

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em
Biologia Animal

**Atividade antiepiléptica do peptídeo Neuropolybina e de um
análogo: estudo eletroencefalográfico e potencial alvo
farmacológico**

Juliana de Castro e Silva

Brasília-DF

2013

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em
Biologia Animal

**Atividade antiepiléptica do peptídeo Neuropolybina e de um
análogo: estudo eletroencefalográfico e potencial alvo
farmacológico**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Juliana de Castro e Silva

Orientadora: Prof^a Dr^a Márcia Renata Mortari

Brasília-DF

2013

Dedicatória

*Aos meus pais, Inês e Francisco
Aos meus avós, Lourival, Maria do Carmo,
Pedro (in memoriam) e Maria
À minha orientadora-amiga, Márcia*

“Assim como falham as palavras quando
querem exprimir qualquer pensamento, assim
falham os pensamentos quando querem
exprimir qualquer realidade.”

Alberto Caeiro

Agradecimentos

A Deus, pelo amor incondicional.

Aos meus pais, pelo amor, carinho, dedicação, cuidado e apoio sempre.

Aos meus irmãos, Lucas e Arthur.

À minha família pelo amor e incentivo, e em especial à minha prima-irmã Nívea por estar sempre ao meu lado.

Ao Fábio, pelo carinho, apoio, incentivo e por tornar sempre tudo mais leve.

Às minhas amigas Fernanda, Larissa, Mariana e Nathália, pelo amor e por estarem sempre presentes.

À minha orientadora Márcia, pela amizade, dedicação, pelos ensinamentos e por ser um exemplo pra mim.

Aos meus queridos Flávia, Gabriel e Rafael, por tudo. Sem vocês eu não conseguiria.

A todas as meninas da Farmacologia, pelos dias alegres, pela ajuda e parceria.

Ao professor Renê, que gentilmente me recebeu em seu laboratório.

À Helene, que me acolheu em sua casa e tanto me ajudou.

À Silmara, por todo o suporte com os experimentos.

À Alexandra, que também me recebeu em sua casa e esteve sempre pronta a me atender quando precisei.

Aos professores Elisabeth e Carlos Schwartz, pelos ensinamentos e pela disponibilidade sempre em me ajudar.

Aos ratos e camundongos.

Ao CNPq, à CAPES e à FAPDF, pelo apoio financeiro.

Aos colegas da BioAni, pelos momentos agradáveis.

Ao PPG BioAni, pela oportunidade.

Sumário

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Abreviaturas

Lista de Abreviatura dos Aminoácidos

Resumo

Abstract

1. Introdução	1
1.1. Epilepsia - Definição, classificação e epidemiologia	1
1.2. Farmacoterapia da Epilepsia - Histórico, mecanismo de ação, vantagens e desvantagens.....	4
1.3. Glutamato e seu papel central na fisiopatologia da epilepsia	8
1.4. O GABA e a epilepsia.....	14
1.5. Compostos antiepiléticos isolados da peçonha de Artrópodes.....	16
2. Objetivos.....	20
2.1. Objetivo geral	20
2.2. Objetivos específicos	20
3. Metodologia.....	21
3.1. Síntese dos peptídeos	21
3.2. Animais.....	21
3.3. Procedimentos estereotáxicos	22
3.4. Avaliação dos peptídeos no modelo de indução aguda de crises epiléticas	23
3.5. Avaliação do efeito da administração sistêmica dos peptídeos no modelo de indução aguda de crises epiléticas	26
3.6. Procedimento estereotáxico para os registros eletroencefalográficos	27
3.7. Avaliação vídeo-eletroencefalográfica	28
3.8. Avaliação de alterações na atividade geral espontânea.....	29
3.9. Verificação da posição da cânula-guia	31
3.10. Avaliação da citotoxicidade dos peptídeos	31
3.11. Potenciais alvos farmacológicos	31

3.11.1. Preparação e obtenção dos sinaptossomas para o ensaio de captação de [3H]-L-Glutamato	31
3.11.2. Ensaio de captação de [3H]-L-Glutamato.....	32
3.11.3. Preparação das membranas sinápticas para o ensaio de ligação a receptores de [3H]-L-Glutamato e [3H]-GABA	34
3.11.4. Ensaio de ligação de [3H]-L-Glutamato e [3H]-GABA em membranas sinápticas.....	36
3.12. Análises estatísticas	37
4. Resultados	38
4.1. Síntese, pureza e modificações dos peptídeos	38
4.2. Posição da cânula-guia	38
4.3. Avaliação da atividade antiepiléptica	39
4.4. Avaliação da atividade antiepiléptica após administração sistêmica dos peptídeos	42
4.5. Avaliação vídeo-eletroencefalográfica	43
4.6. Neurotoxicidade dos peptídeos.....	49
4.7. Citotoxicidade dos peptídeos.....	53
4.8. Potenciais alvos farmacológicos.....	53
4.8.1. Efeito dos peptídeos sobre a captação de [3H]-L-Glutamato.....	53
4.8.2. Efeito dos peptídeos sobre a ligação a receptores de [3H]-L-Glutamato e [3H]-GABA	53
5. Discussão.....	55
6. Conclusões	66
7. Anexos	67
7.1. Anexo 1 - Comitê de Ética.....	67
7.2. Anexo 2 - Espectro de massa do peptídeo Neuropolybina	68
7.3. Anexo 3 - Espectro de massa do peptídeo Modificado	69
8. Referências Bibliográficas.....	70

Lista de Figuras

Figura 1. Gráfico da introdução dos FAEs no mercado de 1853 a 2009, representando o ano da primeira licença ou da primeira menção de uso clínico na Europa, Estados Unidos ou Japão e os principais alvos farmacológicos de cada FAE. Fonte: modificado de Löscher e Schmidt (2011). - 5 -

Figura 2. Representação de uma sinapse excitatória (A) e inibitória (B) e os respectivos alvos moleculares propostos para os principais fármacos utilizados no tratamento da epilepsia. Fonte: modificado de Bialer e White (2010). - 7 -

Figura 3. Etapas de implantação da cânula-guia no ventrículo lateral de um camundongo. (A) Exposição do crânio e marcação do ponto do bregma (seta azul). (B) Perfuração do crânio no local da cânula e do parafuso. (C) Implantação do parafuso. (D) Implantação da cânula, cobertura da região exposta com acrílico dental e obstrução da cânula com fio de aço inoxidável. Fotos: Juliana de Castro. - 23 -

Figura 4. Representação esquemática dos modelos de indução aguda de crises por Pentilenotetrazol (A) e por Pilocarpina (B). - 24 -

Figura 5. Foto de um camundongo no momento da injeção intracerebroventricular por meio de uma bomba de infusão. Foto: Juliana de Castro. - 25 -

Figura 6. Etapas do procedimento estereotáxico para os registros eletroencefalográficos em rato. (A) Exposição do crânio e marcação dos pontos de implantação dos eletrodos e da cânula a partir do ponto do bregma (seta azul). (B) Implantação dos três pares de eletrodos. (C) Implantação cânula e cobertura da região exposta com acrílico dental. (D) Acoplamento do plugue conector com os eletrodos. Fotos: Juliana de Castro. - 27 -

Figura 7. Eletrodos (A) e plugue conector (B) para registros eletroencefalográficos. Fonte: (A) www.pinnaclet.com; (B) Juliana de Castro. - 28 -

Figura 8. Foto demonstrativa de um experimento de registro vídeo-eletroencefalográfico. Foto: Juliana de Castro. - 29 -

Figura 9. Arena utilizada para teste do campo aberto (Insight®). Fonte: www.insightltda.com.br - 30-

Figura 10. Representação esquemática da metodologia utilizada para o ensaio de captação de [³H]-L-Glutamato em sinaptossomas corticais de ratos. Fonte: Modificado de Fachim (2009). - 34 -

Figura 11. Representação esquemática da metodologia para o ensaio de ligação de [³H]-L-Glutamato e [³H]-GABA em sinaptossomas corticais de ratos. Fonte: Modificado de Fachim (2009). - 35 -

Figura 12. Foto de um corte do cérebro de um camundongo mostrando que a cânula foi corretamente implantada no ventrículo cerebral lateral direito. O corante foi injetado em apenas um lado do ventrículo, no entanto toda a estrutura foi corada. A seta vermelha indica a marca da cânula. Foto: Juliana de Castro. - 39 -

Figura 13. Curva de porcentagem de proteção contra a crise epiléptica máxima induzida pelo PTZ nas três diferentes doses dos peptídeos Neuropolybina e modificado, representadas em log da dose (n=5). Para o cálculo da DE₅₀ foi utilizada regressão não-linear sigmoidal. - 40 -

Figura 14. Latência para o início da crise máxima induzida por PTZ, em segundos, nos grupos controles e experimentais (n=5) após administração icv de Neuropolybina, nas doses 0,4 nmol, 1,25 nmol e 2,5 nmol/animal (A), e seu análogo modificado, nas doses 0,5 nmol, 1,5 nmol, 3 nmol (B). Os testes estatísticos utilizados foram ANOVA de uma via e pós teste de Tukey. **p<0,01 e ***p<0,001 comparado ao grupo veículo; #p<0,05 e ##p<0,01 comparado ao grupo DZP; °p<0,05 e °°p<0,01 comparado ao grupo 0,4 nmol. - 41 -

Figura 15. Latência para o início da crise máxima induzida por Pilocarpina, em segundos, nos grupos veículo e experimentais (n=4-5) após administração icv de

Neuropolybina, nas doses 0,4 nmol, 1,25 nmol e 2,5 nmol/animal (A), e seu análogo modificado, nas doses 0,5 nmol, 1,5 nmol, 3 nmol (B). O teste estatístico utilizado foi ANOVA de uma via. - 42 -

Figura 16. Latência para o início da crise máxima induzida por PTZ, em segundos, nos grupos controles e experimentais (n=5) após administração ip de Neuropolybina e seu análogo modificado (400 nmol/animal). Os testes estatísticos realizados foram ANOVA de uma via e Tukey. ###p<0,001 comparado ao grupo DZP. - 43 -

Figura 17. Latência para o início da crise eletroencefalográfica e comportamental máxima induzida por PTZ, em segundos, no grupo controle veículo e nos grupos tratados icv com os peptídeos Neuropolybina e modificado na dose de 3 nmol/animal (n=4-5). Os testes estatísticos realizados foram ANOVA de uma via e Tukey. *p<0,05 com relação ao grupo veículo. - 44 -

Figura 18. Porcentagem de proteção contra crises máximas induzidas por PTZ, em ratos, nos grupos tratados com os peptídeos Neuropolybina e modificado na dose de 3 nmol/animal e no grupo veículo (n=4-5). Os testes estatísticos realizados foram Qui-quadrado e pós-teste de Fisher. ***p<0,001 em relação ao grupo veículo; °°°p<0,001 em relação ao Neuropolybina. - 44 -

Figura 19. Classificação segundo o índice de Racine das crises epiléticas induzidas por PTZ em animais do grupo veículo e dos grupos experimentais tratados com Neuropolybina e o peptídeo modificado (3 nmol/animal; n=4-5). O teste estatístico utilizado foi ANOVA de uma via. - 45 -

Figura 20. Representação esquemática dos diferentes tipos de ondas observadas durante os registros eletroencefalográficos de crises epiléticas induzidas por PTZ. - 45-

Figura 21. Registro eletroencefalográfico representativo de uma crise generalizada induzida por PTZ em rato, mostrando a sincronia dos disparos nos três pares de eletrodos implantados corticalmente. FE, córtex frontal esquerdo; FD, córtex frontal

direito; PE, córtex parietal esquerdo; PD, córtex parietal direito; OE, córtex occipital esquerdo; OD, córtex occipital direito. - 47 -

Figura 22. Registro eletroencefalográfico representativo de uma crise focal induzida por PTZ em rato, mostrando que o aumento na intensidade do registro acontece apenas no 2º canal de registro. FE, córtex frontal esquerdo; FD, córtex frontal direito; PE, córtex parietal esquerdo; PD, córtex parietal direito; OE, córtex occipital esquerdo; OD, córtex occipital direito. - 48 -

Figura 23. Tempo total, em segundos, gasto pelos camundongos (n=4-5) nos comportamentos (A) imobilidade, (B) exploratório, (C) autolimpeza e (D) elevação no teste do campo aberto após a injeção dos peptídeos Neuropolybina e modificado. As análises estatísticas realizadas foram ANOVA de uma via e Tukey. *p<0,05 e **p<0,01 quando comparado ao grupo veículo; #p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,001 comparado ao grupo DZP; ++p<0,01 comparado a dose de 3 nmol do peptídeo modificado. - 51 -

Figura 24. Tempo acumulado, em segundos, gasto pelos camundongos (n=4-5) nos comportamentos (A) imobilidade, (B) exploratório, (C) autolimpeza e (D) elevação no teste do campo aberto após a injeção dos peptídeos Neuropolybina e modificado. Os testes estatísticos realizados foram MANOVA de medidas repetitivas e Bonferroni. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 quando comparado ao grupo veículo; #p<0,05, ##p<0,01 e ###p<0,001 comparado ao grupo DZP; $\Delta\Delta p$ <0,01 comparado ao grupo Neuropolybina 2,5 nmol; +p<0,05, ++p<0,01 e +++p<0,001 comparado ao grupo modificado 3 nmol. As letras representam em qual grupo está a diferença estatística, a) DZP, b) Neuropolybina 2,5 nmol, c) Neuropolybina 25 nmol, d) modificado 3 nmol e e) modificado 30 nmol. - 52 -

Figura 25. Histograma mostrando os efeitos de concentrações crescentes de Neuropolybina e seu análogo modificado (0,0001 a 1 nmol) na captação de [³H]-L-Glutamato. Os dados são apresentados em porcentagem do controle como média ± EPM de 3 experimentos em triplicata. O teste estatístico realizado foi ANOVA de uma via.

- 53 -

Figura 26. Histograma mostrando os efeitos de concentrações crescentes de Neuropolybina e seu análogo modificado (0,0001 a 1 nmol) na ligação de [³H]-L-Glutamato a seus receptores. Os dados são apresentados em porcentagem do controle como média ± EPM de 3 experimentos em triplicata. O teste estatístico realizado foi ANOVA de uma via. - 54 -

Figura 27. Histograma mostrando os efeitos de concentrações crescentes de Neuropolybina e seu análogo modificado (0,0001 a 1 nmol) na ligação de [³H]-GABA a seus receptores. Os dados são apresentados em porcentagem do controle como média ± EPM de 3 experimentos em triplicata. O teste estatístico realizado foi ANOVA de uma via. - 54 -

Figura 28. Micrografia eletrônica de uma fração de sinaptossomas obtidos de cérebros de camundongos. SV, vesícula sináptica; M, mitocôndria; SJ, junção sináptica. Barra = 0,5 mm. Fonte: Schrimpf *et al.*, 2005. - 59 -

Figura 29. Ilustração do complexo receptor GABA_A e seus vários sítios de ligação a agonistas e antagonistas. Fonte: <http://sites.sinauer.com/psychopharm2e/webbox18.04.html> - 60 -

Lista de Tabelas

Tabela 1. Classificação simplificada das crises epiléticas. (Modificada de Engel, 2006). - 4 -

Tabela 2. Classificação das crises epiléticas induzidas por Pentilenotetrazol de acordo com o índice de Racine (1972), modificado por Lüttjohann e colaboradores (2009).

- 26 -

Tabela 3. Classificação das crises epiléticas induzidas por Pilocarpina de acordo com o índice de Racine (1972), modificado por Shibley e Smith (2002). - 26 -

Tabela 4. Descrição dos comportamentos considerados no bioensaio do campo aberto (modificados a partir de Speller; Westby, 1996). - 30 -

Tabela 5. Distribuição do conteúdo de cada tubo utilizado no ensaio de captação de [³H]-L- Glutamato. - 33 -

Lista de Abreviaturas

[³H]-GABA: GABA triciado

[³H]-L-Glutamato: glutamato triciado

AMPA: ácido amino 3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4propiónico

AP: antero-posterior

BGT1: transportador de GABA/betaína

Ca_v: canais de Ca²⁺ voltagem dependentes

CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

DE₅₀: dose necessária para produzir 50% do efeito máximo

DV: dorso-ventral

DZP: Diazepam

EAAC1: carreador de aminoácido excitatório

EAAT: transportador de aminoácidos excitatórios

EEG: eletroencefalograma

FAE: fármaco antiepiléptico

GABA: ácido γ-aminobutírico

GABA_{A, B} ou C: receptores de GABA

GAT1-3: transportador de GABA

GLAST: transportador de glutamato/aspartato

GLT-1: transportador de glutamato

icv: administração intracerebroventricular

ILAE: Liga Internacional Contra Epilepsia

ip: administração intraperitoneal

KA: receptor cainato

K_v: canais de K⁺ voltagem dependentes

mGluR: receptor metabotrópico de glutamato

ML: meso-lateral

NMDA: N-metil-D-aspartato

Ppnp7: *Polybia paulista* novo peptídeo isolado da fração 7

PTZ: pentilenotetrazol

Pilo: pilocarpina

RNA_m: RNA mensageiro

sc: administração subcutânea

SNC: Sistema nervoso central

Lista de Abreviatura dos Aminácidos

Nome	Símbolo	Abreviatura
Glicina	Gly	G
Alanina	Ala	A
Leucina	Leu	L
Valina	Val	V
Isoleucina	Ile	I
Prolina	Pro	P
Fenilalanina	Phe	F
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Cisteína	Cys	C
Tirosina	Tyr	Y
Asparagina	Asn	N
Glutamina	Gln	Q
Ácido aspártico	Asp	D
Ácido glutâmico	Glu	E
Arginina	Arg	R
Lisina	Lys	K
Histidina	His	H
Triptofano	Trp	W
Metionina	Met	M
Piroglutamato	Pyr	

RESUMO

Silva JC. **Atividade antiepiléptica do peptídeo Neuropolybina e de um análogo: estudo eletroencefalográfico e potencial alvo farmacológico.** Dissertação de mestrado – Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, 2014.

A epilepsia é uma desordem associada à uma disfunção do Sistema Nervoso Central que, de acordo com a OMS, afeta 50 milhões de pessoas no mundo. E apesar da grande disponibilidade de fármacos, o tratamento ainda é ineficaz para parte dos diversos fenômenos clínicos da epilepsia, sendo de grande importância a busca por novas alternativas que possam gerar medicamentos com maior eficácia e menos efeitos adversos. Recentemente, um promissor peptídeo antiepiléptico foi isolado da peçonha da vespa social *Polybia paulista*, denominado Neuropolybina. A fim de elucidar o mecanismo de ação e aprofundar o conhecimento da eficácia antiepiléptica com estudos eletroencefalográficos e comportamentais, esse peptídeo e um análogo, com modificações em sua sequência, foram sintetizados (Aminotech Ltda). Para os testes de proteção contra crises induzidas quimicamente (PTZ, sc, 95 mg/kg; Pilo, ip, 250 mg/kg) camundongos *Mus musculus* (Swiss) foram submetidos a uma neurocirurgia para a implantação de uma cânula-guia no ventrículo lateral direito e administração dos peptídeos via icv. Curvas de proteção foram obtidas a partir da utilização de três doses dos peptídeos (2,5, 1,25 e 0,4 nmol/animal para o peptídeo Neuropolybina e 3, 1,5 e 0,5 nmol/animal para o peptídeo modificado). Ambos compostos aumentaram o tempo de latência para o início das crises de maneira dose-dependente. Os peptídeos não protegeram contra as crises induzidas por pilocarpina em nenhuma das doses testadas. Para os testes eletroencefalográficos, ratos Wistar machos receberam a DE₅₀ dos peptídeos e posteriormente o PTZ (sc, 105 mg/kg). Observou-se que a latência para a crise eletroencefalográfica foi a mesma para a comportamental, e que o tratamento com Neuropolybina aumentou a latência para a crise máxima, e ambos os peptídeos reduziram a severidade das crises. Também foram feitos testes para verificar se os compostos seriam capazes de atravessar a barreira hematoencefálica, mas quando injetados ip não protegeram contra as crises induzidas por PTZ. E ainda, na tentativa de elucidar o mecanismo de ação de tais compostos, ensaios de ligação a receptores de glutamato e GABA e de captação de glutamato foram realizados, mas não foram obtidos resultados significativos. Além disso, a avaliação neurotóxica dos peptídeos no teste do campo aberto revelou que a maior dose de proteção contra crises não afeta o comportamento normal do animal, apenas a dose dez vezes maior. Na avaliação citotóxica os peptídeos não foram hemolíticos nas concentrações testadas (1,5 a 50 nmol/poço) em eritrócitos de camundongos. Sendo assim, os peptídeos sintéticos testados apresentaram uma alta eficácia no modelo de epilepsia, com reduzidos efeitos adversos, corroborando os dados previamente obtidos e, portanto, representa uma ferramenta promissora para o desenvolvimento de novos fármacos neuroativos.

Palavras-chave: epilepsia, peptídeo anti-epiléptico, pentilenotetrazol, eletroencefalografia, glutamato, GABA

ABSTRACT

Silva JC. **Antiepileptic activity of the peptide Neuropolybin and an analogue: electroencephalographic study and potential pharmacological target.** Master dissertation – Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, 2014.

Epilepsy is a disorder associated with a dysfunction of the central nervous system which, according to the WHO, affects 50 million people worldwide. And despite the widespread availability of AEDs, the treatment is still ineffective for the several clinical phenomena of epilepsy, being of great importance the search for new alternatives that can generate drugs with fewer adverse effects. Recently a promising antiepileptic peptide was isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*, named Neuropolybin. To elucidate the mechanism of action and increase knowledge of the antiepileptic efficacy with electroencephalographic and behavioral studies, this peptide and an analogue, with modifications in its sequence, were synthesized (Aminotech Ltda). For the protection tests against chemically induced seizures (PTZ, sc, 95 mg/kg; Pilo, ip, 250 mg/kg) mice underwent neurosurgery for the implantation of a guide cannula in the right ventricle for administration of peptides (icv). Protection curves were obtained by using three doses of the peptides (2.5, 1.25 and 0.4 nmol/animal for Neuropolybin and 3, 1.5 and 0.5 nmol/animal for the modified peptide). Both compounds increased the latency to onset of seizures in a dose-dependent manner. The peptides did not protect against pilocarpine induced seizures at any of the doses tested. For electroencephalographic recordings male Wistar rats received the ED₅₀ of the peptides and then PTZ (sc, 105 mg/kg). It was noted that the latency for behavioral and electrographic seizures was the same, the Neuropolybin treatment increased the latency to the maximum seizure and both peptides reduced the severity of seizures. Tests were also performed to verify if the compounds would be able to cross the blood brain barrier but when injected sistemically did not protect against PTZ-induced seizures. Additionally, in an attempt to elucidate the mechanism of action of these compounds binding assays of glutamate and GABA receptors and glutamate uptake were done but no significant results were obtained. Furthermore, the assessment of neurotoxicity of the peptides on the open field test revealed that the highest dose of protection against seizures does not affect the normal behavior of the animal, only the ten times higher dose. In cytotoxic evaluation peptides were not hemolytic at different concentrations (1.5 to 50 nmol/well) in erythrocytes of mice. Thus, the synthetic peptides tested showed high efficacy in the epilepsy model with reduced adverse effects, confirming the data previously obtained, and therefore Neuropolybin may represents a promising tool for the development of new neuroactive drugs.

