-1 mice were treated on alternative days for a period of 11 days with LCM (20, 30 or 40 mg/kg; gavage) or saline or diazepam (2 mg/kg; i.p.), before PTZ administration (50 mg/kg; s.c.). Behavioral seizure was evaluated during 30 min each day. After the last evaluation, at 11th day, animals were euthanized and the hippocampi were collected to evaluate free radicals, the activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and of the mitochondrial complexes I-III, II and II-III, as well as Bcl-2 and COX-2 expressions. Hippocampi, blood and bone marrow were collected for genotoxic and mutagenic evaluations.

Results LCM 40 mg/kg increased latency and decreased percentage of seizures, only on the 3rd day of observation. The dose of 30 mg/kg only showed effect on the percentage of seizures. LCM in all doses tested decreased free radicals and SOD activity and the doses of 20 and 30 mg/kg were able to decrease CAT activity. LCM 30 and 40 mg/kg improved the enzymatic mitochondrial activity of the complex I-III and LCM 30 mg/kg improved the activity of the complex II. In the comet assay, the damage induced by PTZ administration was reduced by LCM 20 and 30 mg/kg. Also, the dose of 20 mg/kg increased COX-2 expression compared to saline group.

Conclusions Our results suggest that, although LCM did not produce antiepileptogenic effect *in vivo*, it showed neuroprotective effect against oxidative stress, bioenergetic dysfunction and DNA damage induced by the repeated PTZ administration.

Keywords: Lacosamide, Kindling, Pentylenetetrazol, Oxidative stress, Comet assay, Neuroinflammation

Highlights:

- LCM did not produce antiepileptogenic effect *in vivo* using PTZ-kindling model.
- LCM showed neuroprotective effect against oxidative stress and DNA damage produced by PTZ in the hippocampus, effect that appears to be dose related.
- The ability of the higher doses of LCM to improve the activity of the mitochondrial enzyme complex I-III in comparison to saline group is probably due to its antioxidant effect.

Abbreviations

ANOVA: analysis of variance

Bcl-2: B-cell lymphoma 2

BSA: bovine serum albumin

CAT: catalase

COX-2: cyclooxygenase-2

DNA: deoxyribonucleic acid

DZP: diazepam

GABA: gamma-aminobutyric acid

i.p.: intraperitoneal

LCM: lacosamide

NCE: normochromatic erythrocyte

PCE: polychromatic erythrocyte

PGE₂: prostaglandin E₂

PTZ: pentylenetetrazol

ROS: reactive oxygen species

Sal: saline

s.c.: subcutaneous

SD: standard deviation

SEM: standard error of the mean

SOD: superoxide dismutase

1 Introduction

Epilepsy is a chronic neurological disorder that affects 50 million people worldwide, approximately 80% of those living in low-income countries (WHO, 2018). It is characterized by spontaneous and recurrent seizures resulting from the imbalance in excitatory and inhibitory neuronal activities, causing behavioral and cognitive symptoms (Duncan, 2011). Despite the large number of drugs available, the treatment of this pathology is still considered unsatisfactory, given the severe adverse effects caused by antiepileptic drugs and the fact that one third of patients do not respond to pharmacological treatments (WHO, 2018).

Several hypotheses have attempted to explain the pathogenesis of epilepsy, including oxidative stress and neuroinflammation. In physiological conditions, defense mechanisms act to maintain the balance between production and elimination of ROS. However, when there is an imbalance in this system, oxidative stress is induced, which negatively affects cellular components such as lipids, proteins and DNA (Aguilar et al., 2012). Oxidative stress plays an important role in mitochondrial dysfunction and brain damage induced by inflammation during epileptic seizures (Bhardwaj and Kumar, 2016a), also contributing to glutamate-induced excitotoxicity (Réus, 2015).

In the central nervous system, glial cells are responsible for a large spectrum of functions such as regulation and synaptic transmission, survival and cell death. In the face of harmful stimuli, microglial cells acquire phagocytic and pro-inflammatory capacity, secreting cytokines such as interleukin-1 β (IL-1 β) and alpha tumor necrosis factor (TNF- α) (Carson et al., 2006; Lu et al., 2014). COX-2 is an important mediator of neuroinflammation, increasing rapidly after seizures (Rojas et al., 2014). COX-2 is responsible for the conversion of arachidonic acid to prostaglandins, mainly PGE₂, which may facilitate the release of glutamate from the terminal nerve (Mirjany et al., 2002). An increase in specific inflammatory mediators contributes to the development of epileptogenesis due to changes in neuronal excitability that may lead to recurrent spontaneous seizures (Wang et al., 2015). Therefore, compounds with anti-inflammatory and antioxidant properties may represent a promising strategy in the treatment of epilepsy.

Lacosamide is a third-generation antiepileptic drug, approved as adjunctive therapy in the treatment of focal onset seizures with or without secondary generalization in adults. Structurally, it is analogous to the amino acid D-serine and its mechanism of

action, not yet clearly understood, is focused on increasing the slow inactivation of voltage-dependent sodium channels, a mechanism facilitated by collapsin response mediator protein-2 (CRMP2) (Beyreuther et al., 2007). It has a favorable pharmacokinetic profile such as rapid oral absorption and bioavailability around 100%, besides a low potential of drug interactions (UCB Pharma, VIMPAT®). These properties make this compound an interesting target in the study of the mechanisms involved in epileptogenesis.

The aim of this study was to evaluate the antiepileptogenic activity of LCM using the chemical kindling induced by PTZ in mice. We investigated the effects of LCM on the oxidative stress induction by means of overproduction of free radicals and its effects on the activity of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), and mitochondrial respiratory chain enzymes (complexes I-III, II and II-III). Moreover, the effects of LCM on DNA damage in hippocampus and peripheral blood, and a possible mutagenic activity, using micronucleus in bone marrow, and expression of proteins COX-2 and Bcl-2 were also investigated.

2 Materials and methods

2.1. Animals

Male CF1 mice (30-50 g) were obtained from Center for Reproduction and Experimentation of Laboratory Animals of Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS). The animals were divided into six groups (**Table 1**): 5 groups were used in the kindling experiment and one group saline was used as a negative control in other measurements, totaling 142 animals. Mice were housed in plastic cages (4 per cage), with free access to water and food, under a light/dark cycle of 12 hours, and at a constant temperature of 23 ± 2 °C. All experimental procedures were carried out in accordance to the national and international legislation (Guidelines of Brazilian Council of Animal Experimentation - CONCEA), with the approval of the Committee on the Ethical Use of Animals of UFRGS (authorization number 34134).

Table 1 Treatment groups

Treatment groups	Treatment
Saline	Treated with saline
Saline + PTZ	PTZ was administered on alternate days for a period of 11 days
Diazepam + PTZ	Diazepam was administered intraperitoneally on alternate days for a period of 11 days and 30 min before PTZ treatment
LCM 20 mg/kg + PTZ	LCM was administered by gavage on alternate days for a period of 11 days and one hour before PTZ treatment
LCM 30 mg/kg + PTZ	LCM was administered by gavage on alternate days for a period of 11 days and one hour before PTZ treatment
LCM 40 mg/kg + PTZ	LCM was administered by gavage on alternate days for a period of 11 days and one hour before PTZ treatment

2.2. Drugs and pharmacological procedures

LCM (Vimpat®) was purchased from UCB Pharma. PTZ was acquired from Sigma-Aldrich and DZP (Compaz®) was purchased from Cristália. All drugs were dissolved in saline (NaCl 0.9%) solution. The doses of LCM and DZP were chosen based on previous studies (Stöhr et al., 2007; Higgins et al., 2009; Nirwan et al., 2018; Coelho et al., 2016). The PTZ dose used was 50 mg/kg s.c., obtained through a pilot test. The injection volume used was 0.1 ml/10 g of weight of animal. Primary antibody anti-COX-2 was obtained from Sigma-Aldrich, anti-Bcl-2 and anti- β -actin from Cell Signaling and secondary antibodies from EMD Millipore (Merck).