Keywords: epilepsy, antiepileptic peptide, pentylentetrazol, electroencephalography, glutamate, GABA

1. Introdução

1.1. Epilepsia – Definição, classificações e epidemiologia

A epilepsia é uma desordem associada à disfunção do Sistema Nervoso Central (SNC), e seus aspectos comportamentais são um terreno fértil para o estudo das relações cérebro-comportamento. Nos últimos anos, uma vasta literatura tem surgido abordando variadas perspectivas neurocomportamentais, psicológicas e sociológicas da epilepsia (Jallon, 2002; Hermann; Seidenberg; Jones, 2008; Piazzini *et al.*, 2008; Thapar; Kerr; Harold, 2009; Gaitatzis; Sisodiya; Sander, 2012; Kernan *et al.*, 2012;), bem como estudos sobre a sua neurofarmacologia, neurobiologia e neuroquímica (Marcangelo; Ovsiew, 2007; Lopantsev; Both; Draguhn, 2009; Casillas-Espinosa; Powell; O'Brien, 2012).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, aproximadamente 50 milhões de pessoas são portadoras deste distúrbio no mundo, e, desses, aproximadamente 80% estão em países em desenvolvimento, sendo que mais da metade não recebe o tratamento adequado (OMS, 2012). A incidência nesses países pode ser atribuída a infecções cerebrais como meningite, encefalite e neurocisticercose. Além de danos cerebrais provenientes de injúrias pré e perinatal, como perda de oxigênio, ou trauma durante o nascimento, ou baixo peso ao nascer, anormalidades congênitas ou condições genéticas associadas a malformações cerebrais. Situações como um golpe forte na cabeça ou acidentes vasculares encefálicos que privam o cérebro de oxigenação eficiente também são relevantes causas da epilepsia (OMS, 2012). Assim, a epilepsia tem sido considerada uma questão de saúde pública importante, particularmente, quando considerados os países em desenvolvimento (Scorza e Cavalheiro, 2004).

A Liga Internacional Contra Epilepsia (*International League Against Epilepsy* - ILAE) estabeleceu a definição de crise epiléptica¹ como uma ocorrência transitória de sinais e/ou sintomas devido a atividade neuronal anormal excessiva ou síncrona (Fisher *et al.*, 2005). Os elementos para definir a epilepsia incluem um histórico de pelo menos

¹ Neste trabalho, serão utilizados os termos “crise epiléptica” e “fármacos/compostos antiepilépticos” em substituição aos termos clássicos “crise convulsiva” e fármacos/compostos anticonvulsivantes” devido a recomendações recentes da ILAE e da Sociedade de Neurofisiologia Médica Brasileira.

uma crise epiléptica, uma alteração cerebral permanente que aumenta a probabilidade de crises futuras, bem como as consequências neurobiológicas, cognitivas, psicológicas e sociais associadas a essa condição (Fisher *et al.*, 2005). Portanto, a epilepsia consiste em uma variedade de sintomas que surgem de distintos processos patológicos do cérebro. A epilepsia pode, então, perpetuar de maneira que o paciente necessite de cuidados médicos durante toda a vida (Liu *et al.*, 2010).

A atividade epiléptica tem um impacto significativo e duradouro no cérebro e poucas crises espontâneas podem aumentar o risco de crises subsequentes, de maior severidade ou não, o que indica que a atividade hiper-síncrona gera mudanças contínuas na excitabilidade das redes neurais (Hauser *et al.*, 1998; Cornejo *et al.*, 2007). Essa reorganização estrutural e funcional duradoura dos circuitos neuronais é acompanhada do declínio das funções cognitivas e comportamentais, como deficits de memória e alterações nos circuitos inibitórios (Sayin *et al.*, 2003; Sutula, 2004). Sendo assim, a plasticidade induzida pelas crises é uma entidade chave para se entender a progressão epileptogênica (Lopantsev; Both; Draguhn, 2009).

No entanto, o impacto imediato das crises na excitabilidade celular ainda permanece parcialmente desconhecido. Para tentar desvendar tais mecanismos iniciais da plasticidade induzida pela epilepsia, Lopantsev e colaboradores (2009) estudaram a transmissão sináptica antes e imediatamente após 3 descargas ictais. Essas descargas foram induzidas por uma elevação transitória de K⁺ extracelular em fatias hipocâmpais de rato. Os resultados mostraram que poucos episódios ictais são suficientes para causar rápidas e duradouras mudanças no balanço excitação/inibição nas redes hipocâmpais, e, portanto podem contribuir para as fases iniciais da progressão da epilepsia.

As crises epilépticas podem afetar as funções sensoriais, motoras, autonômicas, a consciência, o estado emocional, a memória, a cognição e o comportamento (Fisher *et al.*, 2005). Nem todas as crises afetam todos esses fatores, mas todas influenciam ao menos um desses elencados. Sendo assim, apesar dos deficits cognitivos em pacientes epilépticos serem muito frequentes, o padrão e a extensão destes deficits são amplamente variáveis. Essa variabilidade se dá por inúmeros fatores, como local e extensão da área disfuncional ou do dano cerebral, medicação antiepiléptica utilizada, idade do início das crises, duração da epilepsia, tipo e frequência das crises, entre outros (Machado; Frank; Tomaz, 2010).

Recentemente, a comissão sobre Classificação e Terminologia da ILAE reviu conceitos, terminologias e abordagens para a classificação das crises e formas de epilepsia (Berg; Scheffer, 2011). Assim, com relação à etiologia, de acordo com os novos termos, a epilepsia pode ser de origem genética, de causa desconhecida ou ainda devido a algum dano estrutural ou disfunção metabólica.

Assim, de acordo com essa nova terminologia, a epilepsia de etiologia genética pode ser entendida como resultado direto de um defeito genético conhecido ou presumido, em que as crises são consequência da doença (Berg *et al.*, 2009). Com relação às condições estruturais e metabólicas, pode-se dizer que elas estão associadas a um substancial aumento do risco de desenvolver epilepsia e as lesões estruturais incluem distúrbios adquiridos como acidente vascular encefálico, trauma ou infecção. Por último, as epilepsias de causa desconhecida podem ser devido a um distúrbio ainda não reconhecido (Berg *et al.*, 2009).

Em relação à classificação das crises, essas podem ser autolimitadas ou contínuas (estado de mal epilético), podem ainda ser subdivididas em focais ou generalizadas, como representado de maneira simplificada na tabela 1. O estado de mal epilético, que integra as crises contínuas, consiste em crises persistentes, ou duradouras, e repetitivas, de maneira que não seja possível a recuperação da consciência (Penry, 1981). As autolimitadas são aquelas em que a duração, ou seja, o tempo entre o início das manifestações e o fim da atividade epilética, é bem definida, havendo recuperação da crise (Yacubian, 2004).

As crises generalizadas são conceituadas como originárias de algum ponto dentro de redes distribuídas bilateralmente e que rapidamente se espalham (Berg; Scheffer, 2011). Ou seja, são aquelas em que, desde o início, os achados clínicos e eletroencefalográficos sugerem o envolvimento de pelo menos parte de ambos os hemisférios cerebrais (Blume *et al.*, 2001; Yacubian, 2004). As crises focais são aquelas em que a semiologia inicial indica que há ativação inicial de apenas parte de um hemisfério cerebral, originando-se em redes neuronais que podem ser discretamente localizadas ou mais amplamente distribuídas dentro de um único hemisfério (Blume *et al.*, 2001; Berg *et al.*, 2009). Além disso, é possível que apresentem padrões de propagação que podem envolver o hemisfério contralateral, sendo classificadas como crises focais secundariamente generalizadas (Berg *et al.*, 2009; Guerrini; Pellacani, 2012; Poza, 2012).

Tabela 1. Classificação simplificada das crises epiléticas. (Modificada de Engel, 2006)

Crises autolimitadas

- I. Crises generalizadas
 - A. Crises com manifestações tônicas e/ou clônicas
 - B. Crises de ausência
 - C. Tipos de crises mioclônicas
 - D. Espasmos epiléticos
 - E. Crises atônicas

- II. Crises focais
 - A. Locais (Neocorticais ou hipocampais e parahipocampais)
 - B. Com propagação ipsilateral para as áreas neocorticais ou límbicas
 - C. Com espalhamento contralateral para as áreas neocorticais ou límbicas
 - D. Secundariamente generalizadas

Crises contínuas

- I. Estado de mal epilético generalizado
 - A. Tônico-clônico
 - B. Clônico
 - C. Tônico
 - D. Ausência
 - E. Mioclônico

- II. Estado de mal epilético focal
 - A. Epilepsia parcial contínua de Kozhevnikov
 - B. Aura contínua
 - C. Límbico (estado de mal psicomotor)
 - D. Hemiconvulsivo com hemiparesia

1.2. Farmacoterapia da Epilepsia – Histórico, mecanismo de ação, vantagens e desvantagens

Historicamente, os fármacos antiepiléticos (FAEs) podem ser classificados em 3 gerações, como ilustrado na figura 1 (Löscher; Schmidt, 2011). A primeira geração, que entrou no mercado entre 1857 e 1958, inclui o Brometo de Potássio, o Fenobarbital e uma variedade de fármacos derivados de modificações da estrutura dos Barbitúricos, incluindo a Fenitoína, a Pirimidona, a Trimetadiona e a Etosuximida (Krall *et al.*, 1978).

A segunda geração inclui a Carbamazepina, o Valproato e os Benzodiazepínicos, introduzidos entre 1960 e 1975, e que diferem quimicamente dos Barbitúricos (Shorvon, 2009). A Carbamazepina, a Fenitoína, a Pirimidona e o Fenobarbital têm duas desvantagens importantes a serem relatadas: eles são potentes indutores enzimáticos do sistema citocromo P450, levando a importantes interações adversas entre fármacos, e eles causam frequentes reações de hipersensibilidade (Schmidt; Beyenburg, 2009; Schmidt, 2009). O Valproato, por sua vez, é considerado o mais teratogênico entre todos os fármacos disponíveis, além de inibir enzimas envolvidas na glucuronidação, pode causar interações deletérias entre fármacos e falência hepática em indivíduos predispostos (Schmidt; Beyenburg, 2009; Schmidt, 2009).

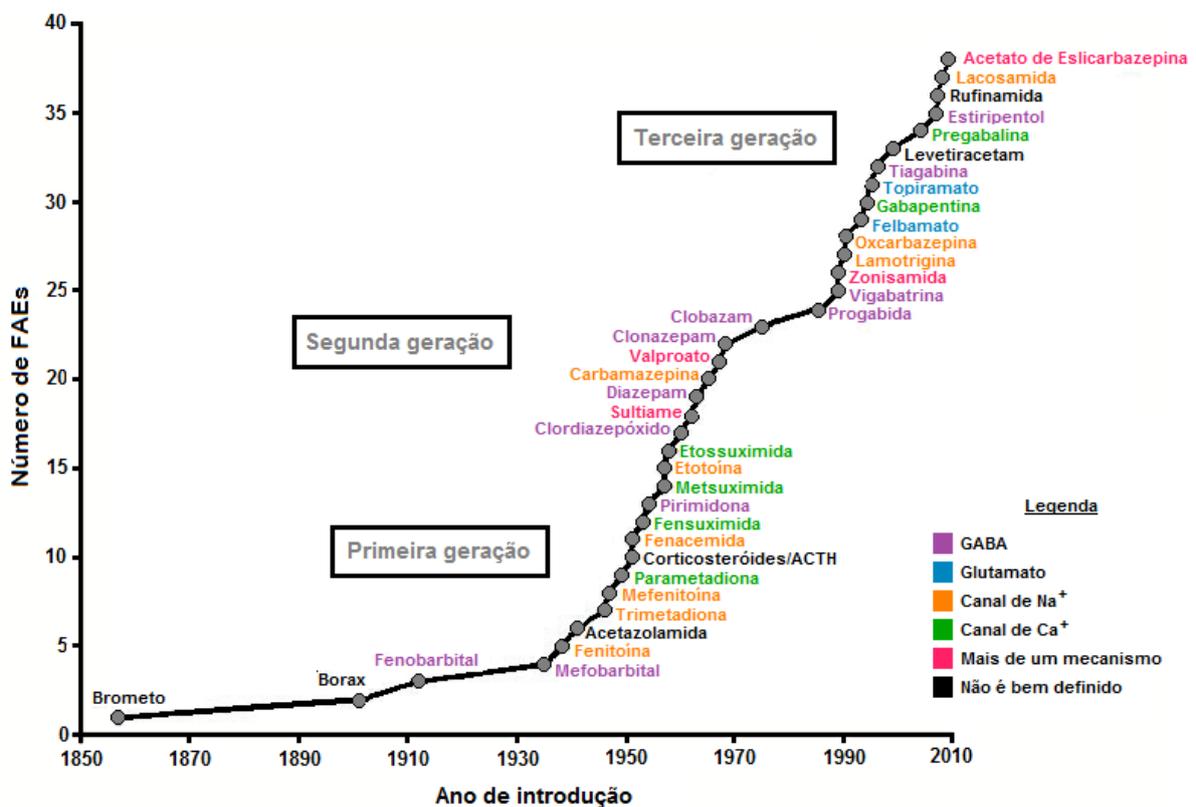


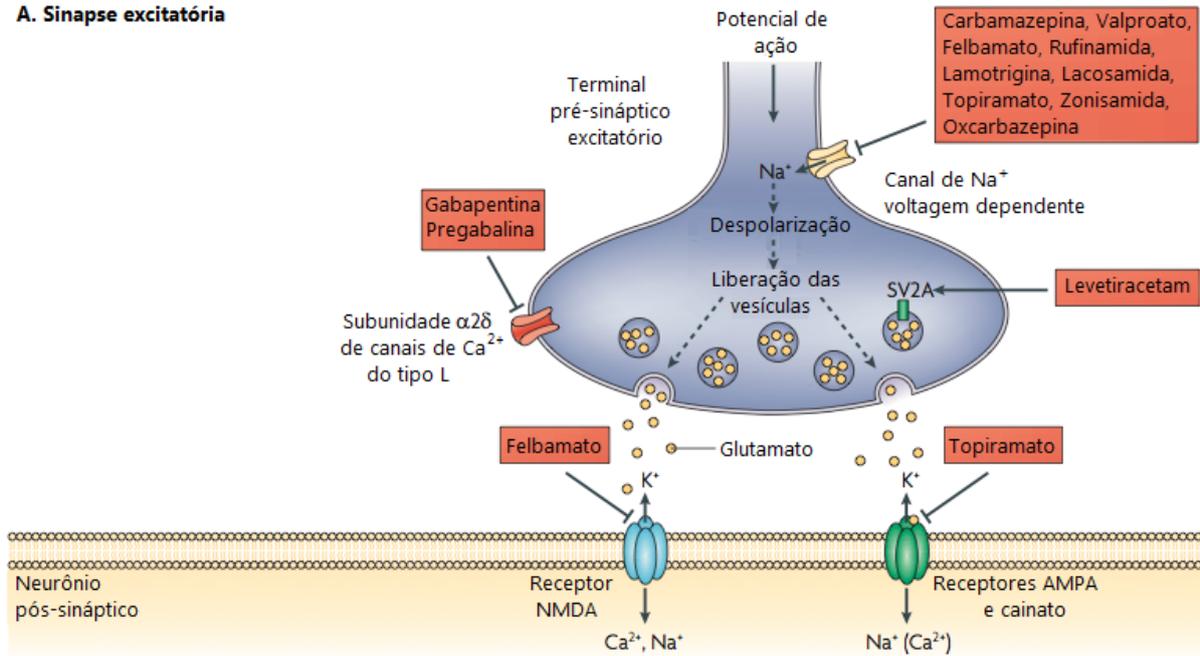
Figura 1. Gráfico da introdução dos FAEs no mercado de 1853 a 2009, representando o ano da primeira licença ou da primeira menção de uso clínico na Europa, Estados Unidos ou Japão e os principais alvos farmacológicos de cada FAE. Fonte: modificado de Löscher e Schmidt (2011).

Após a introdução do Valproato em 1960, nenhum FAE inédito foi introduzido na clínica por quase duas décadas, exceto por alguns Benzodiazepínicos adicionais (Löscher; Schmidt, 2011). Posteriormente, o aumento do conhecimento sobre a fisiopatologia dos distúrbios neurológicos e dos mecanismos básicos de ação de

psicofármacos permitiu que estratégias mais racionais e direcionadas fossem utilizadas para o desenvolvimento de novos FAEs.

Em 1980, iniciou-se a era da terceira geração de FAEs que são compostos desenhados para atuar seletivamente nos mecanismos moleculares envolvidos na epilepsia, pois descobertas experimentais começaram a reforçar a idéia de que o comprometimento da inibição gabaérgica e/ou da excitação glutamatérgica estariam criticamente envolvidos na geração e propagação das crises (Dichter, 1989; Rogawski; Porter, 1990; Meldrum, 1992; Löscher, 1993). Além disso, evidências começaram a sugerir que anormalidades em canais iônicos ou processos enzimáticos regulados por cálcio podem ser a base de alterações na excitabilidade neuronal e resultar em atividade epiléptica (DeLorenzo, 1988). Desta forma, fármacos com mecanismos de ação que atuam aumentando a inibição neuronal mediada pelo GABA (Tiagabina, Progabida, Vigabatrina), diminuindo a excitação mediada pelo glutamato (Felbamato e Topiramato) e modulando canais iônicos para Na⁺ (Carbamazepina, Lamotrigina e Lacosamida), e em particular os canais para Ca²⁺ (Pregabalina e Gabapentina), passaram a ser alvos de estudo para o tratamento da epilepsia, como observa-se na figura 2 (Porter; Rogawski, 1992; Löscher; Schmidt, 1994).

A. Sinapse excitatória



B. Sinapse inibitória

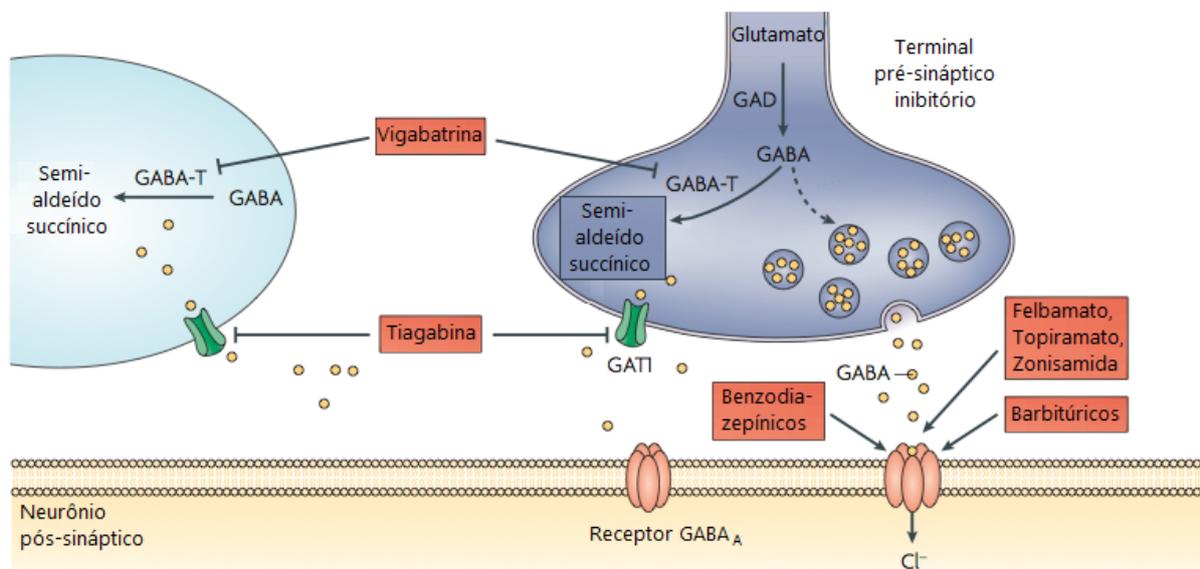


Figura 2. Representação de uma sinapse excitatória (A) e inibitória (B) e os respectivos alvos moleculares propostos para os principais fármacos utilizados no tratamento da epilepsia. Fonte: modificado de Bialer e White (2010).

No entanto, apesar da introdução de uma variedade de novos medicamentos com alvos específicos e críticos na epilepsia, vários estudos têm mostrado que nenhum antiepiléptico de nova geração é mais eficaz que os antigos, e poucos têm eficácia similar (Kwan; Brodie, 2000; Marson *et al.*, 2007; Glauser *et al.*, 2010), mas oferecem vantagem sobre os de 1^a e 2^a geração por apresentar um reduzido risco de reações idiossincráticas e de hipersensibilidade (Schmidt, 2009). Entretanto, tais vantagens

relativas não excluem outros severos efeitos adversos, como a constrição concêntrica no campo visual com a Vigabatrina, a aplasia medular e a falência renal com Felbamato, a síndrome de Stevens-Johnson com Lamotrigina e Oxcarbamazepina, entre outros (Schmidt, 2009).

Além disso, sabe-se que a monoterapia com FAEs é eficiente no controle das crises em aproximadamente 60-70% dos casos recém-diagnosticados (Perucca, 1997; Patsalos, 2013). Dos 30-40% restantes, menos de 15% responderam ao segundo e terceiro antiepiléptico administrado, e menos de 5% dos pacientes tiveram as crises controladas com a politerapia (Kwan; Brodie, 2004). Assim sendo, a opção da politerapia deve ser avaliada com cuidado antes de se iniciar o tratamento, pois há um alto risco de resultar em interações farmacológicas problemáticas, levando em consideração que os pacientes com epilepsia invariavelmente apresentam outras comorbidades. Esses efeitos da interação podem ser aumentados por outros fármacos que o paciente possa utilizar (Patsalos *et al.*, 2002). Resultados de estudos experimentais com modelos animais mostraram que a administração de dois FAEs podem resultar em efeitos antiepilépticos aditivos ou sinérgicos, ou ainda antagonísticos, tóxicos e adversos intoleráveis (Kwan; Brodie, 2004; St Louis, 2009).

Portanto, apesar da grande disponibilidade de fármacos, bem como da possibilidade de associações desses medicamentos, o tratamento eficaz para os diversos fenômenos clínicos da epilepsia ainda é precário. Mesmo com a alternativa cirúrgica sendo efetiva para alguns grupos, ainda restam pacientes com epilepsias refratárias (Wiebe *et al.*, 2001). Destaca-se a grande importância em buscar novas alternativas que possam gerar medicamentos mais eficazes e com menos efeitos adversos.

1.3. Glutamato e seu papel central na fisiopatologia da epilepsia

Considerando a ampla distribuição do glutamato e de seus receptores no SNC, o sistema glutamatérgico (metabolismo, mecanismos de liberação, receptores e transportadores) está envolvido em quase todos os aspectos do desenvolvimento normal do cérebro, funcionamento e envelhecimento, bem como em muitos distúrbios neurológicos, em especial a epilepsia (Danbolt, 2001; Marmioli; Cavaletti, 2012).

Uma das possíveis disfunções nesse sistema é a liberação excessiva de glutamato de focos epilépticos ativos que foi descrita, em diversos modelos animais, desde o ano

de 1976 (Bradford; Dodd, 1976; Bradford; Peterson, 1987). É interessante destacar que a liberação começa imediatamente antes da hiperatividade epileptiforme ser detectada, permanece durante o período de crise e cessa quando a crise termina, sendo assim relacionada causal e temporalmente à hiperatividade epilética (Tang; Bradford; Ling, 2009). O mesmo fenômeno também foi detectado por microdiálise *in vivo* em pacientes com epilepsia do lobo temporal (ELT), bem como uma paralela redução da liberação de GABA durante as crises (During; Spencer, 1993). Isso corrobora com o fato de que o desbalanço entre as neurotransmissões, excitatória e inibitória, é um dos principais mecanismos fisiopatológicos da epilepsia.

O ácido glutâmico, é, então, o principal neurotransmissor excitatório do SNC e sua liberação na fenda sináptica proporciona a ativação de receptores classificados em ionotrópicos (iGluRs) e metabotrópicos (mGluRs).

Dentro do grupo dos iGluRs existem 3 subtipos nomeados por seus principais agonistas: N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido-amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-propiónico (AMPA) e cainato (KA), que agregam no mesmo complexo protéico transmembranar, o sítio de ligação para glutamato e o canal iônico. Essa neurotransmissão é mais rápida, pois afeta diretamente o fluxo de íons e, conseqüentemente, o estado eletroquímico da membrana pós-sináptica (Ruggiero *et al.*, 2011). Nesse sentido, os agonistas de receptores ionotrópicos de glutamato apresentam potentes propriedades pró-convulsivantes e frequentemente são utilizados em modelos experimentais de epilepsia (Lasón, 2013).

A ativação de receptores NMDA requer a ligação simultânea de glutamato e glicina/D-serina, bem como a despolarização inicialmente mediada por AMPA ou KA para que ocorra a remoção dos íons Mg^{2+} , que bloqueiam os receptores NMDA quando o potencial de membrana está em repouso (Bowie, 2008). O glutamato se liga com maior afinidade aos receptores NMDA do que aos AMPA, e também a sua condutância a íons Ca^{2+} é maior que a de outros receptores ionotrópicos que conduzem cátions. Dados experimentais fornecem fortes evidências sobre o papel desses receptores na plasticidade neural, mas também em crises epiléticas e em danos neuronais. Em animais experimentais, os antagonistas NMDA, como por exemplo a Dizocilpina ou a Quetamina, inibem crises epiléticas induzidas por Pentilenotetrazol, Pilocarpina, máximo eletrochoque ou estimulação sensória. No entanto, ambos antagonistas NMDA, competitivos e não-competitivos, apresentaram sérios efeitos adversos em estudos

experimentais e clínicos, como prejuízos na coordenação motora e na memória, e desorientação (Rogawski, 2000; Smith, 2003).

Os receptores AMPA, que são responsáveis pela geração dos potenciais pós-sinápticos excitatórios rápidos no SNC, formam canais permeáveis a Na^+ , K^+ e, com limitações, a Ca^{2+} (Jonas *et al.*, 1994; Bowie, 2008). Em modelos de potenciação sináptica, um aumento no fluxo intracelular de íons Ca^{2+} dependente dos receptores NMDA pode levar à ativação de proteínas quinase, que se ligam à porção intracelular dos receptores, causando a fosforilação de algumas regiões (Yoshimura; Aoi; Yamauchi, 2000; Lisman; Zhabotinsky, 2001; Lisman; Schulman; Cline, 2002). Esta fosforilação dos AMPA, por sua vez, pode resultar em alterações na cinética e na inserção desses receptores na membrana sináptica. O processo da fosforilação também pode aumentar o fluxo de íon e levar a uma hiperatividade patológica da transmissão glutamatérgica e ao surgimento de descargas epiléticas, demonstrando a participação desses receptores no desenvolvimento das crises (Rakhade *et al.*, 2008; Rakhade *et al.*, 2012).

Posto isso, alguns estudos identificaram sinapses que são desprovidas de receptores AMPA mas possuem NMDA (Liao; Hessler; Malinow, 1995; Malenka; Nicoll, 1997). Um fato interessante é o de que a proporção de sinapses deficientes de receptores AMPA é maior em neonatos do que em adultos, sugerindo que a reorganização dos diferentes receptores ionotrópicos de glutamato é importante durante o desenvolvimento neuronal (Wu; Malinow; Cline, 1996; Xiao *et al.*, 2004; Bowie, 2008).

Com relação aos receptores KA, semelhantemente aos AMPA, são permeáveis aos íons Na^+ e K^+ e, em menor proporção, ao Ca^{2+} . Além disso, eles estão presentes em poucas sinapses e, portanto, são tidos mais como neuromoduladores no SNC (Lerma *et al.*, 2001; Pinehiro; Mulle, 2006). Apesar dos KA recombinantes exibirem uma rápida ativação e dessensibilização semelhante aos AMPA (Bowie; Lange, 2002), eventos sinápticos mediados por esses receptores nativos apresentam uma cinética lenta (Castillo; Malenka; Nicoll, 1997).

Os receptores KA são muito menos abundantes no tecido nervoso que os AMPA, mas sua ampla distribuição sugere que eles estejam presentes na maioria das células neuronais. A despolarização de longa duração de neurônios por receptores KA, localizados na membrana pós-sináptica, induz um fluxo intracelular de íons Ca^{2+} por canais voltagem dependentes (Ca_v), e esse efeito pode ser significativo na plasticidade

sináptica, mas também nos efeitos tóxicos e pró-convulsivantes do cainato (Bloss; Hunter, 2010; Vincent; Mulle, 2009). Tais efeitos de neurotoxicidade também podem ser associados à inibição pré-sináptica da liberação de GABA. Essa afirmação é corroborada pela observação de que o cainato reduz potenciais sinápticos inibitórios dependentes de GABA na região hipocampal de CA1.

O envolvimento desse receptor com a epilepsia foi comprovado a mais de três décadas, a partir da observação de que a injeção intracerebral ou sistêmica de ácido cáinico em ratos provoca crises convulsivas e descargas epileptiformes que se originam na formação hipocampal e propagam para outras estruturas límbicas (Nadler, 1981; Pinheiro; Mulle, 2006). Desde então, esse tem sido o principal composto químico utilizado em modelos animais para estudo da epilepsia do lobo temporal e tem proporcionado avanços nas pesquisas com epilepsias refratárias e na descoberta de novos compostos antiepilépticos.

Outro fator interessante é o de que receptores KA pré-sinápticos estão envolvidos com a indução da liberação de glutamato, uma vez que a ativação desses receptores aumenta a concentração de íons Ca^{2+} em sinaptossomas hipocampais (Lasón, 2013). Tais fatos sugerem que alguns moduladores seletivos de receptores KA podem ser considerados como potenciais fármacos antiepilépticos.

Da mesma forma, os antagonistas de receptores AMPA e KA revertem crises em modelos genéticos de epilepsia e crises induzidas quimicamente. Além do citado, oferecem vantagem, pois seus efeitos adversos na memória e na coordenação motora, em animais experimentais, são menos severos que os efeitos provocados pelos antagonistas de NMDA (Rogawski, 2011; Rogawski; Donevan, 1999).

Dentro do exposto, um exemplo importante a ser citado é o Topiramato, um fármaco que possui diversas atividades moleculares, como inibição de canais para Na^+ voltagem dependentes (Na_v), modulação de canais para Ca^{2+} e K^+ voltagem dependentes (Ca_v e K_v , respectivamente), modulação de receptores de glutamato e $GABA_A$, e inibição da anidrase carbônica (White, 2005). Dentre esse amplo espectro de ação, o Topiramato é um importante agonista seletivo de receptores glutamatérgicos do tipo kainato, e um potencial alvo, como já mencionado, quanto à redução da toxicidade causada pela ativação glutamatérgica prolongada por receptores NMDA (Kaminski *et al.*, 2004; Muir, 2006). O Topiramato é um fármaco eficaz no tratamento de crises epiléticas focais de

difícil tratamento, de crises tônico-clônico generalizadas primárias e da síndrome de Lennox-Gastaut (Latini *et al.*, 2008).

Além do Topiramato, outro potente fármaco antiepilético da terceira geração que também atua em receptor glutamatérgico é o Felbamato. Também apresenta um amplo espectro de ação, mas é reconhecido, principalmente, por seu mecanismo de antagonizar receptores do tipo NMDA, inibir efetivamente disparos epiléticos e preservar disparos neuronais normais (Kuo *et al.*, 2004). Entretanto, seu uso clínico passou a ser limitado para apenas algumas formas de epilepsia refratária e para a síndrome de Lennox-Gastaut em crianças, após o surgimento de sérios efeitos adversos pela produção de um metabólito reativo, como anemia aplástica e falência hepática (Perucca, 2005). Apesar destas sérias complicações, é um composto muito importante para ser descartado e por isso já existem fármacos criados a partir de modificações na estrutura química do Felbamato, que visam reduzir tais efeitos adversos, e estão em fases avançadas de testes clínicos (Landmark; Johannessen, 2008).

Em relação aos receptores do tipo metabotrópicos, estes são acoplados à proteína G e participam dos mecanismos de resposta intracelular através da ativação de segundos mensageiros. Desta forma, são responsáveis pela geração de respostas pós-sinápticas mais lentas (Pinheiro; Mulle, 2008). Eles formam uma família de 8 subtipos de receptores, divididos em 3 grupos com base na homologia das sequências e perfil dos segundos mensageiros acoplados (Gravius *et al.*, 2010). O grupo I compreende o mGluR1 e o mGluR5, acoplados à fosfolipase C. O grupo II consiste nos mGluR2 e mGluR3, enquanto os demais mGluR4, mGluR6, mGluR7 e mGluR8 formam o grupo III, estando ambos grupos negativamente acoplados à adenilatociclase (Conn; Pin, 1997).

Quando o glutamato se liga ao sítio ativo dos receptores do grupo I, uma resposta excitatória é desencadeada. Assim, a ativação e supra-regulação desses receptores pode embasar o desenvolvimento de focos epiléticos (Tang; Bradford; Ling, 2009). Além disso, há um aumento consistente na expressão de proteínas e RNAm de mGluRs do grupo I em estágios agudos durante crises límbicas em modelos animais (Camón *et al.*, 1998). Antagonistas de glutamato revertem crises induzidas quimicamente e eletricamente e sua administração periódica nos estágios iniciais de desenvolvimento das crises podem reverter a neurodegeneração e, possivelmente, prevenir a epileptogênese (Tang *et al.*, 2007). No entanto, controversamente, os agonistas do grupo II ou III de mGluRs também apresentam efeitos antiepiléticos (Moldrich *et al.*, 2003).

Apesar de tais descobertas, ainda não existem fármacos antiepilépticos eficazes e seletivos para mGluRs.

Além dos receptores ionotrópicos e metabotrópicos, os transportadores também fazem parte do sistema glutamatérgico e estão presentes tanto em neurônios quanto em astrócitos e promovem a captação de glutamato por volta de 10 a 75 ms após sua liberação, e, conseqüentemente, também estão relacionados à fisiopatologia da epilepsia. Até o momento, cinco tipos de transportadores de alta-afinidade foram identificados. Os três primeiros foram o GLAST e o GLT-1, isolados de cérebro de rato, e o EAAC1 do intestino de coelho (Kanai; Hediger, 1992; Pines *et al.*, 1992; Storck *et al.*, 1992). Em seguida, os transportadores cerebrais de humanos, homólogos aos identificados em animais, foram isolados e referidos como EAAT (*Excitatory Amino Acid Transporters*) 1, 2 e 3, respectivamente (Arriza *et al.*, 1994). Posteriormente, bibliotecas de cDNA de cerebelo humano e de retina levaram ao isolamento do EAAT4 (Fairman *et al.*, 1995) e do EAAT5 (Arriza *et al.*, 1997). Todas as 5 proteínas catalisam o transporte acoplado de Na⁺ e L-glutamato ou L- e D-aspartato (Danbolt, 2001).

Diversas pesquisas têm sido realizadas com o intuito de determinar a função dos transportadores de glutamato com relação ao desenvolvimento de patologias epilépticas. Um inibidor desse transporte, o treo-β-benziloxiaspartato (TBOA) é capaz de prolongar a atividade epileptiforme mesmo em baixas concentrações, pois mantém ativação sustentada dos receptores glutamatérgicos (Campbell; Hablitz, 2005). Além disso, camundongos nocaute para GLT-1 apresentam crises epilépticas letais, e animais nocaute para GLAST também apresentam alta susceptibilidade a crises, o que comprova a importância de uma captação de glutamato eficaz na prevenção de crises severas (Tanaka *et al.*, 1997; Ueda *et al.*, 2002).

Desta forma, os estudos experimentais têm cada vez mais reforçado a idéia de que a infra-regulação dos transportadores glutamatérgicos pode contribuir para diversos fenótipos de crises epilépticas, e a supra-regulação pode ser um mecanismo neuroprotetor compensatório, como demonstrado em diversos modelos animais de epilepsia (Sheldon; Robinson, 2007). Além disso, estudos também têm sugerido que alguns fármacos antiepilépticos que atuam em receptores gabaérgicos também apresentam efeitos nos transportadores de glutamato, como é o caso do Clobazam, da Zonisamida, da Carbamazepina e do Topiramato (Ueda *et al.*, 2003; Doi *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2005; Poulsen *et al.*, 2006). No entanto, a estratégia farmacológica de supra-

regulação dos transportadores glutamatérgicos deve ser considerada com cautela, pois um aumento generalizado na expressão desses transportadores pode provocar efeitos deletérios para outras desordens, como derrame (Sheldon; Robinson, 2007).

Neste contexto, devido ao papel crucial do glutamato na fisiologia do SNC e na fisiopatologia da epilepsia, bem como de outras desordens neurológicas, a busca por compostos com seletiva ação modulatória desse sistema representa uma via promissora para a intervenção terapêutica.

1.4. O GABA e a Epilepsia

O ácido γ -aminobutírico (GABA) é o neurotransmissor inibitório de maior prevalência no SNC de mamíferos. Foi identificado independentemente e teve sua presença no cérebro de vertebrados reportada por Roberts e Frankel e por Awapara e colaboradores, ambos em 1950. No entanto, apenas no início dos anos 70 comprovou-se que o GABA era capaz de satisfazer todos os critérios clássicos de um neurotransmissor (Krnjevic, 1974; Roberts, 1986).

O interesse crescente por esse sistema transmissor nas últimas décadas é explicado pela evidência do envolvimento direto ou indireto de sinapses gabaérgicas em neuropatologias e desordens psiquiátricas como, a doença de Huntington, a doença de Parkinson, a epilepsia, a discinesia tardia, a esquizofrenia, a ansiedade, a depressão maior e outras desordens comportamentais (Lloyd *et al.*, 1987; Wong *et al.*, 2003; Beleboni *et al.*, 2004; Coyle, 2004; Sanacora *et al.*, 2004). Os estudos do conhecimento do papel do GABA e do glutamato na epilepsia proporcionaram um grande avanço nos desenvolvimentos farmacêuticos. Desta forma, os potencializadores da transmissão gabaérgica compreendem um grande grupo de FAEs clássicos e de nova geração (Czuczwar; Patsalos, 2001).

O GABA é produzido no neurônio pela descarboxilação do glutamato, e após sua liberação, sua ação intrasináptica é rapidamente suprimida pela captação das células da glia e dos neurônios pré-sinápticos por transportadores gabaérgicos de alta afinidade (Lasón *et al.*, 2013). Existem 4 transportadores de GABA que são expressos no cérebro humano, denominados GAT-1, GAT-2, GAT-3 e BGT-1 (Transportador de GABA-Betaína) (Borden, 1996). O transportador glial e neuronal GAT-1 recebeu atenção particular por

participar predominantemente na captação do GABA e ser o alvo da Tiagabina, um fármaco antiepilético de alta eficiência (Schousboe; Madsen; White, 2011).

Após a captação, o GABA é catabolizado intracelularmente pela GABA transaminase, sendo que a inibição dessa enzima aumenta significativamente os níveis de GABA no tecido cerebral, e isto está relacionado a um aumento no limiar para o início das crises epiléticas (Sherif; Ahmed, 1995; Sills, 2003). Por este mecanismo de ação relatado atua a Vigabatrina, um inibidor irreversível da GABA transaminase, que possivelmente também está envolvida no transporte reverso do GABA por GAT-1 e GAT-3 (Sills, 2003; Mula, 2009).

Com relação aos receptores, a neurotransmissão gabaérgica pode ser dividida em componentes lentos e rápidos. O receptor GABA_B, metabotrópico, produz uma inibição lenta e duradoura uma vez que estão acoplados apenas indiretamente aos canais de Ca²⁺ e K⁺, via proteína G. Por outro lado, os receptores ionotrópicos GABA_A e GABA_C estão diretamente conectados a canais de Cl⁻, gerando uma resposta inibitória rápida (Hill; Bowery, 1981; Bormann, 2000). Os receptores GABA_C têm uma distribuição restrita, sendo encontrados apenas na retina, medula espinhal, colículo superior e trato intestinal, e são insensíveis aos Benzodiazepínicos, Barbitúricos, Neurosteróides, Muscimol e Bicuculina (para revisão ver Beleboni *et al.*, 2004).

Os amplos estudos que abrangem a farmacologia do complexo GABA_A têm levado a diversas estratégias para o tratamento de distúrbios neurológicos, incluindo a epilepsia. A ativação destes receptores no cérebro gera potenciais de inibição pós-sinápticos rápidos e, por isto, este complexo desempenha um papel central na prevenção e inibição de crises epiléticas (exceto as crises de ausência não convulsivas) (Depaulis *et al.*, 1997). Os antagonistas deste tipo de receptor (Bicuculina, Picrotoxina ou Pentilenotetrazol) pertencem à classe dos convulsivantes mais potentes, enquanto os agonistas ou moduladores positivos de GABA_A (Benzodiazepínicos, Barbitúricos, alguns Neurosteróides) inibem crises epiléticas tanto em modelos animais quanto em humanos (Lasón *et al.*, 2013).

Assim como o déficit na síntese de GABA ou a perda de interneurônios gabaérgicos, alterações na expressão ou mutações nas subunidades do receptor GABA_A podem levar a descargas neuronais patológicas. Sendo assim, prejuízos na transmissão gabaérgica contribuem para a susceptibilidade à ocorrência de crises observada em

vários modelos animais de epilepsia e em pacientes (Treiman, 2001; Galanopoulou, 2010; Pavlov *et al.*, 2011).

Em especial, tem sido reportado que o início e a manutenção da sincronia epileptiforme em fatias da formação hipocampal, paradoxalmente, dependem da atividade de receptores GABA_A (Avoli *et al.*, 2002). E assim, o envolvimento desses receptores na sincronia de redes neurais que conectam a formação hipocampal, os córtices, ou o complexo amigdalóide, pode ser importante na geração de crises límbicas recorrentes, características da epilepsia do lobo temporal (Avoli; de Curtis, 2011).

O papel central desempenhado pela transmissão gabaérgica na regulação das redes neurais, como um todo, justificam o grande interesse dado a esses receptores desde o início dos estudos sobre epilepsia, bem como ressaltam a importância de se realizar mais pesquisas que permitam um maior conhecimento sobre esse sistema transmissor. Além disso, a complexa estrutura molecular dos receptores gabaérgicos, sua expressão diferencial, distribuição e função também ressaltam a complexidade de sua regulação. Conseqüentemente, há muito trabalho a ser realizado a fim de gerar novas aplicações terapêuticas que explorem os aspectos específicos da heterogeneidade dos receptores gabaérgicos.

1.5. Compostos antiepilépticos isolados da peçonha de animais

O componente peptídico das peçonhas de Himenópteros sociais possui entre 600 e 7000 kDa e juntos compreendem até 70% da peçonha bruta liofilizada (Wemmer; Kallembach, 1982; Palma; de Souza, 2009). Estes compostos podem causar lise celular, hemólise, além de alguns possuírem efeitos neurotóxicos. Sendo assim, a forte predominância dos insetos e de outros Artrópodes pode ser, pelo menos em parte, atribuída à extraordinária diversidade de seus mecanismos químicos de defesa (Wemmer; Kallembach, 1982; Palma; de Souza, 2009). O aprimoramento, ao longo do tempo, das peçonhas e aparatos de inoculação dentro da classe Insecta representam atributos evolutivos que têm contribuído para a adaptação desses animais aos diferentes ambientes terrestres (Wemmer; Kallembach, 1982; Palma; de Souza, 2009).

Nos últimos anos, diversos compostos isolados da peçonha de artrópodes com atividade no SNC de mamíferos têm sido reportadas. Como exemplo, temos as poliaminas, isoladas da vespa solitária *Philanthus triangulum* e das aranhas *Nephila*

clavata e *Argiope trifasciata*, que atuam bloqueando de maneira não-competitiva canais catiônicos, principalmente, canais voltagem dependente associados a iGluRs, como os receptores AMPA e KA (Jones; Lodge, 1991; Karst *et al.*, 1994; Stromgaard; Mellor, 2004). Também foi descrito que poliaminas como a Argiotoxina, de *Argiope lobata*, e a Jorotoxina, de *Nephila clavata*, possuem atividades antiepilépticas em modelos animais agudos e crônicos (Green; Nakanish; Usherwood, 1996; Takazawa, 1996).

Posteriormente, uma família de peptídeos também com atividade antiepiléptica foi identificada na peçonha de aranhas do gênero *Agelenopsis*, as ω -agatoxinas (Uchitel, 1997). Em especial, ω -agatoxina IVA teve sua atividade descrita por Jackson e Scheideler (1996) em camundongos DBA/2, e os resultados mostraram um potente efeito antiepiléptico contra crises tônicas causadas por estimulação sonora de alta intensidade (para revisão ver Mortari *et al.*, 2007). Da mesma forma, neurotoxinas também foram isoladas da aranha *Phoneutria nigriventer*, e que atuam em canais iônicos ativados por voltagem de neurônios hipocâmpais de ratos e inibem a liberação de glutamato dependente de cálcio e o aumento na concentração de Ca^{2+} induzida por K^+ (Prado *et al.*, 1996; Mafra *et al.*, 1999; Reis *et al.*, 1999; de Figueiredo *et al.*, 2001; Pinheiro *et al.*, 2006).

As peçonhas das aranhas brasileiras *Scaptocosa raptoria* e *Parawixia bistrriata* também foram testadas em modelos de indução química de crises e protegeram contra PTZ, picrotoxina e bicuculina, e foram capazes de inibir a captação de GABA em sinaptossomas corticais de ratos (Cairrão *et al.*, 2002; Mortari *et al.*, 2007). Em seguida, o fracionamento dessas peçonhas por cromatografia líquida de alta eficiência levou a identificação de uma fração de *S. raptoria* (SrTx1.3) e duas neurotoxinas de *P. bistrriata* (Parawixin I e II) que influenciam a captação de GABA e de glutamato e de GABA/glicina, respectivamente (Fontana *et al.*, 2003; Mussi-Ribeiro *et al.*, 2004; Belebony *et al.*, 2006).

Diversas neurotoxinas que possuem ação no SNC de mamíferos ou de insetos também foram purificadas das peçonhas de escorpiões, inclusive com atividade antiepiléptica (Rochat *et al.*, 1979; Zhou *et al.*, 1989). O primeiro peptídeo com tal atividade foi isolado em 1989, por Zhou, da peçonha de *Buthus martensi* (BmK AEP) e atua em canais para Na^+ , apesar de não se saber ainda se esta ação é a responsável pelo efeito antiepiléptico (Wang *et al.*, 2001). Em 2003, Corona e colaboradores isolaram uma toxina do escorpião *Centruroides limpidus limpidus*, a Cll9, que em altas

concentrações também inibe correntes de Na⁺, além de causar um efeito comportamental e eletroencefalográfico depressor, bem como antagonizar a atividade epileptiforme induzida pelo tratamento com Penicilina (Corona *et al.*, 2003).

Em contraste, na peçonha do escorpião *Tityus serrulatus* foi encontrada uma toxina capaz de induzir efeitos que se parecem aos de *status epilepticus* induzidos por ácido caínico e pilocarpina, a TsTx (Sandoval; Lebrun, 2003). Esta neurotoxina se liga a canais para Na⁺ retardando ou impedindo sua inativação, e levando, conseqüentemente, a uma liberação massiva de neurotransmissores (Possani *et al.*, 1999; Nencioni; Lebrun; Dorce, 2003). Os autores também sugerem que a TsTx pode representar uma importante alternativa no estudo da epileptogênese e de compostos com atividade antiepiléptica, tendo em vista que os canais para Na⁺ exercem um importante papel na fisiopatologia da epilepsia (Sandoval; Lebrun, 2003).