2.3. PTZ-kindling model and design of the experiment

The kindling model induced by PTZ was performed as described by de Oliveira et al. (2008) with minor modifications. Each treatment consisted of one administration in alternative days for a period of 11 days, totaling six treatments (**Fig. 1**). Animals were given intraperitoneal injections of saline and DZP (2 mg/kg), 30 min before the subconvulsive stimuli (PTZ 50 mg/kg, s.c.). LCM (20, 30 and 40 mg/kg) was administered by gavage one hour before subconvulsive stimuli. Immediately after PTZ injection, mice were placed individually in acrylic observation chambers for 30 min and behavioral seizure was observed by the adapted Racine scale (da Silva et al., 1998):

0 = no convulsive behavior; 1 = jerks of short duration; 2 = clonic forelimb seizures lasting less than 3 s; 3 = clonic forelimb seizures lasting more than 3 s; 4 = tonic-clonic seizure; 5 = death.

The occurrence of clonic forelimb seizures lasting more than 3 s and the latency to the first seizure was also observed at each PTZ administration day. After the last treatment, animals were euthanized by beheading and samples of hippocampus, bone marrow and peripheral blood were collected for analysis.

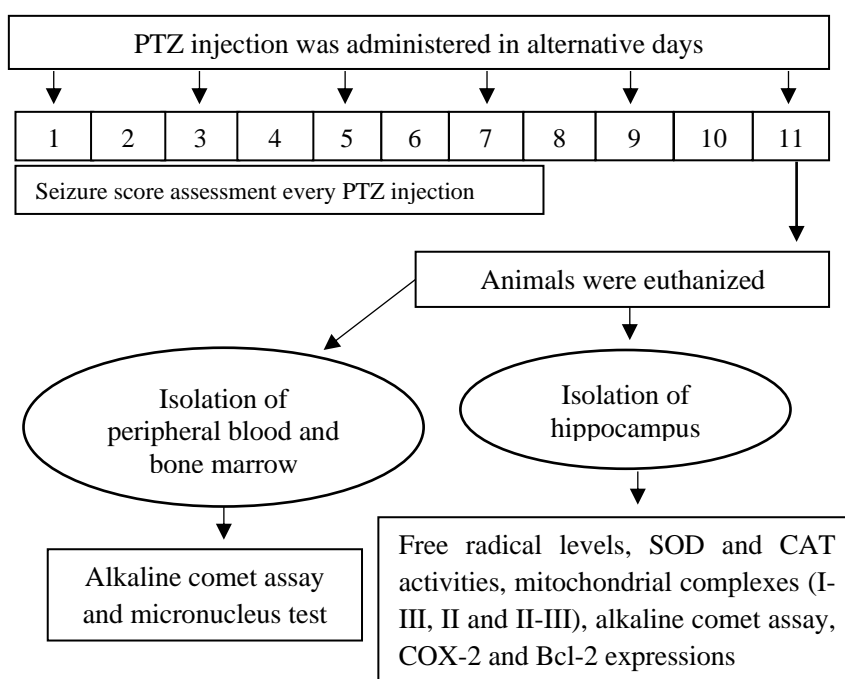


Fig. 1 Experimental protocol of PTZ-induced kindling model

2.4. Measurement of oxidative stress parameters

For oxidative stress parameters evaluation, frozen hippocampus samples were homogenized on ice in PBS (pH 7.4) in a ratio of 1:10 (w/v). The samples were centrifuged and the supernatant collected. The protein concentration was determined by the method described by Lowry et al. (1951) using BSA (1 mg/ml) as standard.

2.4.1. H₂DCF-DA oxidation

The generation ROS was estimated by the method described by LeBel et al. (1992). Hippocampus homogenates (30 μ l) were mixed in 96-well dark-plate with 170 μ L PBS (pH 7.4) and 2,7dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCF-DA) and

incubated for 30 min at 37 °C. After the end of this period, the fluorescence of the product formed dichlorofluorescein (DCF) was measured on a SpectraMax M2^e Microplate Reader (Molecular Devices, MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, California), using excitation and emission at 480 and 535 nm, respectively. A calibration curve was performed with standard DCF (7 μM) and ROS levels expressed as nmol DCF/mg protein.

2.4.2. SOD activity estimation

SOD activity was calculated using the method described by Misra and Fridovich (1972), which estimates the dismutation of the superoxide radical by inhibiting the adrenaline oxidation at 480 nm. Briefly, 30 μl of hippocampus homogenate were added to 150 μl of 50 mM glycine buffer (pH 10.2) and 10 μl of 10 mM catalase. After, 10 μl of 60 mM epinephrine was added and absorbance was immediately estimated. The activity was evaluated in kinetic mode on the microplate reader SpectraMax® M2^e (Molecular Devices, MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, California). The inhibition of adrenaline oxidation occurs in the presence of SOD in the sample, and activity was indirectly evaluated spectrophotometrically. One SOD unit (U) is defined as the amount of SOD necessary to inhibit 50% of adrenaline oxidation and activity expressed as U SOD/mg protein.

2.4.3. CAT activity estimation

CAT activity was determined using the method described by Aebi (1984), based on the decrease of the absorbance in 240 nm in the presence of hydrogen peroxide (H₂O₂) in the reaction medium. Briefly, 40 μl of hippocampus homogenate was added to a reaction medium containing 150 μl of 50 mM potassium sodium phosphate buffer (pH 7.2). Subsequently, 10 μl of 5 mM H₂O₂ were added and estimated absorbance decreased. The activity was evaluated in kinetic mode on the SpectraMax® M2^e microplate reader (Molecular Devices, MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, California). One unit (U) of CAT is defined as 1 μmol of H₂O₂ consumed per minute, with activity expressed as U CAT/mg protein.

2.5. Mitochondrial complex enzyme estimation

Regarding the determination of the activities of respiratory chain complexes I-III, II and II-III, the hippocampi were homogenized and prepared as described by Grings et al. (2017). The activity of NADH: cytochrome *c* oxidoreductase (complex I-III) was assayed by following the reduction of cytochrome *c* (50 μM) at 25 °C at 550 nm, according to the method described by Schapira et al. (1990). The activities of succinate-2,6-dichloroindophenol (DCIP)-oxidoreductase (complex II) and succinate/cytochrome *c* oxidoreductase (complex II-III) were measured according to Fischer et al. (1985), with some modifications, based on the reduction of DCIP (8.3 μM) at 600 nm and of cytochrome *c* (50 μM) at 550 nm, respectively. These methods were slightly modified, as described in details in a previous report by da Silva et al. (2002). The results were expressed as $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg protein}^{-1}$.

2.6. Alkaline comet assay

The comet assay was carried out as described by Tice et al. (2000) with minor modifications (da Costa e Silva et al., 2018). Immediately after the behavior test, the animals were euthanized and blood and hippocampi were collected. Blood samples (50 μl) were transferred to heparin solution (Liquemine® 25.000 UI, 10 μl) and samples of hippocampi were transferred to PBS buffer. Cell suspensions (10 μl) were embedded in 90 μl low melting point agarose 0.75% (GibcoBRL) and spread onto agarose-precoated microscope slides. After solidification, slides were placed in lysis buffer (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, and 10 mM Tris, freshly added 1% Triton X-100 (Sigma) and 10% DMSO, pH 10) for 48 h at 4 °C. The slides were subsequently incubated in freshly prepared alkaline buffer (300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH > 13) for 20 min at 4 °C in an electrophoresis cube. An electric current of 300 mA at 25 V (0.90 V/cm) was applied for 15 min to induce DNA electrophoresis. The slides were then neutralized (0.4 M Tris, pH 7.5), stained with silver, and analyzed under a microscope.