Além das aranhas e dos escorpiões, alguns trabalhos também têm demonstrado o efeito neuroativo das peçonhas de vespas sociais. E assim como a TsTx, foi isolado recentemente o composto Polybiosida da peçonha de *Polybia paulista* identificado como um glicosídeo que quando administrado intracerebroventricular (icv) estimulou 11 regiões cerebrais, dentre elas o córtex piriforme, a formação hipocampal, alguns núcleos do hipotálamo e do tálamo, entre outros. Esta atividade foi mapeada pela expressão de proteína c-Fos, sendo que a formação hipocampal e o córtex piriforme foram mais intensamente marcados (Saidemberg *et al.*, 2010). Sabe-se que essas regiões apresentam fortes tendências a gerar eventos epileptiformes (Löscher; Ebert, 1996; Namvar *et al.*, 2008), o que foi corroborado pelo fato de os ratos apresentarem crises tônico-clônicas após 5 minutos da injeção icv. Além disso, demonstrou-se que a injeção periférica do composto induzia o mesmo comportamento, indicando que a Polybiosida é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica.

Por outro lado, em 2012, um trabalho de Couto e colaboradores avaliou o efeito antiepiléptico da fração de baixa massa molecular desta mesma vespa social, a *P. paulista*, no modelo de indução de crises por PTZ (Couto *et al.*, 2012). De modo semelhante, estudos com as peçonhas das vespas sociais *Polybia occidentalis* e *Polybia ignobilis* apresentaram atividade antiepiléptica no modelo de indução química de crises por bicuculina, picrotoxina e ácido caínico (Mortari *et al.*, 2005; Cunha *et al.*, 2005).

Posteriormente, foi isolado um dos compostos responsáveis pela atividade antiepiléptica da peçonha de *P. paulista*, o peptídeo inédito Ppnp7 que também

apresentou notável proteção contra crises no mesmo modelo (Couto, 2012). O composto foi testado em 3 doses (1,5, 3 e 4,5 µg/animal) com administração icv e apresentou um efeito dose-dependente. Dados mostraram que o peptídeo não apresenta similaridade com outros encontrados nesta peçonha, nem quanto à função, nem quanto à estrutura, podendo ser parte de um novo grupo de neuropeptídios (dados não publicados). Neste trabalho, também foram realizados testes para verificar possíveis alterações comportamentais e motoras induzidas pelo peptídeo e os resultados mostraram que ele não causa efeitos adversos nos testes de avaliação da exploração geral (campo aberto) e de descoordenação motora (Rotarod).

Desta forma, tais resultados fizeram do Ppnp7 um composto de interesse farmacológico, no que diz respeito ao desenvolvimento de novos medicamentos mais eficazes para o tratamento da epilepsia. Sendo assim, como objeto de estudo desse trabalho esse peptídeo, agora denominado Neuropolybina, e um análogo com modificações em sua sequência foram sintetizados, a fim de elucidar o potencial alvo farmacológico e entender melhor sua atividade antiepiléptica.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar a atividade antiepiléptica e o mecanismo de ação do peptídeo sintético Neuropolybina similar ao isolado da peçonha da vespa social *Polybia paulista* e de um análogo, bem como os efeitos adversos desses peptídeos.

2.2. Objetivos específicos

- Desenhar um novo peptídeo a partir da sequência primária do peptídeo antiepiléptico Neuropolybina.
- Avaliar a atividade antiepiléptica dos peptídeos no teste de indução aguda de crises, utilizando análise comportamental e eletroencefalográfica.
- Avaliar a atividade antiepiléptica no teste de indução aguda de crises após administração sistêmica dos peptídeos.
- Avaliar os efeitos adversos dos peptídeos, por meio do teste de campo aberto para determinar possíveis alterações na atividade geral espontânea.
- Determinar a ação dos compostos na captação e na ligação de [³H]-L-Glutamato a seus receptores e na ligação de [³H]-GABA, utilizando preparações sinaptossomais corticais de ratos.
- Analisar o perfil neurofarmacológico por curvas dose-efeito e tempo-efeito.

3. Metodologia

3.1. Síntese dos peptídeos

Após o contrato de sigilo, dois peptídeos foram sintetizados pela empresa Aminotech Desenvolvimento e Tecnologia Ltda com base na sequência do composto Neuropolybina (Ppnp7) isolado da vespa *Polybia paulista*, obtida por Couto (2012a). Um com a sequência idêntica ao composto natural e outro com modificações em sua sequência que visam tornar o peptídeo mais estável, que será citado a partir de agora como “modificado”.

Uma avaliação da pureza e da correta síntese dos peptídeos foi realizada por espectrometria de massa MALDI TOF/TOF UltraFlex II (*Bruker Daltonics*[®], Alemanha). Para isso, uma alíquota de cada peptídeo foi ressuspensa em água deionizada e misturada a uma matriz pronta de ácido α -ciano-4-hidroxi-cinâmico em acetonitrila/água deionizada/3% de ácido trifluoracético, 5/4/1, v/v/v, e posteriormente esta mistura foi aplicada em triplicata em uma placa Bruker MTP Massive 384. As aplicações secaram à temperatura ambiente e então foram analisadas.

O espectrômetro de massa estava equipado com laser *SmartBeam* e foi utilizado em dois modos de operação, o refletido positivo, para a obtenção de espectros de MS, e o LIFT, para a obtenção de espectros de MS/MS. A faixa de detecção da razão massa/carga (m/z) foi de 600 a 3000. A calibração foi realizada com a mistura *Peptide Calibration Standard I* (*Bruker Daltonics*[®], Alemanha). O *software* utilizado nestas análises foi o FlexControl 3.0.

Buscas por similaridades foram realizadas por meio do Fasta3 (disponível em <<http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fast3/>>) e do BLASTP (disponível em <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>).

3.2. Animais

Para avaliar a atividade dos peptídeos, foram realizados bioensaios com fêmeas de camundongos Swiss (*Mus Musculus*) e ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*).

A manipulação dos animais seguiu os princípios éticos do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e a Lei Arouca (Lei 11.794/2008). Além

disso, este projeto foi submetido a Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da UnB e deferido (UnBDOC nº 85152/2013 em anexo).

Os camundongos (20 a 30g) e ratos (300 a 350g) foram adquiridos do biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, acondicionados 4 por gaiola e mantidos no mesmo biotério com ciclo claro/escuro de 12/12 horas, temperatura (25 °C) e umidade (55%) controladas. Durante todo o período experimental os animais não foram privados de água e alimentação.

Ao todo foram utilizados 280 camundongos e 20 ratos, no entanto, para a análise estatística foram contabilizados apenas 114 camundongos e 13 ratos, sendo o restante descartado por motivos de erros experimentais.

3.3. Procedimentos estereotáxicos

Para os bioensaios de proteção contra crises epiléticas induzidas quimicamente e de campo aberto, a injeção do material de interesse foi feita via intracerebroventricular (icv). Para isto, foi necessária a realização de cirurgia estereotáxica em camundongos para implantação de uma cânula-guia no ventrículo cerebral lateral direito (Figura 3). Inicialmente, o animal foi anestesiado com Quetamina (Dopalen, *Ceva*®, 75 mg/kg, intraperitoneal - ip) e Xilazina (Anasedan, *Ceva*®, 15 mg/kg, ip) e depois fixado a um estereotáxico (Insight Equipamentos®). Após a devida assepsia com iodopovidona foi realizada a injeção local de cloridrato de lidocaína com hemitartarato de norepinefrina (Lidostesim® 3%, *Dentsply Pharmaceutical*®, sc). Em seguida, com o crânio do animal exposto foram realizadas as medições estereotáxicas para posicionamento da cânula no ventrículo lateral direito, a partir do ponto do Bregma (AP: -0,2 mm / ML: -1,0 mm / DV: -2,3 mm), de acordo com atlas específico de (Franklin e Paxinos, 1997). Juntamente com a cânula é implantado um parafuso, contralateralmente, a fim de equilibrar o peso desta e garantir maior fixação do acrílico dental. Por fim, a cânula é selada com um fio de aço inoxidável para evitar obstrução, sendo que esta consiste de um fragmento de 10 mm de uma agulha hipodérmica BD 0,70 x 25 mm 22G. Quatro dias depois deste procedimento, os camundongos foram submetidos aos bioensaios.

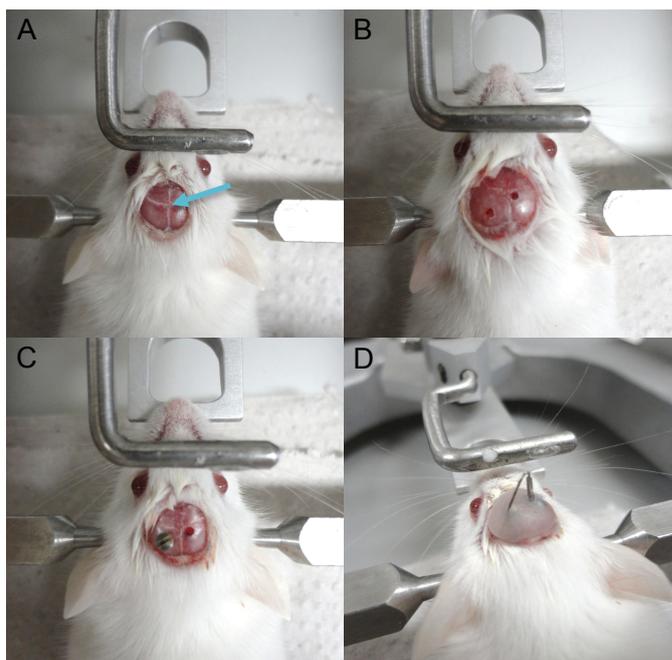


Figura 3. Etapas de implantação da cânula-guia no ventrículo lateral de um camundongo. (A) Exposição do crânio e marcação do ponto do bregma (seta azul). (B) Perfuração do crânio no local da cânula e do parafuso. (C) Implantação do parafuso. (D) Implantação da cânula, cobertura da região exposta com acrílico dental e obstrução da cânula com fio de aço inoxidável. Fotos: Juliana de Castro

3.4. Avaliação dos peptídeos no modelo de indução aguda de crises epilépticas

Para avaliar a atividade antiepiléptica, foram utilizados em camundongos dois modelos de indução aguda de crises, o modelo do Pentilenotetrazol (PTZ) e o modelo da Pilocarpina (Pilo), de acordo com a representação esquemática ilustrada na figura 4A e B, respectivamente. Para ambos testes, as doses testadas dos peptídeos foram 2,5, 1,25 e 0,4 nmol/animal para o peptídeo Neuropolybina e 3, 1,5 e 0,5 nmol/animal para o peptídeo modificado (em 2 μ L) (n=5 por grupo).



Figura 5. Foto de um camundongo no momento da injeção intracerebroventricular por meio de uma bomba de infusão. Foto: Juliana de Castro

Para ambos os modelos, foi considerado o grupo controle negativo, no qual foi injetado o veículo de solubilização dos peptídeos (2 μ L de água deionizada, icv) e o convulsivante 30 min depois. Para o teste com PTZ, houve ainda o grupo controle positivo, no qual foi feita a injeção do antiepiléptico convencional Diazepam (DZP, 4 mg/kg, ip) e o PTZ 30 min depois.

O efeito antiepiléptico foi observado por meio da porcentagem de proteção contra a crise de classe máxima bem como pela influência dos peptídeos na latência para essa primeira crise, quando observada. No caso do animal não apresentar crise, a latência foi considerada máxima (1800 s). Para a avaliação das crises foram utilizados o índice de Racine (1972) modificado por Lüttjohann e colaboradores (2009) para a indução por PTZ (Tabela 2), e o modificado por Shibley e Smith (2002) para o modelo de Pilocarpina (Tabela 3).

Tabela 2. Classificação das crises epiléticas induzidas por Pentilenotetrazol de acordo com o índice de Racine (1972), modificado por Lüttjohann e colaboradores (2009).

Classe	Manifestação do animal
1	Imobilidade e/ou redução comportamental súbita
2	Movimentos faciais com focinho ou com focinho e olhos
3	Movimentos do pescoço
4	Crises clônicas na posição sentada
5	Convulsões com crises clônicas e/ou tônico-clônicas na posição deitada e/ou crises tônicas
6	Convulsões com crises tônicas e/ou tônico-clônicas na posição deitada de lado e/ou saltos violentos

Tabela 3. Classificação das crises epiléticas induzidas por Pilocarpina de acordo com o índice de Racine (1972), modificado por Shibley e Smith (2002).

Classe	Manifestação do animal
1 e 2	Automatismos faciais, enrijecimento da cauda, tremores
3	Crises tônico-clônicas pouco intensas marcadas por mioclonias unilaterais dos membros anteriores
4	Crises mioclônicas bilaterais dos membros anteriores com elevações
5	Crises mioclônicas bilaterais dos membros anteriores e posteriores com perda transitória do controle postural (Crise generalizada)

3.5. Avaliação do efeito da administração sistêmica dos peptídeos no modelo de indução aguda de crises epiléticas

A fim de avaliar se os compostos são eficazes em atravessar a barreira hematoencefálica, foi realizado um teste para verificar se há manutenção do efeito antiepilético após a injeção sistêmica dos peptídeos (400 nmol/animal, ip), 30 min antes da administração do PTZ (95 mg/kg, sc) para indução das crises. Também foi utilizado DZP (4 mg/kg; 2100 nmol/animal, ip) como controle positivo, injetado 30 min antes do convulsivante.

Do mesmo modo, os animais foram filmados em uma arena circular por 30 min, e foi avaliada a presença de crises máximas e o tempo de latência para a primeira crise.

3.6. Procedimento estereotáxico para os registros eletroencefalográficos

Este procedimento cirúrgico consiste da implantação de seis eletrodos, um plugue conector e a cânula-guia em ratos Wistar machos. O procedimento inicial é o mesmo descrito anteriormente. A cânula foi posicionada de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (1986), segundo as seguintes coordenadas: AP: -0,8mm / ML: -1,6mm / DV: -3,7mm. Todos os eletrodos foram posicionados no córtex: os dois primeiros na região pré-frontal, os dois do meio na região parietal e os dois últimos na região occipital, de maneira que todos distem 4mm um do outro na direção antero-posterior e 8mm na direção meso-lateral (Figura 6). Os eletrodos constituem-se de um parafuso estéril com um fio de aço inoxidável (Figura 7A) e foram acoplados aos fios de um plugue conector (Figura 7B) fixado acima do crânio do animal comacrílico dental.

No dia do bioensaio, quatro dias após a neurocirurgia, o rato foi conectado ao dispositivo que obtém os registros eletroencefalográficos (Figura 8). O equipamento utilizado para os registros foi adquirido da empresa *Pinnacle Technologies*[®] e os plugues e eletrodos foram adaptados do sistema original e confeccionados no laboratório.

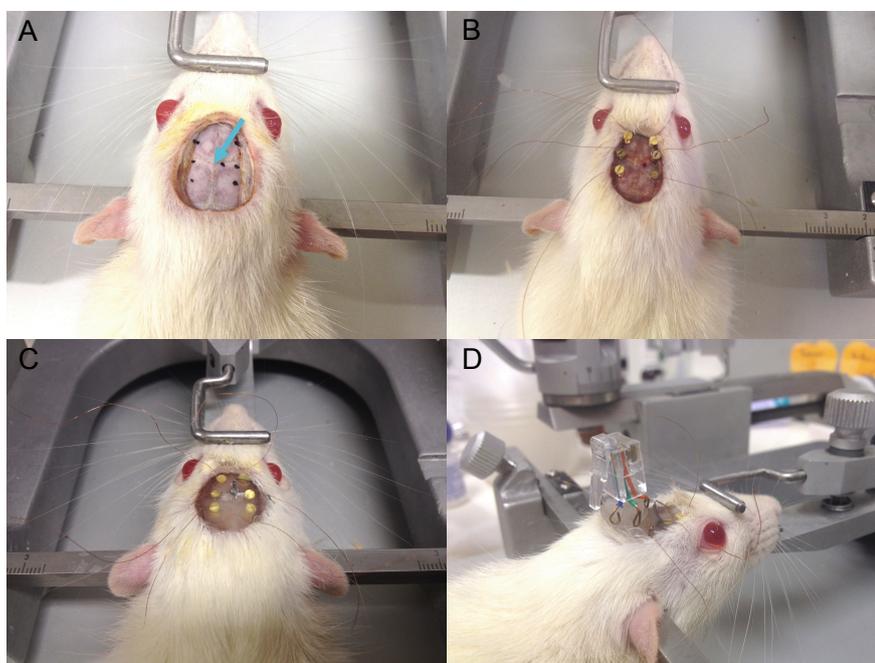


Figura 6. Etapas do procedimento estereotáxico para os registros eletroencefalográficos em rato. (A) Exposição do crânio e marcação dos pontos de implantação dos eletrodos e da cânula a partir do ponto do bregma (seta azul). (B) Implantação dos três pares de eletrodos. (C) Implantação da cânula e cobertura da região exposta comacrílico dental. (D) Acoplamento do plugue conector com os eletrodos. Fotos: Juliana de Castro



Figura 7. Eletrodos (A) e plugue conector (B) para registros eletroencefalográficos. Fonte: (A) www.pinnaclet.com; (B) Foto: Juliana de Castro

3.7. Avaliação vídeo-eletroencefalográfica

As observações comportamentais e o EEG foram feitos usando um sistema de monitoramento de vídeo-EEG da empresa *Pinnacle Technologies*[®] (Figura 8), que permite associar o comportamento exibido pelo animal ao perfil eletroencefalográfico. O registro de cada canal do eletroencefalograma foi realizado tomando-se a diferença de potencial entre dois eletrodos. Dos seis eletrodos, quatro são das áreas corticais monitoradas, um eletrodo de referência e um que minimiza a interferência dos movimentos.

Para a avaliação dos registros eletroencefalográficos, os animais foram conectados ao EEG e foi feito o registro da linha basal por 30 min (n=5 por grupo). Em seguida a dose efetiva que protegeu 50% dos animais contra crises induzidas em ratos (DE₅₀; 3 nmol/animal), encontrada por Couto (2012), de um dos peptídeos sintéticos, ou veículo, foram injetados por via icv (taxa de infusão: 1,7 μ L/min). Após 15 min os animais receberam uma injeção do convulsivante químico PTZ (105 mg/kg, sc). Imediatamente após esta última injeção, o EEG foi registrado continuamente por 1 hora.

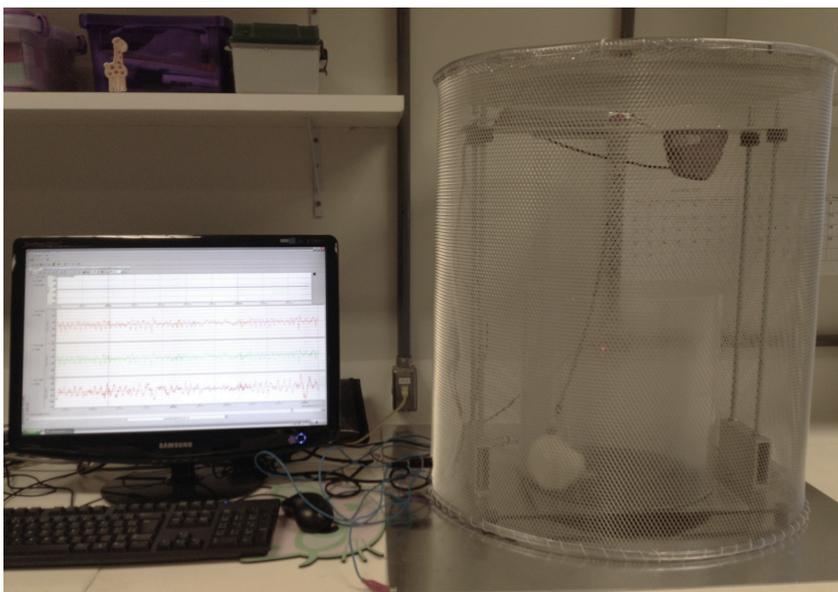


Figura 8. Foto demonstrativa de um experimento de registro vídeo-eletroencefalográfico. Foto: Juliana de Castro

Cada arquivo de EEG foi analisado manualmente a fim de comparar o registro eletroencefalográfico e o comportamental, a latência para o início da primeira crise epiléptica máxima e a classificação das crises. Para a análise comportamental também foi utilizado, o índice de Racine (1972) modificado por Lüttjohann e colaboradores (2009).

3.8. Avaliação de alterações na atividade geral espontânea

Este teste foi utilizado para verificar possíveis alterações na atividade geral espontânea de camundongos após a administração icv dos peptídeos, em grupos independentes, nas doses de 2,5 e 25 nmol /animal para Neuropolybina e 3 e 30 nmol/animal para o modificado (n=4-5 por grupo). O ensaio consiste na avaliação do comportamento do animal em uma arena circular de acrílico de 60cm de diâmetro e 50cm de altura, dividida em 12 quadrantes (Figura 9), após 30 min da injeção icv dos compostos.



Figura 9. Arena utilizada para o teste do campo aberto (Insight®). Fonte: www.insightltda.com.br

Os camundongos foram filmados por 20 min e foram contabilizados manualmente o tempo total e o tempo acumulado, em intervalos de 5 min, gastos por cada animal nos comportamentos de exploração, imobilidade, autolimpeza e elevação (modificados a partir de Speller e Westby, 1996), de acordo com a tabela 4. A análise dos vídeos foi feita por apenas um observador que também foi o experimentador, com o auxílio do software X-Plo-Rat 2005, versão 1.1.0.

Foram considerados ainda, dois grupos controles, veículo (2 μ L de água deionizada, icv), e o Diazepam (4 mg/kg, ip), injetados também 30 min antes do início do teste.

Tabela 4. Descrição dos comportamentos considerados no bioensaio do campo aberto (modificados a partir de Speller; Westby, 1996).

Comportamento	Atitude do animal
Imobilidade	Ficar imóvel
Exploratório	Cheirar, caminhar
Autolimpeza	Limpar focinho, patas anteriores ou posteriores, genitais, cauda, cabeça, dorso, ventre
Elevação	Permanecer equilibrado nas duas patas posteriores, apoiado ou não nas paredes da arena

3.9. Verificação da posição da cânula-guia

A verificação da correta implantação da cânula-guia foi feita a partir da injeção via icv de azul de metileno (Anachemia®). Após os bioensaios, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ e tiveram seus cérebros retirados e armazenados, por dois dias, em solução de formaldeído 4% (Merck®). Posteriormente, a análise foi feita manualmente após um corte no local de inserção da cânula, a fim de verificar se o corante azul se difundiu por todo o ventrículo.

3.10. Avaliação da citotoxicidade dos peptídeos

Para avaliar a atividade hemolítica dos peptídeos foram testadas 6 concentrações dos peptídeos, obtidas por diluição seriada (1,5 a 50 nmol/poço), em uma suspensão a 4% de eritrócitos de camundongos preparada de acordo com o protocolo de Rangel (1997). Os compostos foram incubados a temperatura ambiente (aproximadamente 22 °C) com a solução de suspensão em tubos de 1,5mL. Após 1h foram centrifugados a 2300 xg por 5 min e o sobrenadante foi aplicado em placa de 96 poços para posterior leitura em leitor de placas Multiskan FC (*Thermo Scientific*®) a 540 nm. A hemólise total foi obtida com 1% de Triton X-100 e o controle sem hemólise foi feito com adição da solução fisiológica de Krebs-Henseleit (NaCl 113mM; KH₂PO₄ 1,2mM; KCl 4mM; MgSO₄ 1,2 mM; CaCl₂ 2,5 mM; NaHCO₃ 25 mM; glicose 11,1 mM), que também foi o veículo para a solubilização dos peptídeos.

3.11. Potenciais alvos farmacológicos

3.11.1. Preparação e obtenção dos sinaptossomas para o ensaio de captação de [³H]-L-Glutamato

A preparação sinaptossomal foi realizada segundo o método descrito por Gray & Whittaker (1962), modificado por Coutinho-Netto (1980), utilizando-se de córtices cerebrais de ratos Wistar machos (200-250g). Os animais foram sacrificados, decapitados e tiveram seus cérebros removidos imediatamente. Foram dissecadas as

metades corticais e rapidamente imersas em solução de sacarose 0,32 M, a fim de se obter concentração de 10% (m/v), mantidas em banho de gelo durante todo o experimento. Os córtices foram homogeneizados a 900 rpm em homogeneizador *Potter-Elvehjen* (*Labo-Stirrer LS-50; Yamato®*; "Clearance" de 0,25 mm).

Em seguida, o homogeneizado obtido foi centrifugado a 1700 xg por 10 min a 4°C, o sobrenadante coletado e novamente centrifugado a 21200 xg, por 20 min a 4°C. Nesta etapa descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi ressuspensionado em tampão Krebs-fosfato (NaCl 124mM; KCl 5mM; KH₂PO₄ 1,2mM; CaCl₂ 0,75 mM; MgSO₄ 1,2 mM; Na₂HPO₄ 20mM; glicose 10mM), pH 7,4; e centrifugado por 10 min a 21200 xg a 4°C. Essa última etapa foi repetida 5 vezes a fim de lavar o precipitado para remoção de neurotransmissores endógenos, sempre descartando o sobrenadante, adicionando o tampão e ressuspensionando. Após a última centrifugação, os sinaptossomas foram homogeneizados em Potter e prosseguiu-se para a dosagem de proteínas pelo método de Lowry *et al.* (1951) modificado por Hartree (1972). A partir daí, os sinaptossomas foram utilizados para os ensaios de captação ou para a produção de membranas sinaptossomais que servirão aos experimentos de ligação.

3.11.2. Ensaio de captação de [³H]-L-Glutamato

Foram realizados 3 experimentos independentes em triplicata, em tubos de 2mL, na presença ou ausência de 5 diferentes concentrações, diluídas em série, de cada peptídeo sintético (0,0001 a 1 nmol, concentrações finais), além dos respectivos controles. Cada tubo com volume final de 0,5 mL continha em concentrações finais: sinaptossomas (0,25 mg de proteínas/mL), tampão Krebs-fosfato (pH 7,4) e [³H]-L-Glutamato (10 nM), de acordo com os volumes detalhados na tabela 5. Todos os tubos foram submetidos à incubação a 37°C por 3 minutos, e a escolha desse tempo bem como da concentração do substrato radioativo e de sinaptossomas foi feita de modo que os parâmetros permanecessem dentro da porção linear da curva de captação, como definido por experimentos prévios (Fontana *et al.*, 2003; Beleboni *et al.*, 2006).

Tabela 5. Distribuição do volume de cada tubo utilizado no ensaio de captação de [³H]-L-Glutamato.

μL/tubo	1-3	4-6	7-9	10-12	13-15	16-18	19-21	22-24	25-27	28-30
[³ H]-L-Glu (μL)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Glu frio (μL)	--	10	--	--	--	--	--	--	--	--
Natural (μL)	--	--	10	10	10	10	--	--	--	--
Modificado (μL)	--	--	--	--	--	--	10	10	10	10
Krebs-fosfato	190	180	180	180	180	180	180	180	180	180
Sinaptossoma	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
Volume total:	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500

Imediatamente após a incubação, os tubos foram centrifugados por 3 minutos a 20500 xg a 4°C, a fim de cessar a atividade de recaptação. Descartou-se o sobrenadante, os precipitados foram lavados em água destilada gelada e acrescidos de 0,5 mL de metanol. Após a ressuspensão, 1 mL de líquido de cintilação biodegradável (*Fisher*[®]) foi adicionado. O controle positivo foi representado pelo glutamato não marcado (frio; concentração final de 1mM) e o negativo por volume suficiente de tampão para completar o volume final.

A radioatividade foi determinada em cintilador líquido, com 2% de erro e eficiência de contagem para o [³H] de aproximadamente 35 a 40%. As contagens por minuto (CPM) geradas pelo cintilador foram transformadas e tratadas como porcentagens dos controles. O material radioativo foi adquirido junto à *GE Healthcare*[®] (Licença do Laboratório de Ofício 1381/08 e Licença Pessoal AP 1175), com atividade de 52,0 Ci/mmol.

O esquema resumido da metodologia utilizada nos estudos de captação está representado na figura 10.



Figura 10. Representação esquemática da metodologia utilizada para o ensaio de captação de $[^3\text{H}]$ -L-Glutamato em sinaptossomas corticais de ratos. Fonte: Modificado de Fachim (2009).

3.11.3. Preparação das membranas sinápticas para o ensaio de ligação a receptores de $[^3\text{H}]$ -L-Glutamato e $[^3\text{H}]$ -GABA

Foram utilizados córtex cerebrais de ratos Wistar machos (200-250g) para a preparação das membranas como descrito por Zukin e colaboradores (1974). Os animais foram sacrificados, decapitados e tiveram as metades corticais dissecadas da mesma maneira descrita para preparação de sinaptossomas. Os córtices foram imediatamente transferidos para um béquer com sacarose 0,32 M em uma proporção de 10% (m/v), em seguida foram homogeneizados a 900 rpm em homogeneizador *Potter-Elhvejen, Labo-Stirrer LS-50 da Yamato*[®] ("Clearance" de 0,25 mm). O homogeneizado foi centrifugado a 1700 xg por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante coletado foi novamente centrifugado a 21200 xg, por 20 minutos, a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado e lavado repetidamente em 10 mL de Tris-HCl 5 mM (pH 7,4), com centrifugações de 21200 xg a 4°C por 10 min. Sendo posteriormente homogeneizado em Potter (900 rpm) e mantido em banho de gelo sob

agitação suave por 30 minutos e, centrifugado a 22500 xg, por 5 minutos a 4°C. O precipitado foi, então, ressuspensionado em 10 mL de Tris-HCl 50mM (pH 7,4), com o intuito de romper as membranas e expor os receptores. E, prosseguiu-se para a dosagem de proteínas pelo método de Lowry *et al.* (1951) modificado por Hartree (1972).

As membranas assim obtidas foram aliqüotadas em tubos de 1,5 mL, de tal forma que cada um apresentasse 8 mg de proteína, centrifugadas a 22500 xg por 5 minutos a 4°C. Em seguida, permaneceram estocadas a -20°C, por no mínimo 18 horas.

O fluxograma ilustrando a metodologia resumida deste ensaio está representado na figura 11.



Figura 11. Representação esquemática da metodologia para o ensaio de ligação de $[^3\text{H}]$ -L-Glutamato e $[^3\text{H}]$ -GABA em sinaptossomas corticais de ratos. Fonte: Modificado de Fachim (2009).

3.11.4. Ensaio de ligação de [³H]-L-Glutamato e [³H]-GABA em membranas sinápticas

Iniciou-se o experimento com o descongelamento da preparação membranar, repetidas lavagens com tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) e centrifugações a 20500 xg por 5 minutos a 4°C. Após a última centrifugação as membranas foram ressuspensas em 2,8 mL de tampão Tris-HCl 50 mM, a fim de que a concentração final de proteína ficasse entre 0,5 e 1mg/mL, faixa considerada adequada para realização do experimento. A reação, então, foi iniciada a partir da adição de 10nM de [³H]-L-Glutamato ou 5nM de [³H]-GABA e tampão à suspensão de membranas, na presença ou ausência de 5 diferentes concentrações dos peptídeos, diluídas em série, (0,01 a 100 nmol, concentrações finais), em um volume final de 0,5 mL por tubo, semelhante ao ensaio de captação (Tabela 5).

Seguiu-se para incubação, de todos os tubos, a 37°C para o [³H]-L-Glutamato, e 25°C para o [³H]-GABA, por 30 minutos sob agitação. Para finalizar a reação de ligação foi realizada uma centrifugação a 20500 xg, por 5 minutos, à 4°C. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados lavados em água destilada gelada e acrescidos de 0,2 mL de Tris-HCl 50 mM, ressuspensos e em seguida acrescidos de 1 mL de líquido de cintilação biodegradável (*Fisher*[®]).

Foram realizados 3 experimentos e cada um em triplicata. A radioatividade foi determinada em cintilador líquido, com 2% de erro e eficiência de contagem para o [³H] de aproximadamente 35 a 40%. Da mesma forma, as contagens obtidas foram transformadas como porcentagens dos controles, após descontos dos valores de ligação inespecífica, acessados pelo glutamato não marcado (frio, 1mM, concentração final). Os materiais radioativos foram os mesmos dos experimentos de captação.

A preparação das membranas, dos sinaptossomas e os ensaios de captação e ligação foram realizados no laboratório do Prof. Dr. Renê de Oliveira Beleboni (Unidade de Biotecnologia, Universidade de Ribeirão Preto, UNAERP), com o auxílio da Dra. Helene A. Fachim e da Ms. Silmara A. Faggion.

3.12. Análises estatísticas

A análise estatística dos resultados foi feita por meio do *software* GraphPad Prism® 4.0 (San Diego, CA, USA). O teste ANOVA de uma via foi utilizado para verificar a significância dos tempos de latência para o início das crises máximas induzidas por PTZ e Pilocarpina, tanto no teste comportamental quanto eletroencefalográfico, bem como a significância dos tempos totais gastos pelos animais nos quatro comportamentos considerados no bioensaio do campo aberto e a dos resultados obtidos nos ensaios de neuroquímica, de captação e ligação. No caso de significância na interação tratamento-versus-tempo, os testes ANOVA de uma via foram seguidos pelo teste de Tukey.

Os valores de DE₅₀ para os peptídeos Neuropolybina e modificado foram definidos como a que protegeu 50% dos animais no teste de indução aguda de crises por PTZ, e foram calculados por regressão não-linear sigmoidal.

Nos ensaios de vídeo-EEG, para análise da porcentagem de proteção contra crises induzidas por PTZ foi utilizado o teste do Qui-quadrado seguido pelo teste exato de Fisher.

Por fim, para os tempos acumulados gastos nos quatro comportamentos avaliados no teste do campo aberto foram utilizados ANOVAs de duas vias de medidas repetitivas e o pós-teste de Bonferroni.

4. Resultados

4.1. Síntese, pureza e modificações dos peptídeos

Neste trabalho foram avaliados dois compostos sintéticos, um com uma sequência idêntica ao natural e outro modificado. O peptídeo Neuropolybina isolado da vespa *Polybia paulista* apresenta uma massa molecular de 1203,34 Da e sequência de aminoácidos: Pyr-Gln-Trp-Gln-Pro-Gln-Leu-His-Arg-OH. Tal composto foi sintetizado pela empresa Aminotech e submetido à espectrometria de massa MALDI TOF/TOF para verificação da correta síntese e índice de pureza, e à cromatografia líquida de alta eficiência.

Juntamente com este composto, foi sintetizado outro peptídeo análogo com algumas alterações na sequência que visaram garantir maior eficiência na passagem do peptídeo pela barreira hematoencefálica. Desta forma, as modificações consistiram na redução do composto em dois resíduos de aminoácidos, a glutamina e a leucina nas posições 6 e 7, respectivamente, bem como a amidação da região C-terminal, a fim de garantir uma maior estabilidade à molécula. De maneira que a sequência final do peptídeo modificado ficou como: Pyr-Gln-Trp-Gln-Pro-His-Arg-NH₂ e massa molecular 961,84 Da.

Ambos os compostos foram sintetizados com pureza >99%, e os espectros de massa fornecidos pela empresa encontram-se nos anexos 2 e 3.

4.2. Posição da cânula-guia

A posição da cânula-guia e o local de injeção foram verificados em todos os animais dos grupos experimentais logo após os bioensaios, sendo contabilizados para a análise estatística somente os resultados dos animais nos quais a cânula estava corretamente inserida no ventrículo cerebral lateral direito (Figura 12).

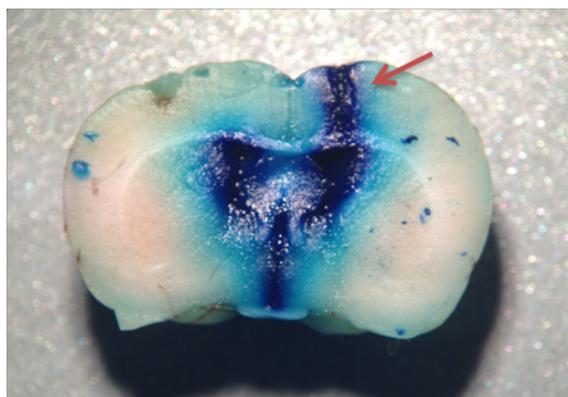


Figura 12. Foto de um corte do cérebro de um camundongo mostrando que a cânula foi corretamente implantada no ventrículo cerebral lateral direito. O corante foi injetado em apenas um lado do ventrículo, no entanto toda a estrutura foi corada. A seta vermelha indica a marca da cânula. Foto: Juliana de Castro

4.3. Avaliação da atividade antiepiléptica

Os resultados obtidos quanto à proteção contra a crise epiléptica máxima induzida por PTZ nos bioensaios com os dois peptídeos sintéticos, Neuropolybina e o análogo modificado, estão representados na figura 13. No grupo controle veículo, todos os animais apresentaram crise máxima e o tempo de latência para esta primeira crise foi de 300 segundos, em média, enquanto que no grupo controle DZP nenhum animal apresentou crise de score máximo e, portanto, a latência foi considerada máxima (1800 s). Com relação aos peptídeos, a Neuropolybina protegeu 100% dos animais na dose de 2,5 nmol, 80% na dose intermediária e 20% na menor dose, e o valor obtido no cálculo da DE_{50} foi de 0,69 nmol. O composto modificado alcançou apenas 80% de proteção na dose máxima, 40% na dose de 1,5 nmol e 20% na dose de 0,5 nmol, e o valor da DE_{50} foi 1,58 nmol.

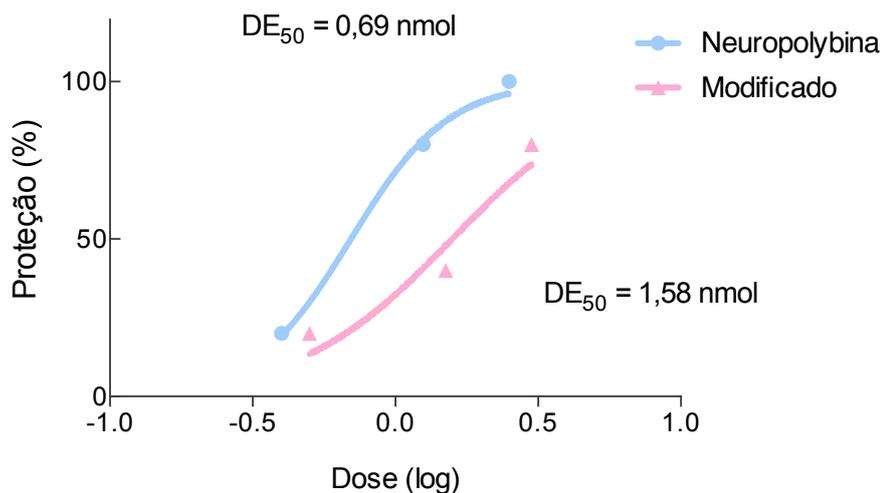


Figura 13. Curva de porcentagem de proteção contra a crise epilética máxima induzida pelo PTZ nas três diferentes doses dos peptídeos Neuropolybina e modificado, representadas em log da dose (n=5). Para o cálculo da DE_{50} foi utilizada regressão não-linear sigmoidal.

Em relação a latência para o início das crises, ambos os peptídeos produziram um efeito dose-dependente (Figura 14). O peptídeo Neuropolybina nas doses de 2,5 nmol e 1,25 nmol, assim como o DZP, apresentou diferenças significativas com relação ao grupo veículo ($p < 0,001$), e com a dose menor de 0,4 nmol com $p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente (Figura 14A) [$F_{(4,20)} = 16,01$; $p < 0,001$].

Com relação ao peptídeo modificado, não houve diferenças significativas entre as doses testadas na latência para o início das crises, apenas entre o grupo DZP e 3 nmol com relação ao grupo veículo ($p < 0,01$), e, entre a dose de 0,5 nmol e o DZP ($p < 0,05$) (Figura 14B). [$F_{(4,20)} = 6,998$; $p < 0,001$].

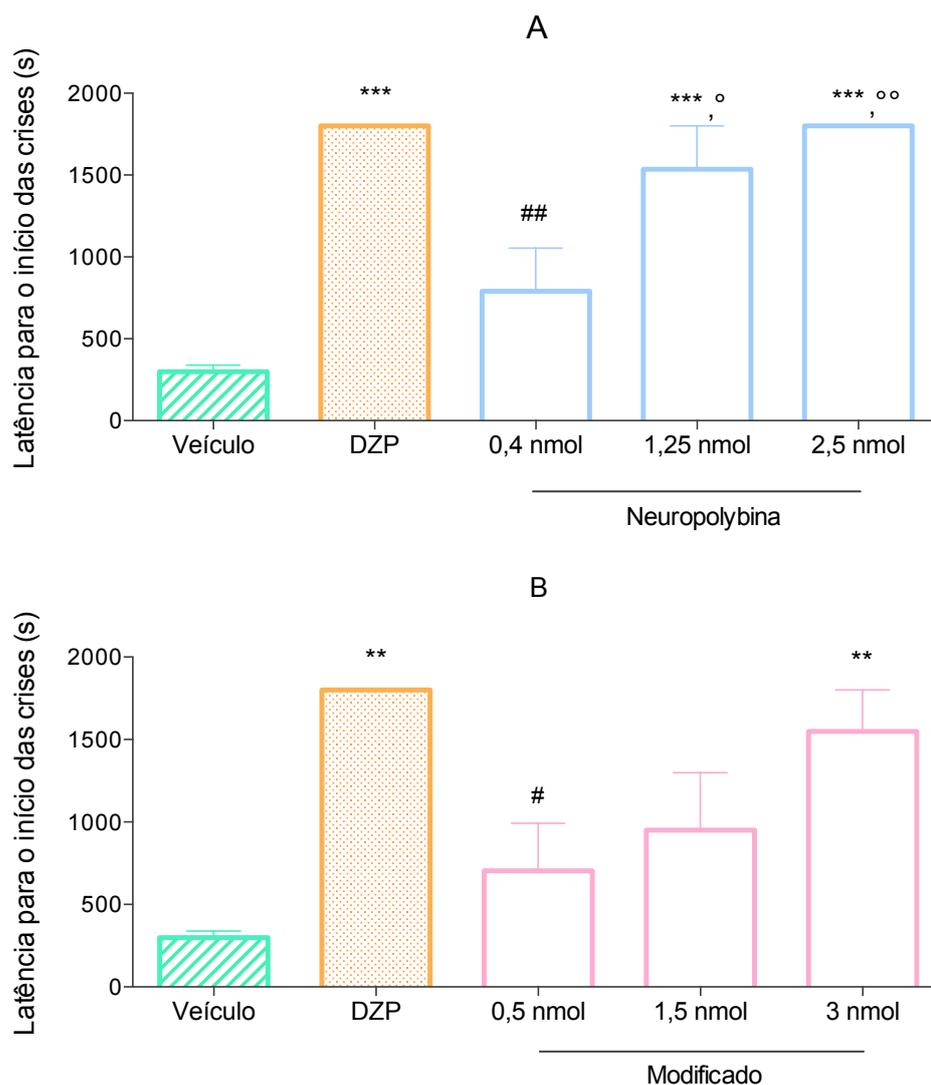


Figura 14. Latência para o início da crise máxima induzida por PTZ, em segundos, nos grupos controles e experimentais (n=5) após administração icv de Neuropolybina, nas doses 0,4 nmol, 1,25 nmol e 2,5 nmol/animal (A), e seu análogo modificado, nas doses 0,5 nmol, 1,5 nmol, 3 nmol (B). Os testes estatísticos utilizados foram ANOVA de uma via e pós teste de Tukey. **p<0,01 e ***p<0,001 comparado ao grupo veículo; #p<0,05 e ##p<0,01 comparado ao grupo DZP; °p<0,05 e °°p<0,01 comparado ao grupo 0,4 nmol.

Para os testes de proteção contra crises induzidas por Pilocarpina, não foi observada atividade antiepiléptica com os peptídeos testados (Figura 15). Diferenças significativas não ocorreram entre as latências dos grupos tratados com o peptídeo Neuropolybina e o grupo veículo [$F_{(3,15)} = 3,239$; $p > 0,05$]. Da mesma forma, o tratamento com o peptídeo modificado também não apresentou diferenças significativas com relação ao grupo veículo e nem entre as doses [$F_{(3,14)} = 2,734$; $p > 0,05$].

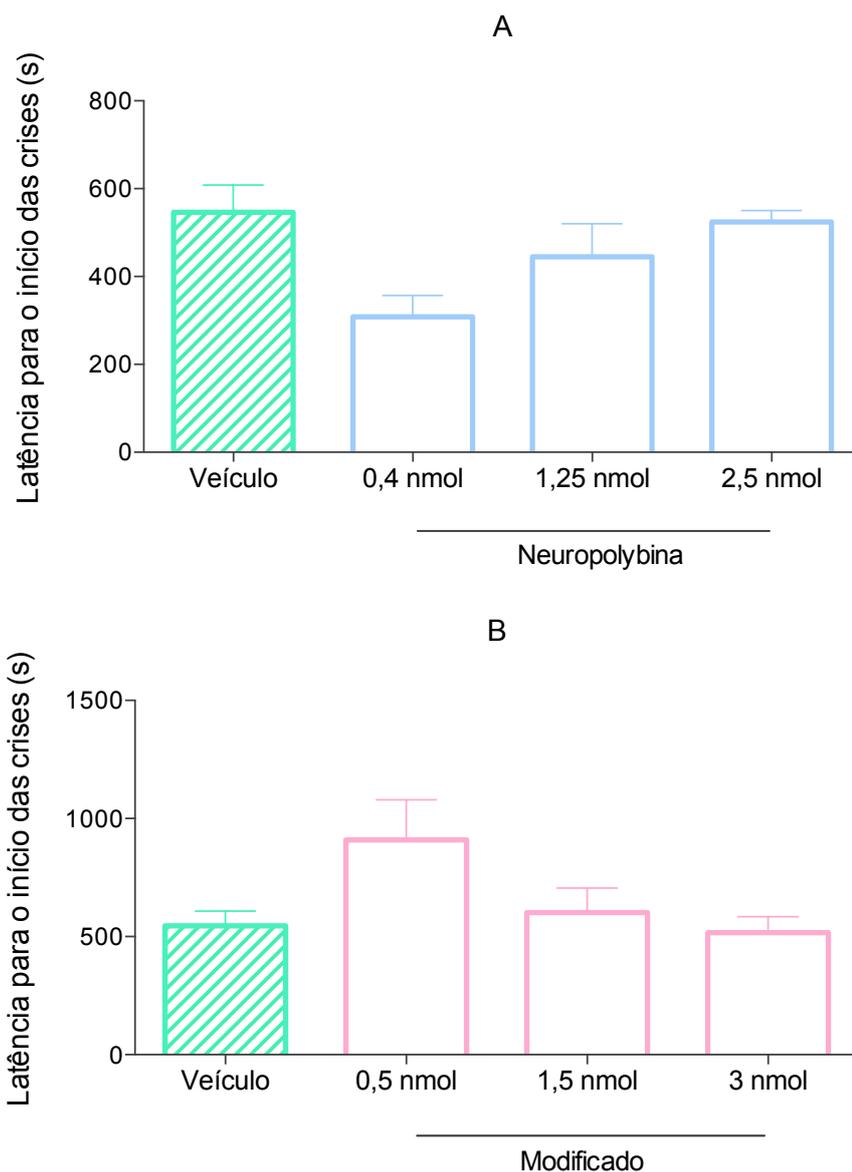


Figura 15. Latência para o início da crise máxima induzida por Pilocarpina, em segundos, nos grupos veículo e experimentais (n=4-5) após administração icv de Neuropolybina, nas doses 0,4 nmol, 1,25 nmol e 2,5 nmol/animal (A), e seu análogo modificado, nas doses 0,5 nmol, 1,5 nmol, 3 nmol (B). O teste estatístico utilizado foi ANOVA de uma via.