Images of 100 randomly selected nucleoids (50 nucleoids from each slide) from each animal were analyzed. Nucleoids were also visually scored according to tail size into five classes, ranging from undamaged (0) to maximally damaged (4), resulting in a single DNA damage score for each animal, and consequently, for each group studied. Therefore, the damage index (DI) ranged from 0 (completely undamaged, 100 cells \times 0) to 400 (with

maximum damage, 100×4). Damage frequency (DF) was calculated based on the number of nucleoids with tail versus those with no tail.

2.7. Micronucleus test in bone marrow

The micronucleus test was performed according to the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program guidelines (Mavournin et al., 1990). Bone marrow from both mouse femurs was suspended in fetal calf serum and smears were prepared on clean glass slides. Slides were air-dried, fixed in methanol, stained in 10% Giemsa and coded for a blind analysis. To avoid false-negative results and to obtain a value of bone marrow toxicity, the PCE/NCE ratio was determined in 1000 cells. The incidence of micronuclei was observed in 2000 PCE for each animal using bright-field optical microscopy at 1000 x magnification.

2.8. Western Blot analysis

For Western blot analysis, frozen hippocampi samples were homogenized in lysis buffer (150 mM NaCl, 20 mM Tris, 5 mM EDTA, 10% glycerol, 10% NP 40, pH 7.4) and centrifuged at 7000 g for 15 min at 4 °C. The supernatant was collected and the protein concentration was determined by the method described by Bradford et al. (1976) using BSA (1 mg/ml) as standard. A sample of 30 µg of total proteins was separated by electrophoresis on 12% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel (SDS-PAGE). After electrophoresis, the proteins were transferred to a nitrocellulose membrane. Membranes were blocked with 1% BSA for 1 hour at room temperature and then washed with tris buffered saline (TBS) containing 0.05% tween-20. The membranes were then probed with the primary antibodies overnight at 4 °C. The dilution of antibodies used for immunoblotting was: anti-Bcl-2 (1:1000), anti-COX-2 (1:1000) and anti-β-actin (1:15,000). After incubation, the membranes were washed three times in TBS buffer. Membranes were then incubated with peroxidase-bound anti-rabbit secondary antibody (1:10,000) at room temperature for 2 hours. Protein bands were then visualized using an enhanced chemiluminescent (ECL) reagent then analyzed using Image J 1.41 software.

2.9. Statistical analysis

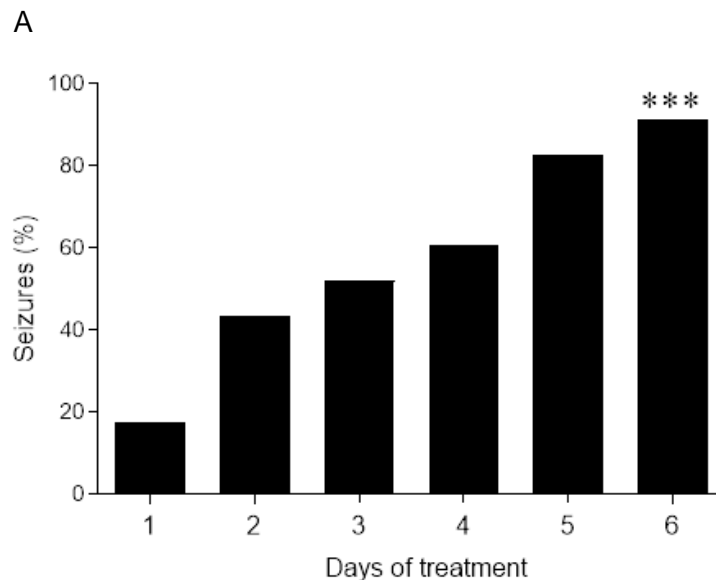
Statistical evaluation of data from percentage of convulsion in PTZ kindling was carried out using Fisher's Exact Test. Latency to first clonic forelimb lasting more than 3 s was analyzed using the Generalized Estimating Equation (GEE) followed by the

Bonferroni test. The results of oxidative stress parameters, alkaline comet assay, micronucleus test and expressions of Bcl-2 and COX-2 were analyzed by one-way ANOVA followed by the Tukey test. To analyze the enzymatic activity of the mitochondrial respiratory chain the one-way ANOVA was used, followed by Duncan test. In all comparisons, $p \leq 0.05$ indicates statistical significance.

3 Results

3.1. Effect of lacosamide in PTZ-kindling model in mice

This work aimed to evaluate the effect of LCM on seizures induced by PTZ. In the saline + PTZ group only 17.4% of the animals presented clonic forelimb seizures lasting more than 3 s on the first day of treatment (**Fig. 2A**). Nevertheless, after the last treatment, 91.3% of animals in this group showed seizure behavior ($p < 0.001$). Moreover, on the first day of treatment, saline + PTZ group took around 26.22 min to present clonic forelimb seizures of at least 3 s, while on the last day of treatment this time decreased to 12.72 min ($p < 0.001$) (**Fig. 2B**). These results confirm that the subconvulsive PTZ dose used here (50 mg/kg, s.c.) was able to induce a “kindling state” in mice after six treatments (**Fig. 2 A and B**).



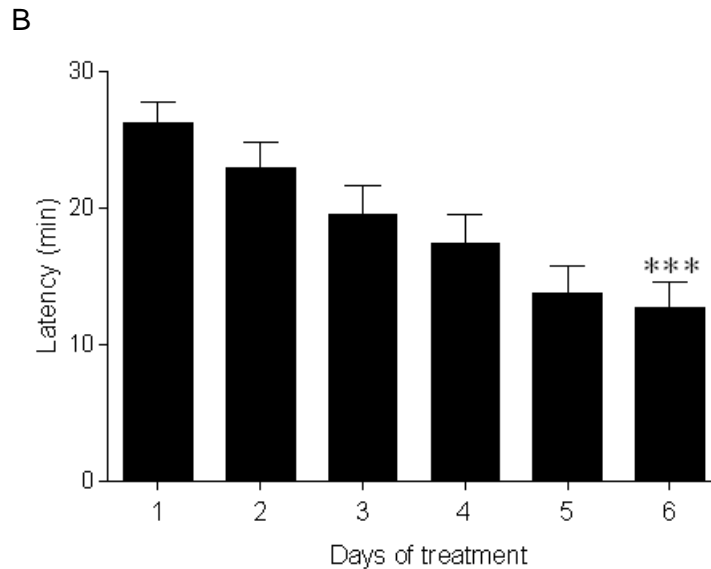


Fig. 2 Effect of PTZ administration (50 mg/kg; s.c.) in mice submitted to kindling protocol. (A) Percentage of mice presenting seizures lasting more than 3 s. Fisher's Exact Test. (B) Latency to the occurrence of the 1st seizure lasting more than 3 s. GEE followed by the Bonferroni test. Values are mean \pm SEM. $n = 23$ animals; *** $p < 0.001$, compared to the 1st day of treatment.

Table 2 shows the effect of LCM on seizures induced by PTZ administration. LCM 30 mg/kg decreased the percentage of clonic seizures only on the 2nd day of observation ($p < 0.05$). LCM 40 mg/kg decreased on the 2nd and 3rd days of observation ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively). The other dose of LCM tested (20 mg/kg) did not produce significant results, compared with the saline + PTZ group. The development of PTZ-kindling was fully prevented by pre-treatment with DZP ($p < 0.001$).

The effect of LCM on latency to the first seizure is shown in **Table 3**. It is possible to observe that LCM 40 mg/kg increased the latency for the first clonic seizure only on the 3rd day of treatment ($p < 0.05$). The effects caused by the other doses of LCM were not statistically different from the effects observed in the saline + PTZ group. The animals treated with DZP did not present seizures at the maximum test time (30 min) on the 2nd to 6th days of treatment ($p < 0.05$ and $p < 0.001$, respectively).

Table 2 Effect of LCM on the percentage of clonic forelimb seizures lasting more than 3 s in mice submitted to PTZ-kindling model.

Groups	Percentage of seizures (%)					
	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6
Saline + PTZ	17.39	43.47	52.17	60.87	82.60	91.30
LCM 20 mg/kg + PTZ	8.33	41.66	33.33	75.00	70.83	75.00
LCM 30 mg/kg + PTZ	8.33	12.50*	41.66	75.00	75.00	87.50
LCM 40 mg/kg + PTZ	4.34	8.69*	13.04**	56.52	86.95	73.91
Diazepam + PTZ	0.00*	0.00***	0.00***	0.00***	0.00***	0.00***

DZP was used as positive control. $n = 23-24$ animals per group; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$, in comparison to saline + PTZ group. Fisher's Exact Test.

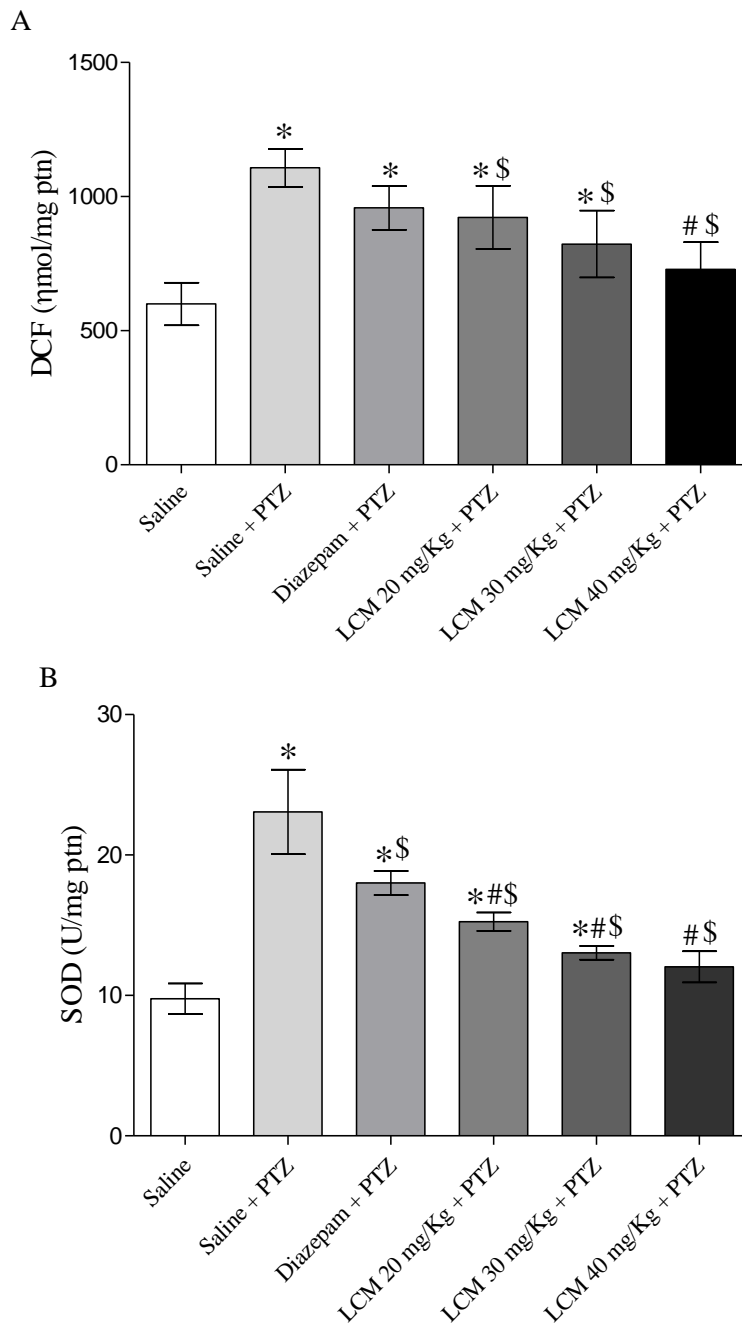
Table 3 Effect of LCM on latency for the 1st clonic forelimb seizure lasting more than 3 s in mice submitted to PTZ-kindling model.

Groups	Latency to first seizure (min.)					
	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6
Saline + PTZ	26.22 ± 1.51	22.94 ± 1.86	19.47 ± 2.20	17.43 ± 2.10	13.80 ± 1.96	12.72 ± 1.85
LCM 20 mg/kg + PTZ	28.80 ± 0.92	24.16 ± 1.52	24.14 ± 1.89	15.39 ± 1.85	14.73 ± 2.06	13.12 ± 2.05
LCM 30 mg/kg + PTZ	28.10 ± 1.08	27.83 ± 1.20	21.76 ± 1.96	15.26 ± 1.87	14.69 ± 1.94	12.13 ± 1.70
LCM 40 mg/kg + PTZ	30.00 ± 0.00	28.30 ± 1.16	27.28 ± 1.46*	19.01 ± 2.19	13.07 ± 1.80	14.81 ± 2.10
Diazepam + PTZ	30.00 ± 0.00	30.00 ± 0.00*	30.00 ± 0.00***	30.00 ± 0.00***	30.00 ± 0.00***	30.00 ± 0.00***

Values are mean ± SEM. $n = 23-24$ animals per group; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ in comparison to saline + PTZ group. GEE followed by the Bonferroni test.

3.2. Effect of lacosamide on oxidative stress parameters in PTZ-kindling mice

Regarding oxidative stress parameters, mice that received the saline + PTZ treatment showed increased levels of free radicals measured by DCF and increased SOD and CAT activities, compared to the saline group ($p \leq 0.05$, **Fig. 4A, B and C**). LCM 20, 30 and 40 mg/kg were able to decrease free radicals ($p \leq 0.05$, **Fig. 4A**) but the same doses were able to decrease the activity of the antioxidant enzyme SOD, compared to the control group saline + PTZ (**Fig. 4B**). LCM 20 and 30 mg/kg also decrease the activity of the antioxidant enzyme CAT compared to saline + PTZ group (**Fig. 4C**).



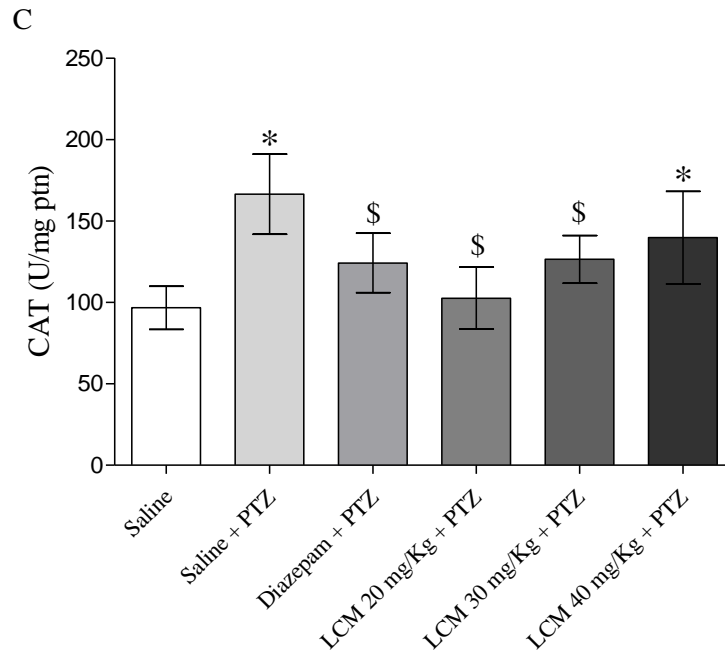


Fig. 3 Effect of treatment with LCM on oxidative stress parameters promoted by PTZ-kindling in hippocampi. (A) level of free radicals evaluated by DCF formed, (B) activity of the antioxidant enzyme superoxide dismutase (SOD) and (C) activity of the antioxidant enzyme catalase (CAT). Values are mean \pm SEM. $n = 6$ per group; * $p \leq 0.05$ in comparison to saline group, # $p \leq 0.05$ in comparison to diazepam + PTZ group, and \$ $p \leq 0.05$ in comparison to saline + PTZ group. ANOVA followed by the Tukey test.