4.4. Avaliação da atividade antiepiléptica após administração sistêmica dos peptídeos

As latências para o início das crises induzidas por PTZ em camundongos pré-tratados com veículo ou um dos dois peptídeos sintéticos, por via ip, não foram diferentes entre si, no entanto, apresentaram diferença significativa com relação ao grupo controle positivo DZP com $p < 0,001$ (Figura 16) [$F_{(3,16)} = 453,1; p < 0,001$].

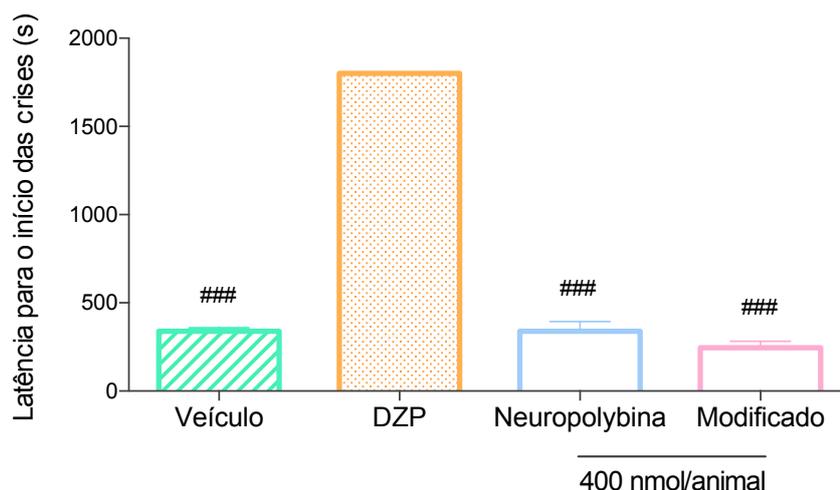


Figura 16. Latência para o início da crise máxima induzida por PTZ, em segundos, nos grupos controles e experimentais (n=5) após administração ip de Neuropolybina e seu análogo modificado (400 nmol/animal). Os testes estatísticos realizados foram ANOVA de uma via e Tukey. ###p<0,001 comparado ao grupo DZP.

4.5. Avaliação vídeo-eletroencefalográfica

Nos testes de proteção contra crises induzidas por PTZ com acompanhamento eletroencefalográfico observou-se que a latência para o início da crise eletroencefalográfica foi concomitante a da crise comportamental. Também foi observado que a dose testada do peptídeo Neuropolybina (3 nmol/animal) foi capaz de aumentar significativamente a latência para o início das crises máximas ($p < 0,05$), ao contrário do modificado, como ilustra a figura 17 [$F_{(2,10)} = 4,088$; $p > 0,05$]. A porcentagem de proteção contra crises também foi significativamente maior em relação ao veículo e ao modificado ($p < 0,001$), sendo de 80% para o Neuropolybina e 40% para o modificado (Figura 18) [$\chi^2 = 133,3$; $p < 0,001$]. Além disso, ambos os peptídeos foram capazes de reduzir a severidade das crises epiléticas, classificadas pelo índice de Racine, como mostra a figura 19 [$F_{(2,10)} = 1,082$; $p > 0,05$].

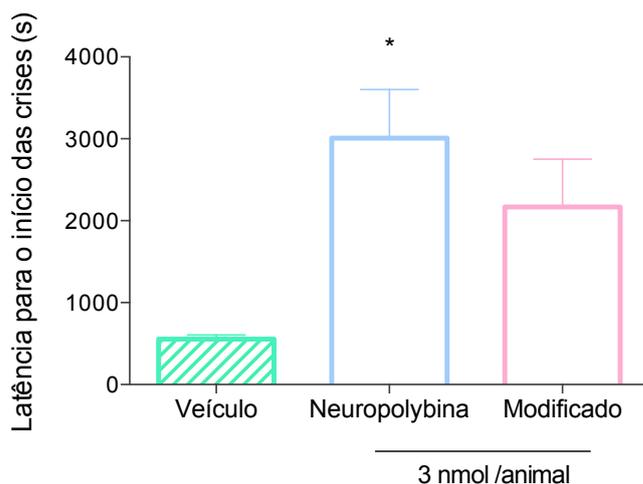


Figura 17. Latência para o início da crise eletroencefalográfica e comportamental máxima induzida por PTZ, em segundos, no grupo controle veículo e nos grupos tratados com os peptídeos Neuropolybina e modificado na dose de 3 nmol/animal (n=4-5). Os testes estatísticos realizados foram ANOVA de uma via e Tukey. * $p < 0,05$ com relação ao grupo veículo.

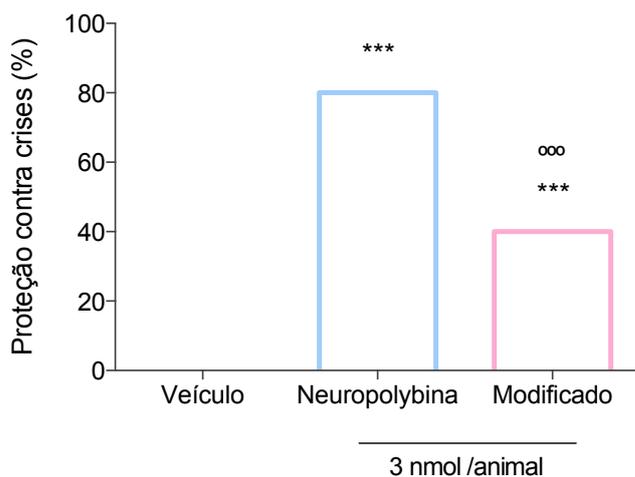


Figura 18. Porcentagem de proteção contra crises máximas induzidas por PTZ, em ratos, nos grupos tratados com os peptídeos Neuropolybina e modificado na dose de 3 nmol/animal e no grupo veículo (n=4-5). Os testes estatísticos realizados foram Qui-quadrado e pós-teste de Fisher. *** $p < 0,001$ em relação ao grupo veículo; ^{ooo} $p < 0,001$ em relação ao Neuropolybina.

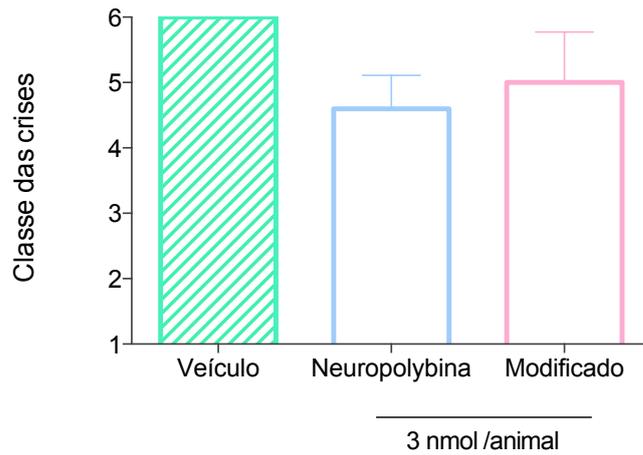


Figura 19. Classificação segundo o índice de Racine das crises epilépticas induzidas por PTZ em animais do grupo veículo e dos grupos experimentais tratados com Neuropolybina e o peptídeo modificado (3 nmol/animal; n=4-5). O teste estatístico utilizado foi ANOVA de uma via.

Na crise generalizada, além da sincronia dos disparos nos três canais de registro, podemos observar que as crises mioclônicas comportamentais ocorreram em paralelo com a presença de espículas (*Spikes*) no registro eletroencefalográfico. E, posteriormente, com o agravamento das crises e a transição de mioclonias para crises tônico-clônicas também observamos a mudança no padrão de registro para complexos de espícula-onda (*Spike-wave*) e de polispícula-onda (*Polyspike-wave*) (Figura 20). As figuras 21 e 22 mostram registros eletroencefalográficos de uma crise generalizada e de uma crise focal induzidas por PTZ em ratos.

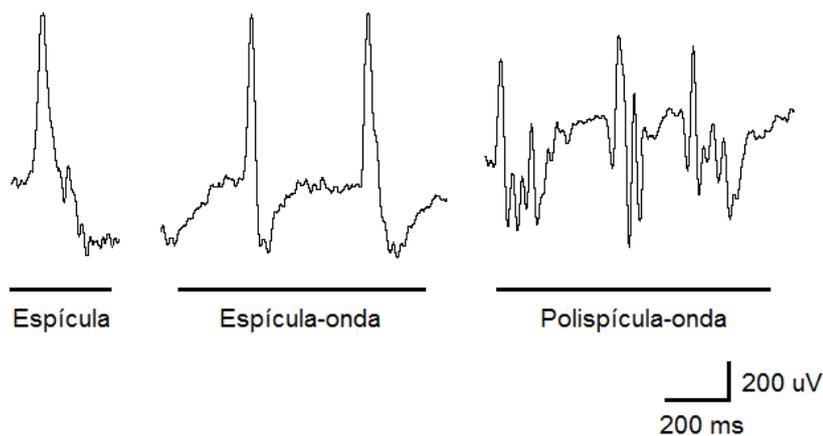


Figura 20. Representação esquemática dos diferentes tipos de ondas observadas durante os registros eletroencefalográficos de crises epilépticas induzidas por PTZ.

O sinal do registro eletroencefalográfico foi caracterizado como normal quando a amplitude e a frequência eram similares às do registro da linha de base de cada animal. As espículas foram consideradas como surtos isolados e transitórios de ondas claramente distinguíveis da atividade de fundo por sua forma e alta amplitude, e ocorrência de menos de um evento por segundo. Já as crises epiléticas foram reconhecidas como eventos de duração maior que cinco segundos de atividade sustentada de alta frequência e alta amplitude.

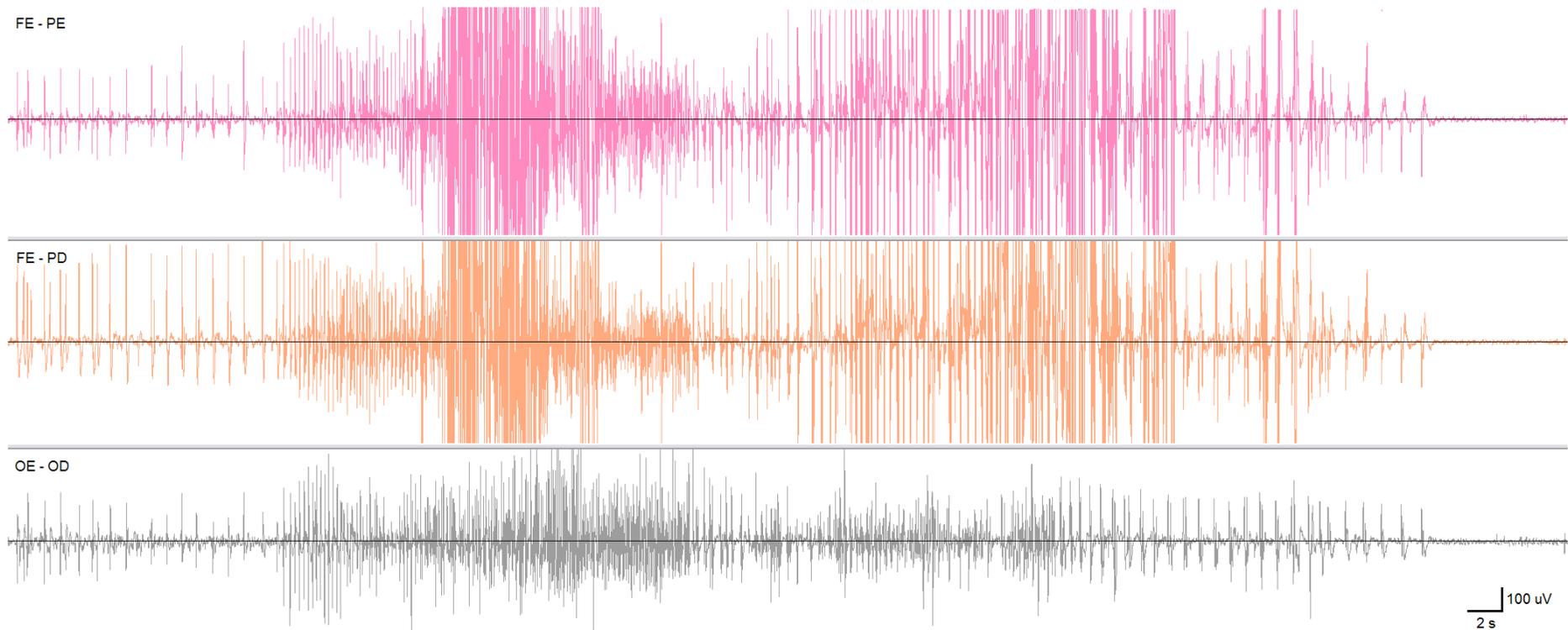
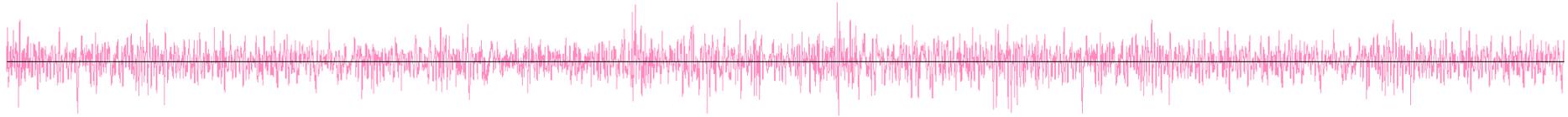
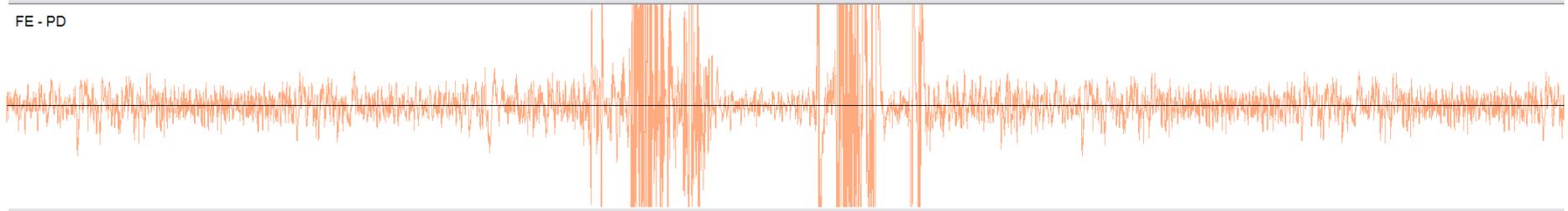


Figura 21. Registro eletroencefalográfico representativo de uma crise generalizada induzida por PTZ em rato, mostrando a sincronia dos disparos nos três pares de eletrodos implantados corticalmente. FE, córtex frontal esquerdo; FD, córtex frontal direito; PE, córtex parietal esquerdo; PD, córtex parietal direito; OE, córtex occipital esquerdo; OD, córtex occipital direito.

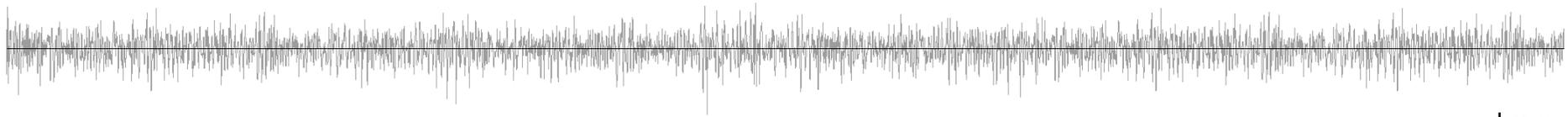
FE - PE



FE - PD



OE - OD



100 μ V
2 s

Figura 22. Registro eletroencefalográfico representativo de uma crise focal induzida por PTZ em rato, mostrando que o aumento na intensidade do registro acontece apenas no 2º canal de registro. FE, córtex frontal esquerdo; FD, córtex frontal direito; PE, córtex parietal esquerdo; PD, córtex parietal direito; OE, córtex occipital esquerdo; OD, córtex occipital direito.

4.6. Possíveis efeitos na atividade geral espontânea

Na avaliação de possíveis efeitos dos peptídeos na atividade geral espontânea dos camundongos no modelo do campo aberto, observou-se que nas doses testadas, equivalente à dose máxima do teste de proteção e uma dose 10 vezes maior, os peptídeos não mostraram alteração nos comportamentos exploração e imobilidade (Figura 23A e B). Além disso, o DZP apresentou seu clássico efeito sedativo na dose antiepiléptica. Houve diferença significativa entre o grupo DZP e todos os outros grupos na avaliação do tempo total gasto nos comportamentos imobilidade [$F_{(5,23)} = 28,53$; $p < 0,001$] e exploratório [$F_{(5,23)} = 10,84$; $p < 0,001$].

Quanto ao comportamento de autolimpeza uma redução foi observada no grupo do DZP e na maior dose do modificado (Figura 23C). Foram observadas diferenças significativas entre o grupo veículo e os grupos DZP e a dose de 30 nmol do peptídeo modificado ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente), e entre o grupo de 3 nmol do mesmo composto e o DZP ($p < 0,05$) [$F_{(5,21)} = 4,913$; $p < 0,01$].

Com relação à elevação, apenas a dose maior do modificado apresentou aumento no tempo total de elevação (Figura 23D). Foram observadas diferenças significativas entre o grupo veículo e a dose de 30 nmol do modificado ($p < 0,01$), entre o DZP e as doses de 25 nmol do Neuropolybina e 30 nmol do modificado ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente) e entre as doses do peptídeo modificado ($p < 0,01$) [$F_{(5,23)} = 10,29$; $p < 0,001$].

A fim de observar possíveis alterações no comportamento durante os 20 minutos de bioensaio do campo aberto, os tempos totais dos quatro comportamentos avaliados foram divididos em intervalos de 5 minutos para uma análise mais detalhada (Figura 24).

Para o comportamento de imobilidade ao longo do tempo, o MANOVA de medidas repetitivas revelaram diferenças em relação ao tratamento [$F_{(5,22)} = 14,77$; $p < 0,001$], ao tempo [$F_{(4,88)} = 6,887$; $p < 0,001$] e à interação entre os dois [$F_{(20,88)} = 3,390$; $p < 0,001$]. Diferenças significativas foram observadas entre o grupo DZP e todos os outros grupos nos tempos de 5 a 15 min ($p < 0,001$) (Figura 24A). Com 20 min de experimento foram observadas diferenças entre o tratamento com Neuropolybina e o DZP ($p < 0,01$ para a dose de 2,5 nmol e $p < 0,001$ para a dose de 25 nmol), entre o tratamento com o modificado e o DZP ($p < 0,001$) e entre o grupo veículo e a dose de 30

nmol do modificado ($p < 0,05$). Enquanto os animais do grupo DZP permaneceram imóveis durante todo o período experimental, os animais dos outros grupos começaram a realizar esse comportamento apenas nos 5 min finais, com exceção do grupo de 30 nmol do modificado que foi o único a apresentar diferença com relação ao veículo ($p < 0,05$).

Quanto ao comportamento exploratório, também foram observadas diferenças em relação ao tratamento [$F_{(5,22)} = 16,91$; $p < 0,001$], ao tempo [$F_{(4,88)} = 139,3$; $p < 0,001$] e à interação entre os dois [$F_{(20,88)} = 3,803$; $p < 0,001$]. Durante todo o período experimental todos os grupos foram diferentes do DZP ($p < 0,001$ e $p < 0,05$ para o grupo veículo no tempo de 20 min) (Figura 24B).

No comportamento de autolimpeza, o MANOVA também mostrou diferenças em relação ao tratamento [$p < 0,05$; $F_{(5,20)} = 3,698$], ao tempo [$p < 0,001$; $F_{(4,80)} = 13,21$] mas não em relação à interação entre os dois [$p > 0,05$; $F_{(20,80)} = 1,309$] (Figura 24C). Diferenças significativas entre os grupos foram observadas apenas a partir do tempo de 15 min, entre DZP e veículo ($p < 0,001$), entre o veículo e as duas doses de Neuropolybina ($p < 0,01$) e entre o grupo veículo e a dose de 30 nmol do modificado ($p < 0,01$). No tempo de 20 min, a dose maior do modificado reduziu o tempo do animal nesse comportamento em relação à menor dose ($p < 0,05$).

Por fim, para o comportamento de elevação, MANOVAS de medidas repetitivas também revelaram diferenças estatísticas com relação ao tratamento [$F_{(5,22)} = 9,452$; $p < 0,001$], ao tempo [$F_{(4,88)} = 46,89$; $p < 0,001$] e à interação [$F_{(20,88)} = 5,781$; $p < 0,001$] (Figura 24D). Observou-se diferenças significativas no tempo de 5 min entre a maior dose do modificado e os grupos veículo ($p < 0,05$), DZP ($p < 0,001$) e dose de 3 nmol ($p < 0,01$). No tempo de 10 min, houve diferenças entre o grupo veículo e a dose de 30 nmol do modificado ($p < 0,05$), entre o DZP e as doses maiores dos dois peptídeos ($p < 0,001$) e entre os dois grupos do modificado ($p < 0,001$). No tempo de 15 min observou-se diferenças entre o grupo veículo e a maior dose de Neuropolybina ($p < 0,01$) e do modificado ($p < 0,001$), entre o DZP e essas mesmas doses ($p < 0,001$) e entre as doses de 3 e 30 nmol do modificado ($p < 0,01$). Com 20 min de experimento a diferença entre a maior dose do modificado e o veículo se manteve ($p < 0,001$), da mesma forma entre o DZP e as doses de 25 nmol de Neuropolybina ($p < 0,01$) e 30 nmol do modificado ($p < 0,001$), mas também foram diferentes o grupo DZP da dose menor do modificado ($p < 0,05$), e as doses do modificado entre si ($p < 0,01$).