3.3. Effect of lacosamide on mitochondrial enzyme complex activities in PTZ-kindling mice

The chronic subconvulsive dose of PTZ did not significantly decrease the activity of mitochondrial enzyme complexes I-III, II and II-III compared to the saline group. After 11 days of treatment, LCM 30 and 40 mg/kg improved mitochondrial enzyme complex I-III activity ($p \leq 0.05$, **Fig. 5A**) compared to saline and saline + PTZ groups. LCM 30 mg/kg improved mitochondrial enzyme complex II activity ($p \leq 0.05$, **Fig. 5B**), compared to the control group saline + PTZ. However, the LCM doses had no effect on the activity of the mitochondrial complex II-III (**Fig. 5C**).

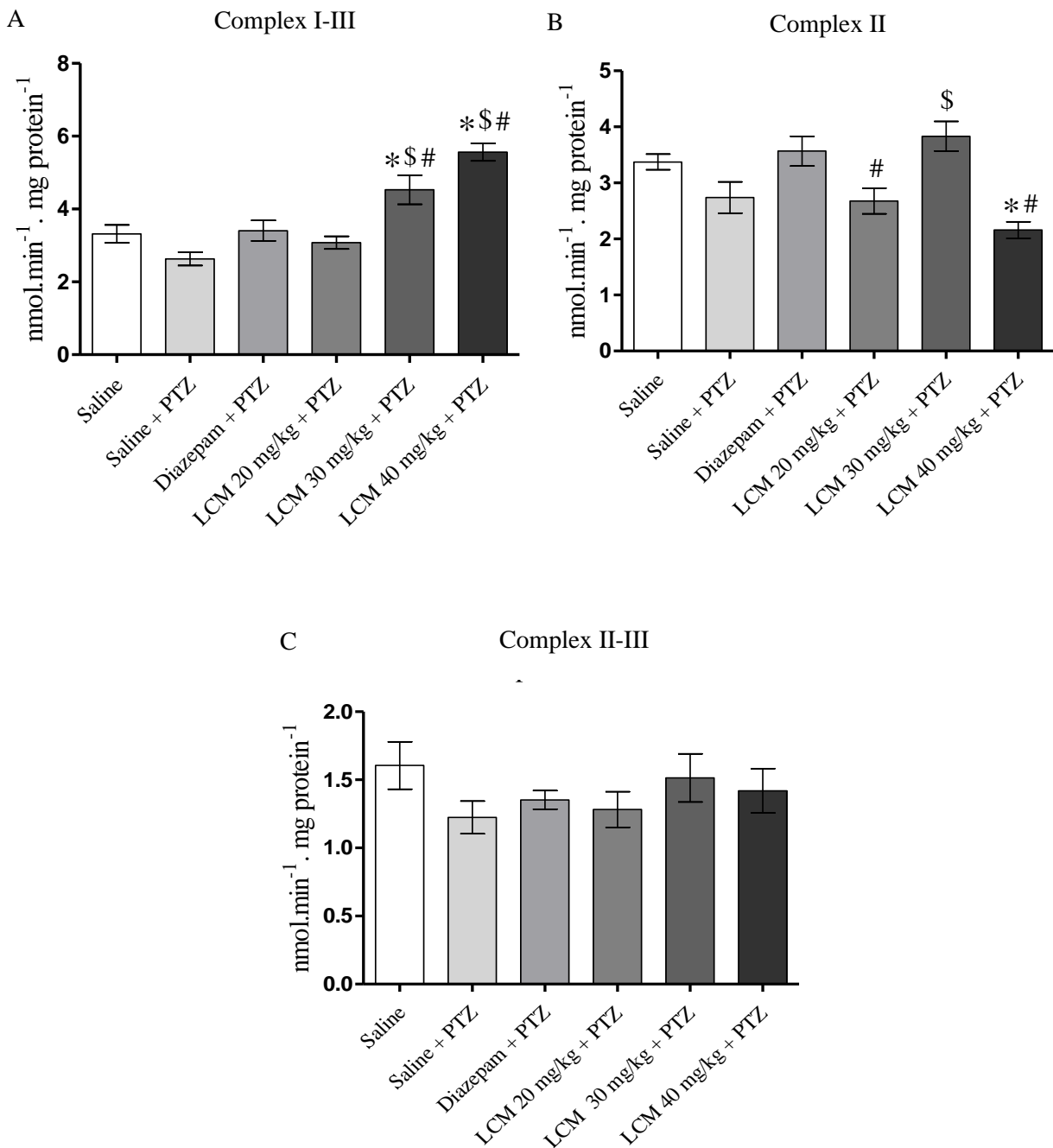


Fig. 4 Effect of treatment with LCM on mitochondrial enzyme complex activity promoted by PTZ-kindling in hippocampi. (A) mitochondrial complex I-III activity, (B) mitochondrial complex II activity and (C) mitochondrial complex II-III activity. Values are mean \pm SEM. $n = 4-5$ per group; $*p \leq 0.05$ in comparison to saline group, $\#p \leq 0.05$ in comparison to diazepam + PTZ group, and $\$p \leq 0.05$ in comparison to saline + PTZ group. ANOVA followed by the Duncan test.

3.4. Effect of lacosamide on DNA damage induced by PTZ

In the genotoxic evaluation using the alkaline comet assay in hippocampi, the saline + PTZ group showed an increase in the index and frequency of damage ($p < 0.001$ and $p < 0.05$, respectively), compared to the saline group. LCM 20 and 30 mg/kg reduced DNA damage, decreasing DI ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively), compared to the saline + PTZ group. There was no significant decrease in DI value in the group treated with the highest dose of LCM in relation to saline + PTZ group. In the peripheral blood, there was no significant difference in DI or DF values among the groups studied (**Table 4**).

Table 4 Effect of LCM on DNA damage promoted by PTZ-induced kindling model in mice.

	Damage index (DI)	Damage frequency (DF)
Hippocampi		
Saline	60.3 ± 10.4	57.3 ± 6.8
Saline + PTZ	186.4 ± 55.2***	82.4 ± 13.1*
LCM 20 mg/kg + PTZ	115.8 ± 25.9 #	78.6 ± 15.8
LCM 30 mg/kg + PTZ	83.0 ± 34.2 ##	67.3 ± 22.4
LCM 40 mg/kg + PTZ	141.4 ± 25.0*	90.4 ± 7.1*
Diazepam + PTZ	107.0 ± 42.5 #	74.8 ± 14.6
Peripheral blood		
Saline	23.3 ± 6.7	23.3 ± 6.7
Saline + PTZ	25.8 ± 6.3	25.8 ± 6.3
LCM 20 mg/kg + PTZ	28.0 ± 6.8	28.0 ± 6.8
LCM 30 mg/kg + PTZ	31.8 ± 7.4	31.8 ± 7.4
LCM 40 mg/kg + PTZ	25.5 ± 7.5	25.0 ± 7.9
Diazepam + PTZ	30.0 ± 7.5	30.0 ± 7.5

Values are mean ± SEM. $n = 5-6$ animals per group. DI can range from 0 (completely undamaged, 100 cells × 0) to 400 (with maximum damage 100 × 4). DF was calculated based on number of cells with tail versus those with no tail. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ in comparison to saline group; # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$ in comparison to saline + PTZ group. ANOVA followed by the Tukey test.

3.5. Effect of lacosamide on mutagenic activity induced by PTZ

In the mutagenic activity evaluation using the micronucleus test in bone marrow, there was no statistical difference in the ratio PCE/NCE of the treated groups in comparison to Sal/Sal group, indicating that the treatments were not toxic to bone marrow. The micronucleus frequencies in PCE were also not statistically different among the groups, demonstrating that PTZ *per se*, and the combinations PTZ + LCM, and PTZ + DZP did not induce chromosomal mutations (**Table 5**).

Table 5 Micronucleus test in bone marrow of PTZ-kindling mice, untreated or treated with LCM.