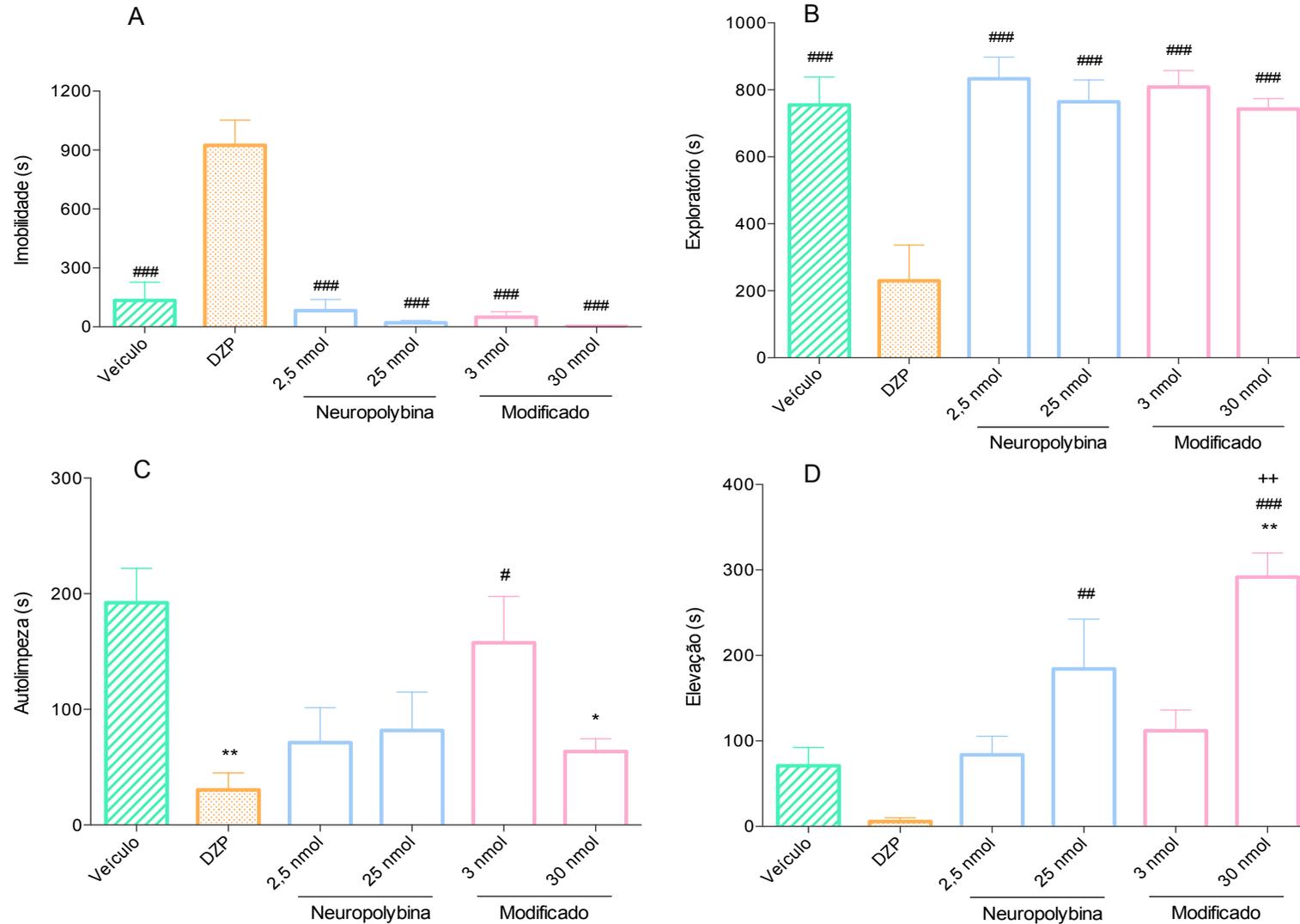


Figura 23. Tempo total, em segundos, gasto pelos camundongos (n=4-5) nos comportamentos (A) imobilidade, (B) exploratório, (C) autolimpeza e (D) elevação no teste do campo aberto após a injeção dos peptídeos Neuropolybina e modificado. As análises estatísticas realizadas foram ANOVA de uma via e Tukey. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo veículo; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ comparado ao grupo DZP; ++ $p < 0,01$ comparado a dose de 3 nmol do peptídeo modificado.

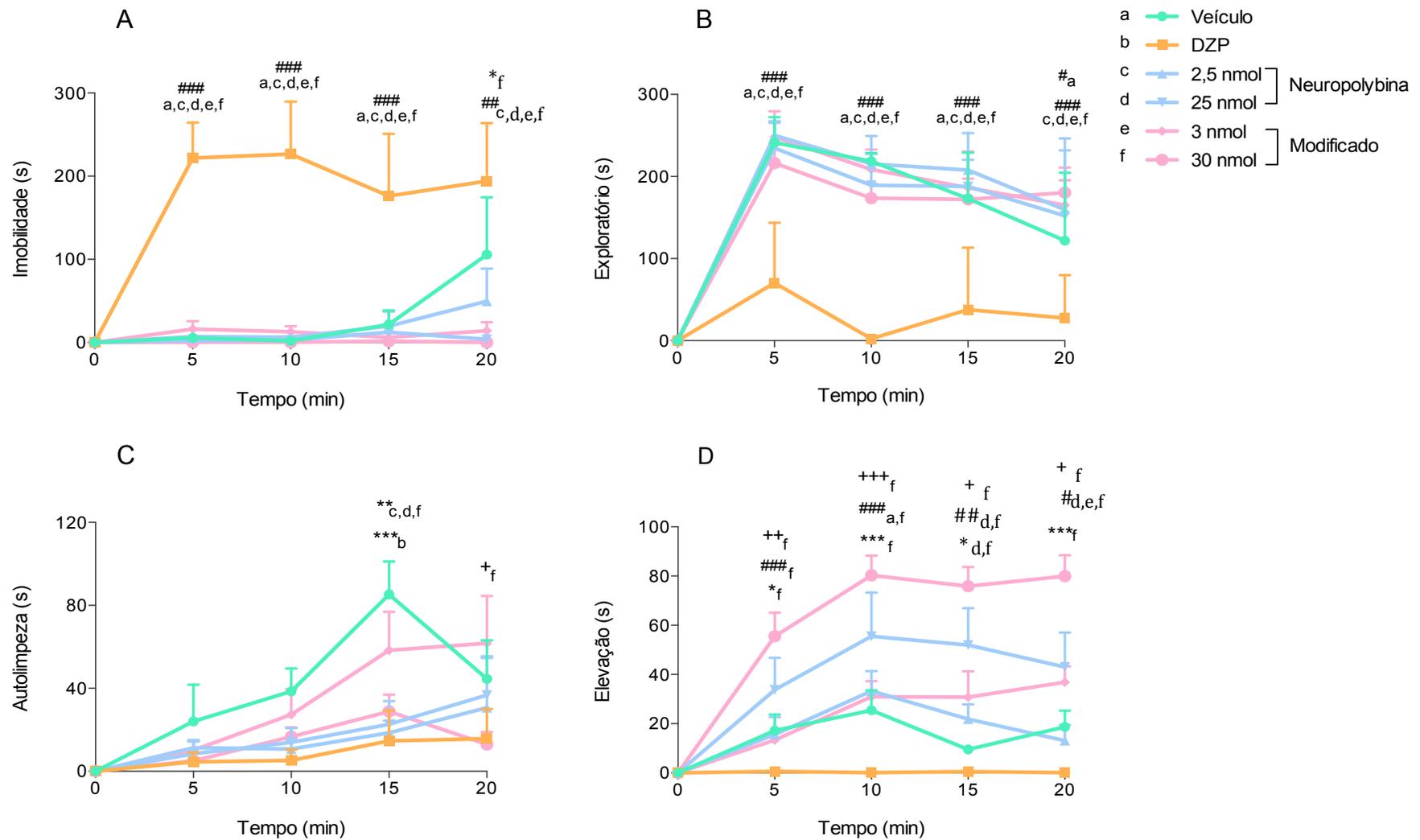


Figura 24. Distribuição do tempo gasto, em segundos, pelos camundongos (n=4-5) nos comportamentos (A) imobilidade, (B) exploratório, (C) autolimpeza e (D) elevação, em períodos de 5 min, no teste do campo aberto após a injeção dos peptídeos Neuropolybina e modificado. Os testes estatísticos realizados foram MANOVA de medidas repetitivas e Bonferroni. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 quando comparado ao grupo veículo; #p<0,05, ##p<0,01 e ###p<0,001 comparado ao grupo DZP; +p<0,05, ++p<0,01 e +++p<0,001 comparado à dose de 3 nmol do modificado. As letras representam em qual grupo está a diferença estatística, a) veículo, b) DZP c) Neuropolybina 2,5 nmol, d) Neuropolybina 25 nmol, e) modificado 3 nmol e f) modificado 30 nmol.

4.7. Citotoxicidade dos peptídeos

Os peptídeos sintéticos Neuropolybina e modificado não foram hemolíticos em nenhuma das seis concentrações testadas (1,5 – 50 nmol/poço) em solução de eritrócitos de camundongos (Dados não mostrados).

4.8. Potenciais alvos farmacológicos

4.8.1. Efeito dos peptídeos sobre captação de $[^3\text{H}]$ -Glutamato

Os resultados representados na figura 25 mostram que nenhum dos dois peptídeos sintéticos nas concentrações testadas tiveram efeitos sobre a captação de $[^3\text{H}]$ -L-Glutamato em sinaptossomas corticais de ratos [$F_{(10,22)} = 1,523$; $p > 0,05$].

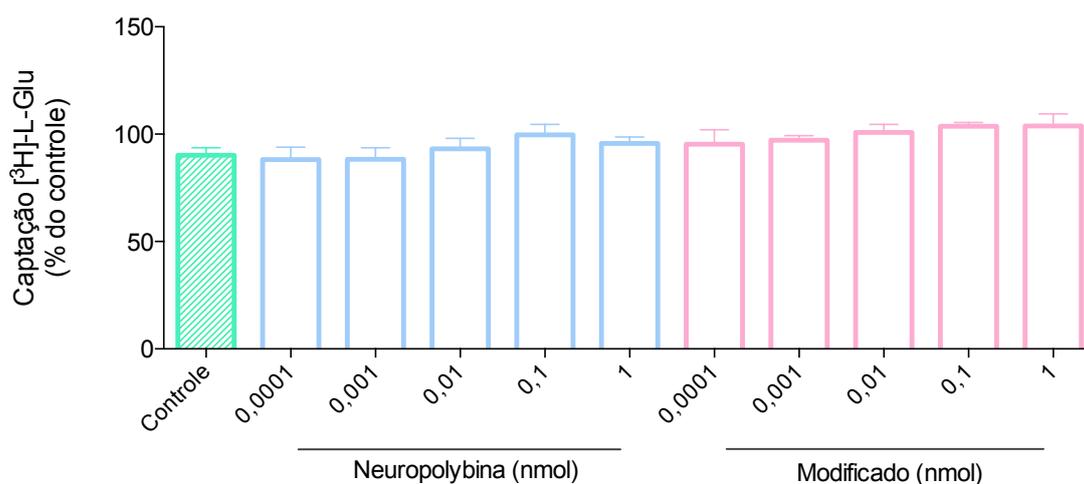


Figura 25. Histograma mostrando os efeitos de concentrações crescentes de Neuropolybina e seu análogo modificado (0,0001 a 1 nmol) na captação de $[^3\text{H}]$ -L-Glutamato. Os dados são apresentados em porcentagem do controle como média \pm EPM de 3 experimentos em triplicata. O teste estatístico realizado foi ANOVA de uma via.

4.8.2. Efeito dos peptídeos sobre a ligação a receptores de $[^3\text{H}]$ -L-Glutamato e $[^3\text{H}]$ -GABA

A ligação de $[^3\text{H}]$ -L-Glutamato na presença de concentrações crescentes do peptídeo Neuropolybina e de seu análogo modificado não apresentou diferenças estatísticas significantes, o que pode ser observado na figura 26 [$F_{(10,33)} = 0,3536$;

$p > 0,05$]. Da mesma forma, a ligação de $[^3\text{H}]$ -GABA também não foi alterada pelos peptídeos testados como mostra a figura 27 [$F_{(10,33)} = 1,274$; $p > 0,05$].

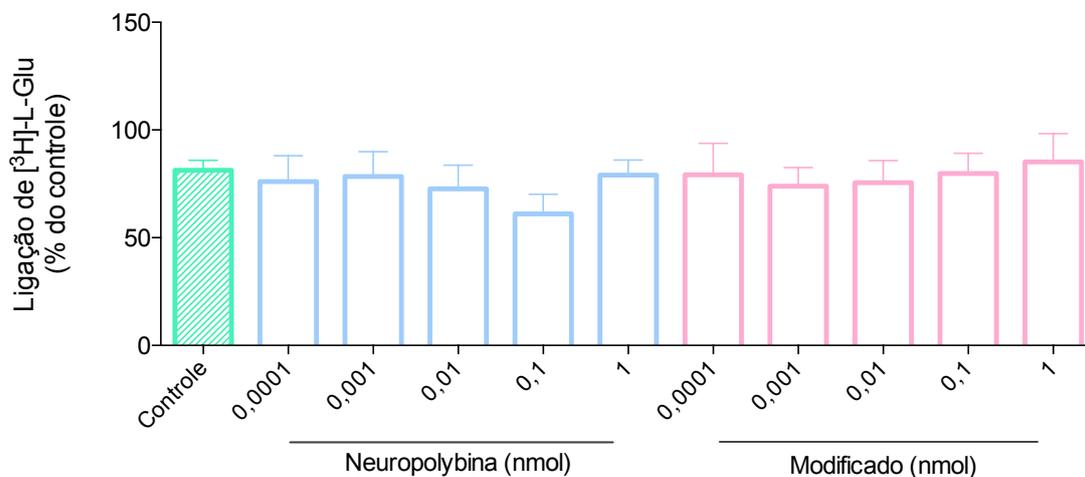


Figura 26. Histograma mostrando os efeitos de concentrações crescentes de Neuropolybina e seu análogo modificado (0,0001 a 1 nmol) na ligação de $[^3\text{H}]$ -L-Glutamato a seus receptores. Os dados são apresentados em porcentagem do controle como média \pm EPM de 3 experimentos em triplicata. O teste estatístico realizado foi ANOVA de uma via.

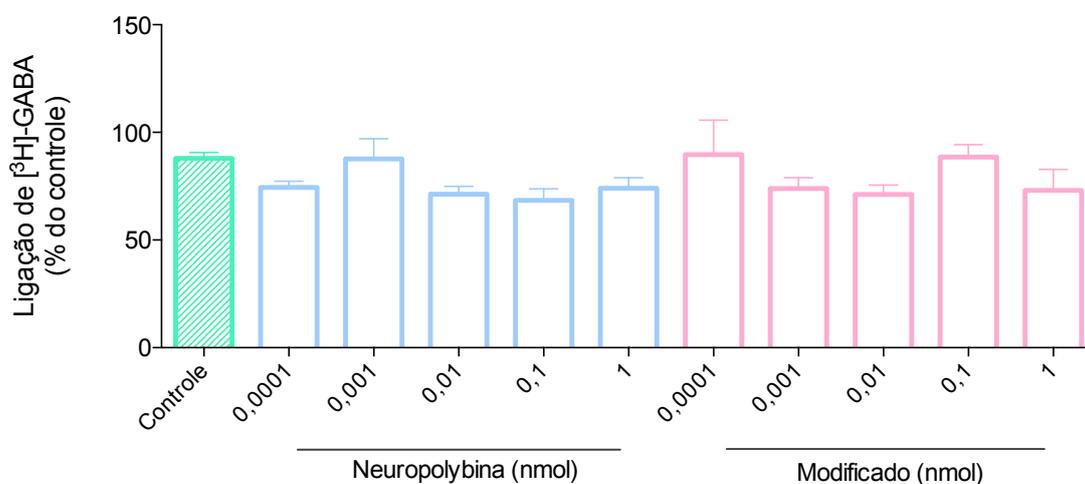


Figura 27. Histograma mostrando os efeitos de concentrações crescentes de Neuropolybina e seu análogo modificado (0,0001 a 1 nmol) na ligação de $[^3\text{H}]$ -GABA a seus receptores. Os dados são apresentados em porcentagem do controle como média \pm EPM de 3 experimentos em triplicata. O teste estatístico realizado foi ANOVA de uma via.

5. Discussão

O exato mecanismo celular subjacente aos eventos ictais (de crises) e interictais (entre as crises) não é conhecido, no entanto, existem alguns elementos essenciais que são objeto de regulação pelos fármacos antiepiléticos.

Em um eletroencefalograma, os eventos interictais podem ser manifestados como espículas, polispículas ou complexos de espícula-onda que ocorrem quando uma população de neurônios é ativada sincronamente, como resultado de um desbalanço local entre os processos excitatórios e inibitórios. A correlação intracelular da espícula interictal, é a despolarização da membrana suficiente para evocar um trem de potenciais de ação que é cessado posteriormente pela repolarização e impedido pela hiperpolarização celular. Uma variedade de processos inibitórios pode contribuir para esse potencial de hiperpolarização, que podem incluir ativação de receptores GABA_A e GABA_B, canais para K⁺ ativados por voltagem e correntes de K⁺ dependentes de Ca²⁺ (Dichter, 1994).

Deste modo, um evento ictal pode ocorrer quando existe um surto de espículas e despolarizações, que não é limitado por eventos inibitórios suficientes. Tais eventos ictais podem ser reduzidos como resultado de um aumento extracelular de K⁺, por exemplo, o que reduz a repolarização por meio de canais para K⁺, ou pela redução da neurotransmissão gabaérgica. É interessante notar que a inibição mediada pelo GABA é reduzida em condições de estimulações repetitivas de alta frequência, enquanto padrões excitatórios são frequentemente aumentados por essas estimulações. Desta forma, esses processos podem contribuir para uma transição entre eventos interictais e uma crise epilética e, por fim, o espalhamento da atividade epileptiforme de um foco (White, 2005).

Portanto, existem diversos mecanismos moleculares através dos quais os fármacos podem alterar a excitabilidade neuronal e, assim, limitar ou controlar a atividade epilética. No entanto, quatro principais mecanismos parecem ser o alvo da maioria dos antiepiléticos em uso atualmente (Meldrum; Rogawski, 2007). Por exemplo, fármacos que bloqueiam disparos sustentados de alta frequência pelo efeito em canais para Na⁺ voltagem dependentes podem interromper o surto de disparos de potenciais de ação, fármacos que atuam aumentando a neurotransmissão mediada pelo GABA podem aumentar o limiar para as crises. Ou ainda, fármacos que reduzem a

excitação mediada pelo glutamato podem reduzir os disparos induzidos pela estimulação sináptica, e fármacos que reduzem as correntes de canais para Ca^{2+} ativados por alta e baixa voltagem, podem interromper padrões de disparos associados a crises de ausência.

Por outro lado, o desenvolvimento de FAEs por meio dos modelos animais têm permitido a descoberta de compostos que atuam por combinações únicas desses mecanismos, e, em alguns casos, têm sido selecionados fármacos que atuam em mecanismos completamente novos. Neste contexto, o peptídeo antiepilético Neuropolybina foi isolado e caracterizado quimicamente, a partir da peçonha da vespa *Polybia paulista*, por Couto (2012). Neste trabalho, também foi descrito, por meio de testes com ratos Wistar, sua notória atividade antiepilética no modelo de indução aguda de crises por PTZ. A partir dos resultados obtidos por Couto (2012), com intuito de aprofundar no conhecimento sobre a ação no SNC que esse peptídeo exerce, foram sintetizados dois peptídeos, objeto de estudo do presente trabalho.

O peptídeo Neuropolybina e seu análogo modificado também foram testados no modelo de indução aguda de crises por PTZ, mas agora em camundongos. Os resultados obtidos com esse teste mostraram que o Neuropolybina foi mais eficaz na proteção dos camundongos que dos ratos, tendo em vista que foi obtida uma taxa de 100% de proteção com a dose de 2,5 nmol desse peptídeo, o que não foi observado com a dose máxima, de 3,7 nmol, no trabalho de Couto. Com relação ao composto modificado, podemos perceber que a redução dos dois aminoácidos em sua sequência reduziu a eficácia do peptídeo na proteção contra as crises epiléticas induzidas por PTZ, pois como mostram os resultados, a dose máxima não foi capaz de proteger 100% dos animais, e sua DE_{50} foi duas vezes superior à dose do Neuropolybina (1,58 nmol e 0,69 nmol, respectivamente).

Além disso, tais modificações no peptídeo foram feitas com o intuito de promover e/ou facilitar a passagem do composto pela barreira hematoencefálica, quando injetados sistemicamente, efeito que não foi observado. Os peptídeos quando administrados por via ip não foram capazes de proteger os animais contra as crises induzidas por PTZ, ao contrário do DZP. No entanto, este resultado pode ter sido obtido devido a dose dos peptídeos terem sido muito menor que a dose do DZP, eficaz em proteger contra esse tipo de crise. Desta forma, testes com concentrações maiores ainda precisam ser realizados.

A fim de obter mais informações sobre a atividade antiepiléptica dos compostos sintéticos, também foram realizados testes no modelo de indução de crises por Pilocarpina. A utilização de convulsivantes químicos que produzem crises por meio de mecanismos moleculares diferentes é importante na interpretação do mecanismo pelo qual o composto é capaz de inibir as crises (De Deyn *et al.*, 1992). A pilocarpina atua antagonizando receptores muscarínicos colinérgicos e o PTZ é um antagonista não-competitivo dos receptores GABA_A (Löscher, 1998). No presente trabalho, os peptídeos testados não foram capazes de evitar as crises induzidas pela Pilocarpina, em nenhuma das doses avaliadas e que apresentou atividade nas crises induzidas contra PTZ.

Os registros eletroencefalográficos corroboraram os dados obtidos por Couto (2012), em que podemos ver que o peptídeo Neuropolybina na DE₅₀, para ratos, aumentou a latência para o início das crises induzidas, bem como reduziu a intensidade destas. Também podemos perceber nesse experimento, a eficácia reduzida do peptídeo modificado que não foi diferente estatisticamente do veículo. Os registros obtidos das crises epilépticas induzidas pelo PTZ também apresentaram um padrão similar ao descrito na literatura, com grafoelementos de espículas correlacionados aos comportamentos de mioclonias, e de complexos polispícula-onda, com disparos de alta frequência e amplitude, sincronizados com as crises tônico-clônicas comportamentais (Schickerová; Mares; Trojan, 1984; Watanabe, 2010).

Esta ferramenta de eletroencefalografia nos permite obter informações adicionais sobre a atuação dos compostos e o mecanismo efetivo de geração das crises que apenas as observações comportamentais não são capazes de fornecer. Além disso em pacientes epilépticos, foi reportado que existe uma forte relação entre o comportamento epiléptico e as crises eletroencefalográficas (Narayanan; Labar; Schaul, 2008). Um trabalho feito por Watanabe (2010) comparou o efeito de diversos antiepilépticos nas crises comportamentais e eletroencefalográficas induzidas por PTZ e pôde perceber o efeito desses fármacos na duração das fases de mioclonias (espículas) e de crises tônico-clônicas (complexos de polispícula-onda). Além disso, o autor relatou que os fármacos efetivos no tratamento de crises de ausência, Fenobarbital, Valproato de Sódio, Diazepam, Etosuximida e Gabapentina, apresentaram um efeito equivalente ou até mais potente nas crises eletroencefalográficas do que o observado nas crises comportamentais. Estes resultados sugerem que essa metodologia pode ser importante na estimativa da potência de um fármaco antiepiléptico e na escolha do tratamento para

uma determinada epilepsia. Nesse sentido, análises posteriores mais aprofundadas sobre o efeito dos compostos nas crises mioclônicas e tônico-clônicas, em separado, ainda precisam ser feitas.

O modelo de PTZ é amplamente utilizado nos estudos com FAEs e possui comprovada eficácia em selecionar compostos com atividade antiepiléptica, como é o caso da Trimetadiona, utilizada para tratamento de crises de ausência (Richards; Everett, 1946; Snead, 1992). Além disso, compostos que aumentam as correntes de cloreto mediadas pelo GABA, como os Benzodiazepínicos, bem como os que suprimem o fluxo de cálcio por canais tipo T de baixo limiar, como a Etosuximida ou o Valproato, também são efetivos nesse modelo (Holmes, 2007).