Group	MNPCE ^a in 2000 PCE	Ratio PCE/NCE ^b
Saline	5.0 ± 2.6	1.1 ± 0.2
Saline + PTZ	4.7 ± 2.3	1.4 ± 0.8
LCM 20 mg/kg + PTZ	3.3 ± 1.2	1.2 ± 0.4
LCM 30 mg/kg + PTZ	4.2 ± 1.5	1.0 ± 0.1
LCM 40 mg/kg + PTZ	3.8 ± 2.2	1.2 ± 0.5
Diazepam + PTZ	3.2 ± 1.2	1.1 ± 0.3

^aMNPCE: micronucleus in polychromatic erythrocytes.

^bRatio PCE/NCE: ratio polychromatic erythrocytes/normochromatic erythrocytes.

Values are mean ± SEM. *n* = 5-6 animals per group. ANOVA followed by the Tukey test.

3.6. Effect of lacosamide on Bcl-2 and COX-2 expressions in PTZ-kindling mice

To evaluate the effect of LCM on suppression of neuronal apoptosis, the expression of Bcl-2 was performed by Western blotting. In mice that received PTZ there was no change in Bcl-2 expression compared to saline group. LCM treatment also did not significantly alter Bcl-2 expression (**Fig. 6A**). Similarly, to evaluate a possible anti-inflammatory effect of LCM, the expression of COX-2 was performed by the same technique. PTZ treatment also did not change COX-2 expression compared to saline group. However, the treatment with LCM 20 mg/kg increased COX-2 expression in comparison to saline and diazepam + PTZ groups (*p* < 0.001) (**Fig. 6B**).

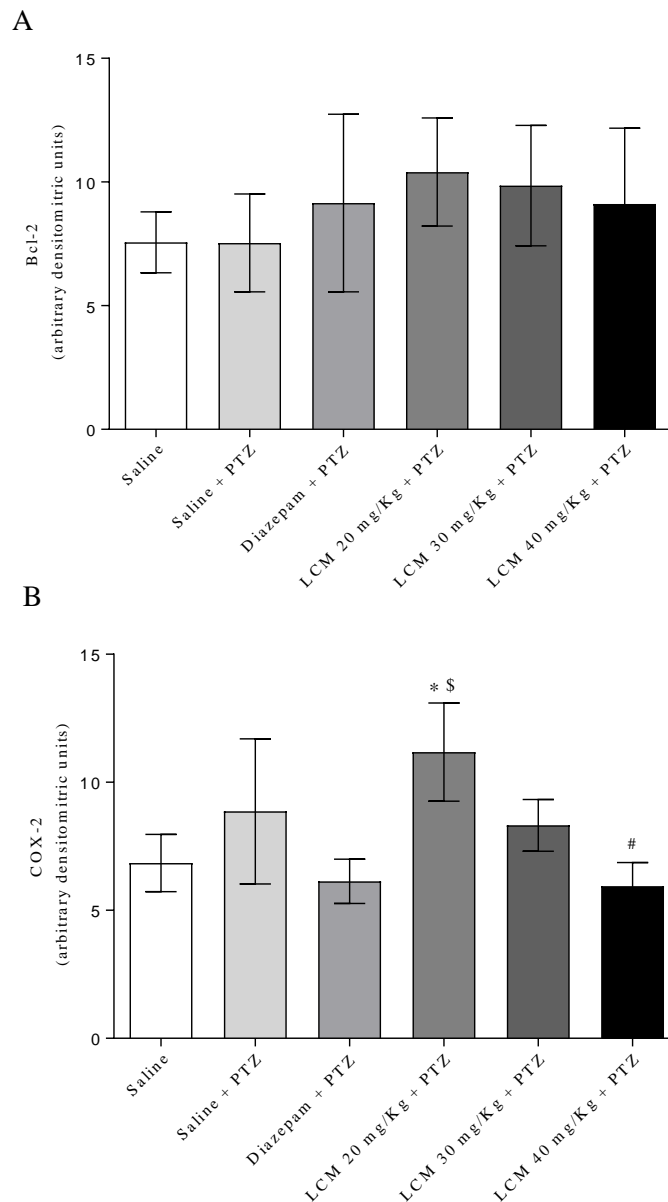
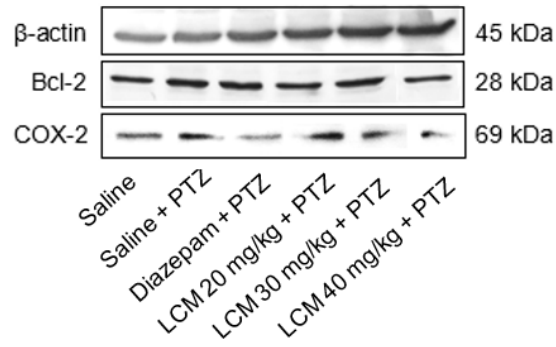


Fig. 5 Effect of treatment with LCM on Bcl-2 and COX-2 expressions promoted by PTZ-kindling in hippocampi. (A) Bcl-2 expression, (B) COX-2 expression. Values are mean \pm SEM. $n = 4$ per group; $*p < 0.001$ in comparison to saline group and $\$p < 0.001$ in comparison to diazepam + PTZ group. ANOVA followed by the Tukey test.

4 Discussion

Antiepileptic drugs work by inhibiting abnormal depolarization or its propagation. They act by increasing GABAergic transmission, decreasing glutamatergic transmission or even blocking ion channels. The ability of PTZ to block GABA_A receptors gives it pro-convulsive property, and its repeated administration leads to progressive behavioral and electrographic changes in animals (McNamara et al., 1985).

In the present study, repeated administration of a subconvulsive dose of PTZ (50 mg/kg) on alternate days for a period of 11 days resulted in kindling-like behavior in mice, which was not attenuated by treatment with LCM (there was no decrease in the percentage of seizures and no increase in latency for the first clonic forelimb seizure lasting more than 3 s compared to saline + PTZ group), corroborating another study in which LCM was ineffective when subcutaneous PTZ was applied (Stöhr et al., 2007). On the other hand, LCM was effective when applied in other models such as the sound-induced seizures in the genetically susceptible Frings mouse, against maximal electroshock test induced seizures, in the hippocampal kindling model of partial seizures and in the 6 Hz model of psychomotor seizures (Stöhr et al., 2007). In a recent study, LCM prevented generalized seizures in a rodent model of cortical dysplasia, using a single subconvulsive dosage injection of PTZ (Nemes et al., 2017). Diazepam was used here as a positive control, and completely preventing the development of PTZ-kindling. Drugs that act by directly activating GABA_A receptors, such as diazepam, are highly effective in preventing PTZ-induced seizures, as observed by Coelho et al. (2015).

It is well established that prolonged epileptic seizures may result in oxidative stress, mitochondrial dysfunction, activation of metabolic pathways of apoptosis, adenosine triphosphate (ATP) decreased levels and activation of Bcl-2 proteins and caspases (Chuang, 2010). This is due to the excess of nitric oxide and peroxynitrite produced during seizures, which inhibit enzymes of mitochondrial respiratory chain and induce apoptosis and neuronal death (Carreras et al., 2004).

Mitochondria are the main source of ROS generation. The mitochondrial respiratory chain consists of a set of connected multienzyme complexes (I, II, III, IV and V) in addition to electron transporters (coenzyme Q and cytochrome *c*) and iron-sulfur proteins. The production of ROS occurs in the intermediate steps of the respiratory chain, the main sites of formation being the complexes I and III (Adam-Vizi et al., 2006;

Kowaltowski et al., 2009). It has also been suggested that complex II is responsible for a significant portion of ROS production (Orr et al., 2012). Therefore, damage or mutations to these complexes may increase ROS production (Murphy et al., 2009) and influence neuronal excitability.

Despite LCM had no effect on the behavioral assessment of the PTZ-kindling model, we found that LCM 20, 30 and 40 mg/kg attenuated the increase in ROS produced by repeated injections of PTZ in mice. This antioxidant effect was also observed with other antiepileptic drugs with different mechanisms of action, such as felbamate and topiramate (glutamatergic transmission antagonists) and levetiracetam (binding with SV2A protein and modulation of potassium channel chains) (Mazhar et al., 2017). We also observed that diazepam was able to decrease ROS production, but was less effective than LCM 40 mg/kg. Although an intensification of GABAergic transmission is a potent anticonvulsant mechanism, it is possible to suggest that other molecular targets may be more effective in improving the oxidative stress parameters induced by the pro-oxidative agent PTZ, as also observed in the preliminary study of Mazhar et al. (2017).

Different antioxidant systems develop during evolution, among them antioxidant enzymes such SOD and CAT (Michiels et al., 1994). Here, PTZ also increased the activities of SOD and CAT when compared to the saline group. In the groups treated with LCM, there was a decrease in SOD and CAT activities, suggesting that another mechanism may be involved in this anti-ROS activity. This same effect can be observed in experimentally induced transient cerebral ischemia, a different experimental condition compared to the condition used here, in which the possible neuroprotective effect of LCM on CA1 pyramidal neurons is due to the increase of CAT and glutathione peroxidase (GPx) expression, but not SOD, after pre-treatment with LCM (Choi et al., 2016).

Although PTZ treatment has not significantly decreased the activity of mitochondrial enzyme complexes, other studies reported decreased mitochondrial activity with a chronic subconvulsive dose of PTZ (Bhardwaj and Kumar, 2016a; Bhardwaj and Kumar, 2016b), supporting the hypothesis of mitochondrial dysfunction during epileptogenesis. In this study, LCM 30 and 40 mg/kg improved mitochondrial enzyme complex I-III activity compared to saline and saline + PTZ groups. Similarly, LCM 30 mg/kg improved mitochondrial enzyme complex II activity compared to the control group saline + PTZ. It was further hypothesized that the antioxidant action of LCM could probably be responsible for improving the function of mitochondrial

respiratory chain complex activities compared to the saline treatment group, suggesting a neuroprotective effect.

Oxidative stress can also cause damage to cellular components such as lipids, proteins and DNA (Aguilar et al., 2012). In our study, PTZ-kindling increased DNA damage in the hippocampi of mice, as previously demonstrated in another study (Frantz et al., 2017). Treatment with LCM 20 and 30 mg/kg decreased DNA damage index and the frequency. These results are probably due to the detoxification of free radicals promoted by LCM. Comet assay in blood and hippocampus of rats treated with valproate, an antiepileptic drug acting on sodium channels like LCM, showed that this drug has antigenotoxic property via an antioxidant-like mechanism (Andreazza et al., 2008). It is important to note that LCM 40 mg/kg was not able to decrease DNA damage in hippocampus. In addition, this group presented increased CAT activity and decreased complex II activity compared to saline group, suggesting a tendency to pro-oxidant effects which may emerge when high antioxidant doses are applied in biological systems. Other drugs such as carbamazepine, oxcarbazepine and tiagabine were able to induce oxidative process in astrocyte culture and thus lead to lipid peroxidation and DNA damage (Cardile et al., 2001; Pavone and Cardile, 2003).

DNA repair may be subject to errors, leading to mutations. The micronucleus test is widely recommended to evaluate drug safety (Mavournin et al., 1990) and was carried out to evaluate the possible increase in the genomic instability by the treatments. As shown in **Table 5**, the saline + PTZ group did not increase the micronucleus frequency, suggesting that it is not able to induce mutagenicity, although it increased DNA damage in hippocampi. PTZ did not induce DNA damage in blood, showing genotoxicity only occurs in a specific tissue, suggesting that DNA damage in hippocampi may be due to PTZ epileptogenic action rather than it is a direct damage of the drug on DNA. No increase in micronucleus frequency was observed in LCM or diazepam treated groups in the kindling epilepsy model, suggesting that the treatments did not disturb the genomic stability. The PCE:NCE ratio was similar in all groups, indicating that the treatments were not toxic to bone marrow.

In addition to oxidative stress, studies suggest that neuroinflammation involving activated glial cells and increased expression of inflammatory mediators may contribute to epileptogenesis, favoring the occurrence of recurrent spontaneous seizures (Wang et al., 2015). COX-2 is an important mediator of neuroinflammation, converting arachidonic

acid to prostaglandins, potent mediators of inflammatory signaling (Rojas et al., 2014). The induction of COX enzymes leads to an increase, especially PGE₂, which may facilitate the release of glutamate from the terminal nerve (Mirjany et al., 2002). In a study using nimesulide (a COX-2 inhibitor), it was possible to reverse the phenomenon of kindling in mice, indicating the possibility of involvement of COX isoforms (Dhir et al., 2007). However, in our study the group treated with LCM 20 mg/kg showed an increased COX-2 expression compared to the saline group. Therefore, it may be suggested that increased COX-2 expression and consequent prostaglandin production may have contributed to the ineffectiveness of LCM against PTZ-kindling mice.

Finally, to evaluate the influence of LCM on neuronal apoptosis, the expression of the anti-apoptotic Bcl-2 protein was investigated. It is known that repeated seizures may also lead to loss of neuronal cells, which further contributes to epileptogenesis (Carmona-Aparicio et al., 2015). The activation of the intrinsic apoptotic pathway by the Bcl-2 family of apoptotic proteins (Bax, Bim, Bid) is the main pathway observed in epilepsy (Graham et al., 1996). The results showed that none of the treatments promoted alteration in Bcl-2 expression compared to saline and saline-PTZ groups. Similarly, Lou et al. (2015) demonstrated by immunohistochemical technique that positive Bcl-2 cells of the valproic acid treated group did not show statistical variation compared to the group treated with the convulsive agent PTZ. However, neuronal apoptosis, which may be the cause or consequence of epilepsy, becomes a potential alternative target for the treatment of this disorder (Méndez-Armenta et al., 2014).

5 Conclusions

The results of this study demonstrated that, although LCM was not able to prevent the establishment of “kindling state”, this compound exhibit potential to reduce free radicals and the genotoxic damage caused by the PTZ-kindling model, in some doses. LCM was also able to improve the activity of complex I-III, the main site of ROS formation in mitochondria, probably due to its antioxidant action. These findings suggest that LCM has a neuroprotective effect, which may be important in the prevention and management of neurological disorders, such as epilepsy.

Acknowledgements

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; N. 307064/2013-1) and Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS, N. 34134).

References

- Adam-Vizi, V., Chinopoulos, C., 2006. Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends Pharmacol Sci.* 27, 639-645.
- Aebi, H., 1984. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol.* 105, 121-126.
- 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. *Oxid Med Cell Longev.* 2012: 795259.
- 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. *J Psychiatry Neurosci.* 33, 516-524.
- Beyreuther, B.K., Freitag, J., Heers, C., Krebsfänger, N., Scharfenecker, U., Stöhr, T., 2007. Lacosamide: a review of preclinical properties. *CNS Drug Rev.* 13, 21-42.
- Bhardwaj, M., and Kumar, A., 2016a. Neuroprotective mechanism of Coenzyme Q10 against PTZ induced kindling and associated cognitive dysfunction: Possible role of microglia inhibition. *Pharmacol Rep.* 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. *Phytother Res.* 30, 306-13.
- Bradford, M.M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding. *Anal Biochem.* 72, 248-254.
- Cardile, V., Palumbo, M., Renis, M., Pavone, A., Maci, T., Perciavalle, V., 2001. Tiagabine treatment and DNA damage in rat astrocytes: an *in vitro* study by comet assay. *Neurosci Lett.* 306, 17-20.
- 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. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 18348-18367.

Carreras, M.C., Franco, M.C., Peralta, J.G., Poderoso, J.J., 2004. Nitric oxide, complex I, and the modulation of mitochondrial reactive species in biology and disease. *Mol Aspects Med.* 25, 125-39.

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. *Clin Neurosci Res.* 6, 237-245.

Choi, H.Y., Park, J.H., Chen, B.H., Shin, B.N., Lee, Y.L., Kim, I.H., Cho, J.H., Lee, T.K., Lee, J.C., Won, M.H., Ahn, J.H., Tae, H.J., Yan, B.C., Hwang, I.K., Cho, J.H., Kim, Y.M., Kim, S.K., 2016. Increases of Catalase and Glutathione Peroxidase Expressions by Lacosamide Pretreatment Contributes to Neuroprotection Against Experimentally Induced Transient Cerebral Ischemia. *Neurochem Res.* 41, 2380-2390.

Chuang, Y.C., 2010. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in seizure-induced neuronal cell death. *Acta Neurol Taiwan.* 19, 3-15.

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 Sci.* 122, 65-71.

Coelho, V.R., Vieira, C.G., de Souza, L.P., da Silva, L.L., Pflüger, P., Regner, G.G., Papke, D.K., Picada, J.N., Pereira P., 2016. Behavioral and genotoxic evaluation of rosmarinic and caffeic acid in acute seizure models induced by pentylentetrazole and pilocarpine in mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 389, 1195-1203.

da Costa E Silva, L.D., Pereira, P., Regner, G.G., Boaretto, F.B.M., Hoffmann, C., Pflüger, P., da Silva, L.L., Steffens, L.R., Morás, A.M., Moura, D.J., Picada, J.N., 2018. DNA damage and oxidative stress induced by seizures are decreased by anticonvulsant and neuroprotective effects of lobeline, a candidate to treat alcoholism. *Metab Brain Dis.* 33, 53-61.

da Silva, L.F., Pereira, P., Elisabetsky, E., 1998. A neuropharmacological analysis of PTZ-induced kindling in mice. *Gen Pharmacol.* 31, 47-50.

da Silva, C.G., Ribeiro, C.A.J., Leipnitz, G., Dutra, C.S., Wyse, A.T.S., Wannmacher, C.M.D., Sarkis, J.J.F., Jakobs, C., Wajner, M., 2002. Inhibition of cytochrome c oxidase activity in rat cerebral cortex and human skeletal muscle by D-2-hydroxyglutaric acid in vitro. *Biochim Biophys Acta.* 1586, 81-91.

de Oliveira, P.A., Lino, F.L., Cappelari, S.E., da Silva Brum, L.F., Picada, J.N., Pereira, P., 2008. Effects of gamma-decanolactone on seizures induced by PTZ-kindling in mice. *Exp Brain Res.* 187, 161-166.

Dhir, A., Naidu, P.S., Kulkarni, S.K., 2007. Neuroprotective effect of nimesulide, a preferential COX-2 inhibitor, against pentylentetrazol (PTZ)-induced chemical kindling and associated biochemical parameters in mice. *Seizure.* 16, 691-697.

- Duncan, J.S., 2011. The evolving classification of seizures and epilepsies. *Epilepsia*. 52, 1204-1209.
- Fischer, J.C., Ruitenbeek, W., Berden, J.A., Trijbels, J.M.F., Veerkamp, J.H., Stadhouders, A.M., Sengers, R.C.A., Janssen, A.J.M., 1985. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin Chim Acta*. 153, 23-36.
- 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. *Neurosci Lett*. 661, 33-40.
- 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. *Restor Neurol Neurosci*. 9, 243-250.
- Grings, M., Moura, A.P., Parmeggiani, B., Pletsch, J.T., Cardoso, G.M.F., August, P.M., Matté, C., Wyse, A.T.S., Wajner, M., Leipnitz, G., 2017. Bezafibrate prevents mitochondrial dysfunction, antioxidant system disturbance, glial reactivity and neuronal damage induced by sulfite administration in striatum of rats: implications for a possible therapeutic strategy for sulfite oxidase deficiency. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 1863, 2135-2148
- Higgins, G.A., Breysse, N., Undzys, E., Kuo, C., Joharchi, N., Derksen, D.R., Xin, T., Isaac, M., Slassi, M., 2009. The anti-epileptic drug lacosamide (Vimpat®) has anxiolytic property in rodents. *Eur J Pharmacol*. 624, 1-9.
- Kiasalari, Z., Khalili, M., Roghani, M., Sadeghian, A., 2012. Antiepileptic and antioxidant effect of *Brassica nigra* on pentylentetrazol-induced kindling in mice. *Iran J Pharm Res*. 11, 1209-1217.
- Kowaltowski, A.J., de Souza-Pinto, N.C., Castilho, R.F., Vercesi, A.E., 2009. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med*. 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. *Chem Res Toxicol*. 5, 227-231.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Lewis-Farr, A., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 193, 265-275.
- 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.
- Luo, Z., Fang, Y., Zhang, L., 2015. The effects of antiepileptic drug valproic acid on apoptosis of hippocampal neurons in epileptic rats. *Pak J Pharm Sci*. 28, 319-324.

- 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. *Mutat Res.* 239, 29-80.
- Mazhar, F., Malhi, S.M., Simjee, S.U., 2017. Comparative studies on the effects of clinically used anticonvulsants on the oxidative stress biomarkers in pentylenetetrazole-induced kindling model of epileptogenesis in mice. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 28, 31-42.
- McNamara, J. O., Bonhaus, D. W., Shin, C., Crain, B. J., Gellman, R. J., Giancchino, J. L., 1985. The kindling model of epilepsy: a critical review. *CRC Critical Rev ClinNeurobiol.*1,341-391.
- 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. *Oxid Med Cell Longev.* 2014:293689
- Michiels, C., Raes, M., Toussaint, O., Remacle, J., 1994. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 17, 235-248.
- Mirjany, M., Lap, H.O., Maria, G., Pasinetti., 2002. Role of cyclooxygenase-2 in neural cell activity and glutamate-mediated excitotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther.* 301, 494-500.
- Misra, H.P., Fridovich, I., 1972. The role of superoxide anion in the epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 247, 3170–3175.
- Murphy, M.P., 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J.* 417, 1-13.
- Nemes, A.D., O'Dwyer, R., Najm, I.M., Ying, Z., Gonzalez-Martinez, J., Alexopoulos, A.V., 2017. Treatment with lacosamide impedes generalized seizures in a rodent model of cortical dysplasia. 58, 1755-1761.
- Nirwan, N., Siraj, F., Vohora, D., 2018. Inverted-U response of lacosamide on pilocarpine-induced status epilepticus and oxidative stress in C57BL/6 mice is independent of hippocampal collapsin response mediator protein-2. *Epilepsy Res.* 145, 93-101.
- 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. *J Biol Chem.* 287, 42921-42935.
- Pavone, A., Cardile, V., 2003. An in vitro study of new antiepileptic drugs and astrocytes. *Epilepsia.* 44, 34-39.
- 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.

Rojas, A., Jiang, J., Ganesh, T., Yang, M.S., Lelutiu, N., Gueorguieva, P., Dingledine, R., 2014. Cyclooxygenase-2 in epilepsy. *Epilepsia*. 55, 17-25.

Schapira, A.H.V., Mann, V.M., Cooper, J.M., Dexter, D., Daniel, S.E., Jenner, P., Clark, J.B., Marsden, C.D., 1990. Anatomic and disease specificity of NADH CoQ1 reductase (complex I) deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem*. 55, 2142-2145.

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 Res*. 74, 147-54.

Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*. 35, 206-221.

UCB Pharma, Vimpat® (lacosamide). EMA Summary of Product Characteristics. Cited April 10, 2019. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/vimpat-epar-product-information_en.pdf

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.

World Health Organization (WHO), 2018. Cited April 10, 2019. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy>

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 β , IL-6 e TNF- α 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 H₂DCF-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 PGE₂, 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
- 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- α and TGF- β 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 β 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- α 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



U F R G S
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: AVALIAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DE LACOSAMIDA SOBRE PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS, BIOQUÍMICOS 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