Nesse sentido, dada a importância citada das neurotransmissões excitatória e inibitória como alvos farmacológicos para o tratamento da epilepsia, foram feitos testes de ligação a receptores de glutamato e GABA e testes sobre o efeito na captação de glutamato, em sinaptossomas e membranas corticais de ratos, para avaliar a possível atuação dos peptídeos antiepiléticos. Esse modelo biológico tem se mostrado eficiente para o estudo dos alvos moleculares de compostos neuroativos. Isto se deve ao fato de que estas estruturas, que nada mais são que vesículas formadas por membrana plasmática, são capazes de exercer funções sinápticas, pois contém receptores, transportadores e canais iônicos funcionalmente preservados (Schrimpf *et al.*, 2005; Bai; Witzmann, 2007). Além disso, os sinaptossomas apresentam os constituintes necessários para a síntese, captação e liberação dos neurotransmissores, dentre outras atividades celulares (Gray; Whittaker, 1962; Witzmann *et al.*, 2005; Witzmann, 2007). Sua morfologia típica pode ser observada na microscopia eletrônica da figura 28, retirada de Schrimpf e colaboradores (2005). A faixa de concentrações testadas foi escolhida de modo a abranger as doses dos ensaios *in vivo*.

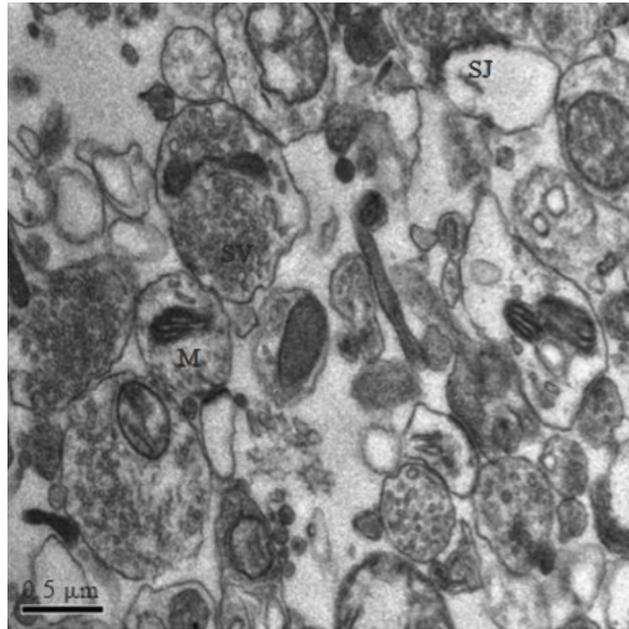


Figura 28. Micrografia eletrônica de uma fração de sinaptossomas obtidos de cérebros de camundongos. SV, vesícula sináptica; M, mitocôndria; SJ, junção sináptica. Barra = 0,5 μ m. Fonte: Schrimpf *et al.*, 2005.

No entanto, apesar do modelo de PTZ ser eficaz em selecionar compostos que atuem na transmissão gabaérgica, os resultados dos testes *in vitro* sobre a ligação a esses receptores não foi alterada pelas doses testadas dos peptídeos Neuropolybina e modificado. De modo semelhante, os resultados obtidos com relação ao transporte e à ligação de glutamato também mostraram que esses peptídeos podem não atuar sobre esses alvos moleculares. Entretanto, apesar da conhecida eficácia deste teste sobre receptores e transportadores do SNC, a sensibilidade em selecionar compostos com mecanismos de ação mais específicos é baixa. Ou seja, em virtude de serem preparações corticais, compostas por uma grande variedade de receptores e transportadores de todos os neurotransmissores presentes no córtex, se os peptídeos em estudo atuarem em algum subtipo específico de receptor, esse resultado pode ter sido mascarado.

Além disso, com relação ao ensaio de ligação a receptores gabaérgicos podemos inferir dos resultados obtidos que nenhum dos dois peptídeos sintéticos atua no sítio do agonista natural, GABA. Mas esses receptores possuem uma complexa estrutura química que abriga uma variedade de sítios alostéricos de ligação a moduladores da sua atividade inibitória. Como podemos ver na figura 29, além do agonista natural, existem uma variedade de compostos que exercem efeitos sobre os receptores GABA_A, como os agonistas Muscimol e Isoguvacina, os antagonistas competitivos como a Bicuculina,

moduladores alostéricos como os Benzodiazepínicos, os Barbitúricos, alguns neuroesteróides sedativos e anestésicos, e antagonistas não competitivos como a Picrotoxina (Korpi; Grunder; Luddens, 2002; Beleboni *et al.*, 2004). Sendo assim, estudos sobre a interação dos peptídeos Neuropolybina e modificado sobre esses diferentes sítios de ligação dos receptores GABA_A ainda precisam ser realizados e podem ser um potencial alvo farmacológico para tais compostos antiepiléticos.

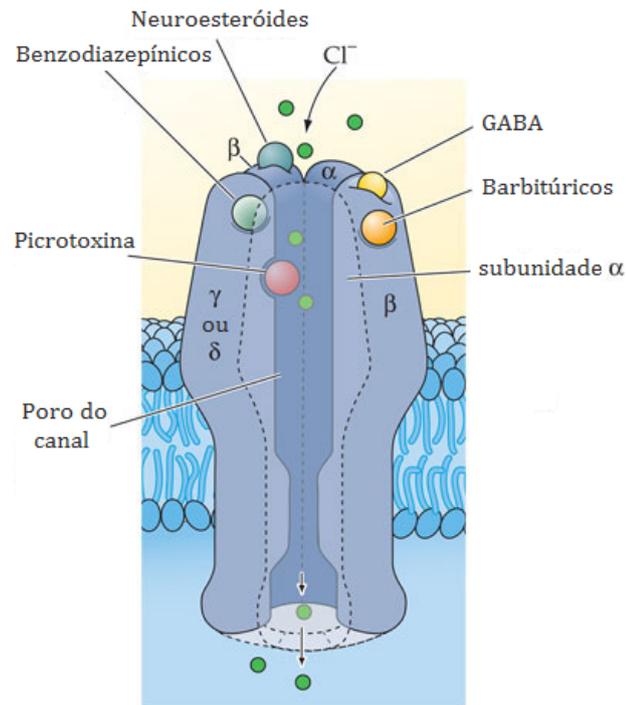


Figura 29. Ilustração do complexo receptor GABA_A e seus vários sítios de ligação a agonistas e antagonistas. Fonte: <http://sites.sinauer.com/psychopharm2e/webbox18.04.html>

Por outro lado, como mencionado, os fármacos antiepiléticos também podem atuar na modulação de canais iônicos como Ca²⁺ e Na⁺, e por isso também são alvos em potencial para os peptídeos Neuropolybina e modificado. Desta forma, a realização de outros testes *in vitro* mais específicos também seria interessante para delinear o mecanismo da ação antiepilética desses compostos.

As crises epiléticas, como dito anteriormente, estão associadas a uma despolarização sustentada que permite disparos síncronos e de alta frequência. Os antagonistas de canais para Na⁺ voltagem dependentes prolongam o tempo de inativação do canal e, reduzem a viabilidade desses canais durante as descargas epiléticas de alta frequência (Rogawski; Löscher, 2004). Dessa forma, a Fenitoína, a

Carbamazepina, a Lamotrigina, o Felbamato, o Topiramato, a Zonisamida, entre outros, se ligam ao estado de rápida inativação dos canais para Na⁺ voltagem dependentes e produzem uma redução transitória, frequência e voltagem-dependentes, na condutância do canal (Cosford et al., 2002; Meldrum; Rogawski, 2007).

A principal evidência que corrobora o envolvimento de canais para Ca²⁺ na patogênese de epilepsias de ocorrência natural advém de modelos animais de epilepsias generalizadas não-convulsivas, e incluem animais com mutações em subunidades específicas desses canais e superexpressão de correntes de canais para Ca²⁺ de baixo limiar (Armijo *et al.*, 2005). Além disso, bloqueadores de canais para Ca²⁺ ativados por baixa voltagem (tipo T), como a Etosuximida e a Zonisamida, impedem despolarizações síncronas de neurônios, principalmente, do circuito talâmico-cortical (Lasón *et al.*, 2013). Os bloqueadores de canais para Ca²⁺ ativados por alta voltagem, como a Lamotrigina (tipo N, P/Q), o Felbamato a Gabapentina (subunidade $\alpha_2\beta$ -1), o Topiramato, o Levetiracetam (tipo N) e a Pregabalina (subunidade $\alpha_2\beta$ -1), evitam a liberação de neurotransmissores (canais do tipo N, P/Q) e a despolarização pós-sináptica (canais tipo L) (Martin *et al.*, 2002; Meldrum *et al.*, 2007). Da mesma forma, todos esses alvos representam possíveis sítios de atuação dos peptídeos Neuropolybina e modificado.

Em meio a essa diversidade de fármacos com mecanismos de ação variados, às vezes múltiplos, ou até desconhecidos, a escolha do tratamento adequado para um determinado tipo de epilepsia não é fácil e a discussão sobre os benefícios de associar ou não medicamentos existe há muitos anos e perdura até hoje na clínica. Mas o fato é que a decisão pela politerapia deve ser cautelosa, pois as interações farmacocinéticas podem modificar a eficácia e a tolerabilidade de cada fármaco (Giussani; Beghi, 2013).

Quando dois medicamentos são utilizados em combinação, algumas consequências são esperadas: (1) não há benefício, pois um fármaco pode atuar antagonizando o outro; (2) existem benefícios e/ou efeitos adversos menores ou iguais aos efeitos de cada fármaco em separado (efeito aditivo); (3) os benefícios e/ou efeitos adversos são maiores que dos tratamentos isolados (sinergismo ou efeito supra-aditivo) (French; Faught, 2009; Czuczwar; Borowicz, 2002). A politerapia pode ser classificada como “racional” quando sua eficácia terapêutica é supra-aditiva (Giussani; Beghi, 2013). Nesse sentido, os estudos em animais têm mostrado que as combinações mais efetivas incluem fármacos com mecanismos de ação diferentes, mas o ideal é a interação entre

um fármaco que possui um único mecanismo de ação e um que possui múltiplos (Deckers *et al.*, 2000). Logo, pode-se notar a grande importância dos estudos que buscam elucidar os alvos farmacológicos desses compostos.

Nos últimos 20 anos, 15 FAEs foram aprovados para o tratamento da epilepsia, entre eles, o Acetato de Eslicarbazepina, o Felbamato, a Gabapentina, o Perampanel, o Topiramato, a Tiagabina, a Lamotrigina e outros (Giussani; Beghi, 2013). Quando comparados aos compostos de primeira geração, alguns desses novos FAEs possuem mecanismos de ação e perfis farmacocinéticos mais bem definidos. A relevância dessa nova geração está no desenvolvimento farmacológico racional que visa, principalmente, selecionar compostos com ação mais seletiva, além de possibilitar uma interação entre fármacos mais favorável.

Um exemplo que ilustra a importância de se conhecer o mecanismo de ação do fármaco escolhido para o tratamento é a Mioclonia Severa da Infância, uma condição em que há uma perda da função de canais de Na⁺ voltagem dependentes localizados em neurônios gabaérgicos. Neste caso, o uso de bloqueadores de canais de Na⁺ está associado com a piora do quadro de controle das crises epiléticas, enquanto o tratamento que vise aumentar a inibição mediada pelo GABA está associado à melhora do quadro (Bialer; White, 2010).

No entanto, apesar da eficácia comprovada e da quantidade de fármacos antiepiléticos disponíveis no mercado, as falhas e a baixa aderência são muito comuns em pessoas sob tratamento com esses medicamentos devido aos fortes efeitos adversos. Em aproximadamente 25% dos pacientes, os efeitos adversos são a principal causa da descontinuação do tratamento, por causarem significativos impactos negativos na qualidade de vida destas pessoas (Kwan; Brodie, 2000; Perucca *et al.*, 2009; Uijl *et al.*, 2009; Luoni *et al.*, 2011).

Os efeitos mais comuns dos FAEs são prejuízos na memória, fadiga, tremores, sintomas gastrointestinais, osteoporose, depressão, náuseas, alterações de peso, entre outros (Carpay; Aldenkamp; Donselaar, 2005). Vale ressaltar que vários estudos têm sugerido que os FAEs também estão associados a efeitos psicotrópicos (Ketter *et al.*, 1996; Mula *et al.*, 2003; Weintraub *et al.*, 2007; Piedad *et al.*, 2012). Recentemente, um estudo sobre o custo gerado para as famílias de pacientes com epilepsia e para os governos com gastos médicos relacionados aos efeitos adversos dos FAEs, foi realizado por De Kinderen (2014). Os resultados obtidos nesse estudo ressaltaram, sob uma

perspectiva econômica, que o controle dos efeitos adversos é tão importante quanto o controle das crises no tratamento de pacientes com epilepsia, pois o custo, não só para a sociedade mas também para os pacientes, é extremamente alto.

Em relação à neurotoxicidade, essa tem sido historicamente definida em termos de alterações químicas na integridade estrutural, bem como qualquer efeito adverso funcional no sistema nervoso produzido por um agente químico (Tilson, 1990; Han et al., 2011). Sendo assim, técnicas comportamentais originárias da psicologia experimental e da neurologia são utilizadas para detectar e caracterizar tais alterações em animais experimentais (Tilson, 1987; Cory-Slechta, 1989). O comportamento é considerado como a saída/vazão líquida do funcionamento sensorial, motor e cognitivo do sistema nervoso, o que o torna um potencial parâmetro de avaliação, sensível à indução química de neurotoxicidade (Tilson, 1993). Nesse contexto, dada a importância de uma avaliação do efeito neurocomportamental dos peptídeos antiepilépticos Neuropolybina e modificado, foi realizado o teste do campo aberto.

Para entender melhor o significado das alterações neurocomportamentais relevantes em ratos e camundongos, é importante destacar duas características básicas da fisiologia e do comportamento dessas espécies. A primeira, é que esses roedores, que são naturalmente predados, demonstram comportamentos de medo em lugares abertos, de estímulos desconhecidos e de luzes muito claras, ou seja, fatores que representam um risco aumentado de predação (Russel, 1979; Moscardo *et al.*, 2007). Em segundo lugar, estes animais apresentam, normalmente, altas taxas de locomoção e uma grande agilidade motora. Desta forma, este teste também permite uma avaliação de qualquer efeito sob o comportamento natural de movimentação do animal.

Para avaliar o nível “normal” de estresse/ansiedade dos animais, foi utilizado um grupo controle positivo com injeção apenas de veículo (icv) e os camundongos foram observados após serem colocados, pela primeira vez, em uma arena de campo aberto. Além disso, é bem estabelecida a importância de validar estes testes neurocomportamentais a partir da comparação de compostos que tenham perfis neurofarmacológicos e neurotóxicos diferentes, conhecidos, e que produzem alterações distintas, mas transitórias (Tilson; Cabe, 1978; Mattson; Spencer; Albee, 1996). Neste trabalho, o composto escolhido como controle negativo foi o fármaco Diazepam, que possui um clássico efeito sedativo.

As doses escolhidas para este teste foram: a dose máxima testada na proteção contra crises induzidas por PTZ (2,5 nmol/animal para Neuropolybina e 3 nmol/animal para o modificado) e outra 10 vezes maior que essa dose de proteção, a fim de avaliar a partir de qual concentração os peptídeos passam a causar efeitos tóxicos. Na análise do tempo total gasto pelos camundongos nos quatro comportamentos, observamos que todos os tratamentos foram diferentes do DZP nos comportamentos de imobilidade e exploração. Em relação à autolimpeza, apenas a dose de 3 nmol do modificado foi semelhante ao veículo e diferente do DZP. Quanto ao comportamento de elevação, notou-se que as doses máximas dos dois compostos aumentaram significativamente a taxa de elevação dos animais em relação ao DZP, e para o tratamento com o modificado também foi observada diferença entre as duas doses testadas.

Na análise ao longo do tempo experimental, como esperado, observou-se que os camundongos executaram o comportamento exploratório durante todo o período de experimento, de maneira que todos os tratamentos foram diferentes do DZP em todo o tempo. Com relação ao comportamento de imobilidade, podemos notar que no grupo tratado com DZP os animais permaneceram imóveis durante todo o teste e, para os outros grupos, apenas nos 5 min finais os animais aumentaram o tempo de imobilidade e isso se deve ao fato de que os animais já se ambientaram na arena e por isso sua atividade exploratória é reduzida. O único grupo que não seguiu esse padrão foi o de 30 nmol do modificado, que não se manteve imóvel em nenhum momento. Essa dose também gerou alterações nos comportamentos de autolimpeza e elevação quando comparada a dose de 3 nmol do mesmo peptídeo. No comportamento de elevação essas diferenças foram mais claras, pois houve um aumento significativo no tempo em que o animal permaneceu elevado, em comparação aos grupos controles e à dose menor desse peptídeo, e isso ocorreu durante todo o período experimental. Tais resultados podem ser indicativos de neurotoxicidade dessa dose de 30 nmol, tendo em vista que ela gerou alterações em todos os comportamentos avaliados. No entanto, outros testes ainda precisam ser realizados a fim de entender como esse composto causa essas alterações.

De modo semelhante, Couto (2012) também submeteu ratos tratados com Neuropolybina a esse teste, entretanto, sob efeito apenas das doses utilizadas nos testes de proteção contra crises (1,2 nmol, 2,5 nmol e 3,7 nmol/animal). Na análise do tempo gasto pelos animais, nos quatro comportamentos avaliados (imobilidade, exploratório, autolimpeza e elevação), a autora não encontrou diferenças significativas entre as doses

do peptídeo e o veículo mas, apenas entre esses grupos e o DZP, evidenciando também seu forte efeito sedativo.

Outra avaliação importante, e que ainda precisa ser realizada, é o efeito dos peptídeos na atividade motora dos animais, que como mencionado anteriormente, também é um parâmetro relevante na avaliação da neurotoxicidade dos compostos. Entretanto, parte dessa análise foi feita por Couto (2012) quando testou o efeito de três concentrações do Neuropolybina (14, 3,7 e 1,2 nmol/animal), em ratos, no teste do Rotarod. O peptídeo, então, não provocou comprometimento motor nos ratos submetidos a esse bioensaio em nenhuma das doses.

Sendo assim, os resultados combinados dos dois trabalhos, em ratos e em camundongos, mostraram que o peptídeo Neuropolybina pode representar uma importante ferramenta farmacológica com eficácia antiepiléptica e reduzidos efeitos comportamentais e motores. Nesse contexto, novas modificações precisam ser feitas, tendo em vista que as alterações realizadas no peptídeo modificado podem sugerir uma redução em sua eficácia no modelo de indução de crises testado, bem como um possível efeito neurotóxico que não foi observado para o peptídeo Neuropolybina.

6. Conclusões

- ❖ O peptídeo Neuropolybina se mostrou efetivo em bloquear crises induzidas por PTZ, em camundongos, e em comparação ao peptídeo modificado sua DE_{50} foi cerca de 2 vezes maior.
- ❖ Os peptídeos sintéticos não promoveram proteção contra as crises induzidas quimicamente por Pilocarpina, em camundongos, em nenhuma das doses testadas.
- ❖ A análise por vídeo-EEG mostrou que a latência para o início das crises eletroencefalográficas é a mesma para o início das crises comportamentais induzidas por PTZ.
- ❖ Ambos os peptídeos reduziram a classe das crises induzidas por PTZ em ratos.
- ❖ O peptídeo Neuropolybina protegeu 80% dos ratos contra as crises induzidas por PTZ no teste com registros eletroencefalográficos e aumentou a latência para o início dessas crises, quando presentes. Enquanto o modificado protegeu apenas 40% na dose testada e não foi diferente do grupo veículo, quanto a latência.
- ❖ Ambos os compostos testados não foram capazes proteger os animais contra crises induzidas por PTZ quando administrados sistemicamente.
- ❖ Os peptídeos não causaram alterações na atividade geral espontânea de camundongos nas doses de proteção contra crises, apenas a dose 10 vezes maior do modificado, principalmente no comportamento de elevação.
- ❖ Os peptídeos não foram hemolíticos nas concentrações testadas em eritrócitos de camundongos.
- ❖ O Neuropolybina e seu análogo modificado não apresentaram atividade nos testes de neuroquímica sobre a captação de $[^3H]$ -L-Glutamato, e sobre a ligação a receptores de $[^3H]$ -GABA e $[^3H]$ -L-Glutamato, em sinaptossomas corticais de ratos.

7. Anexos

7.1. Anexo 1 - Comitê de ética

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comitê de Ética no Uso Animal

Brasília, 13 de agosto de 2013.

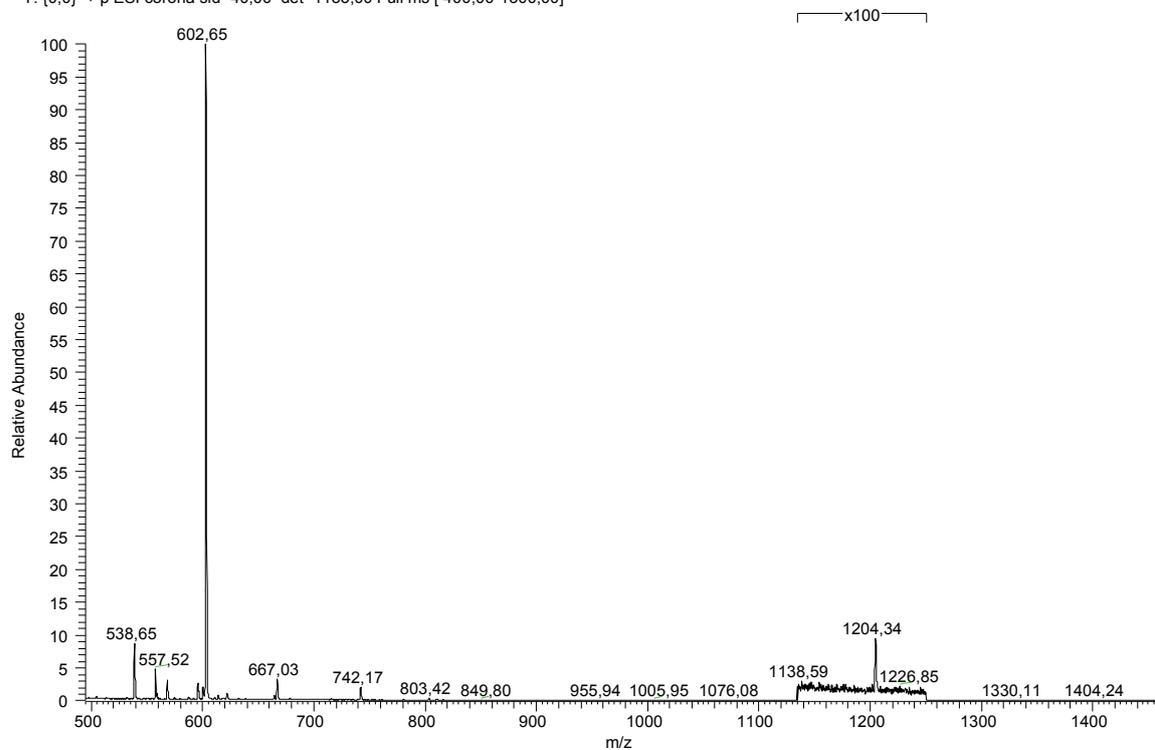
DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado “**PERFIL ELETROENCEFÁLICO E AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DO PEPTÍDEO ANTIÉPILEPTICO PPNP7 E DE UM ANÁLOGO.**”, UnBDOC n.º 85152/2013, sob responsabilidade da Professora Márcia Renata Mortari foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

Prof. Fernando Pacheco Rodrigues
Coordenador da CEUA

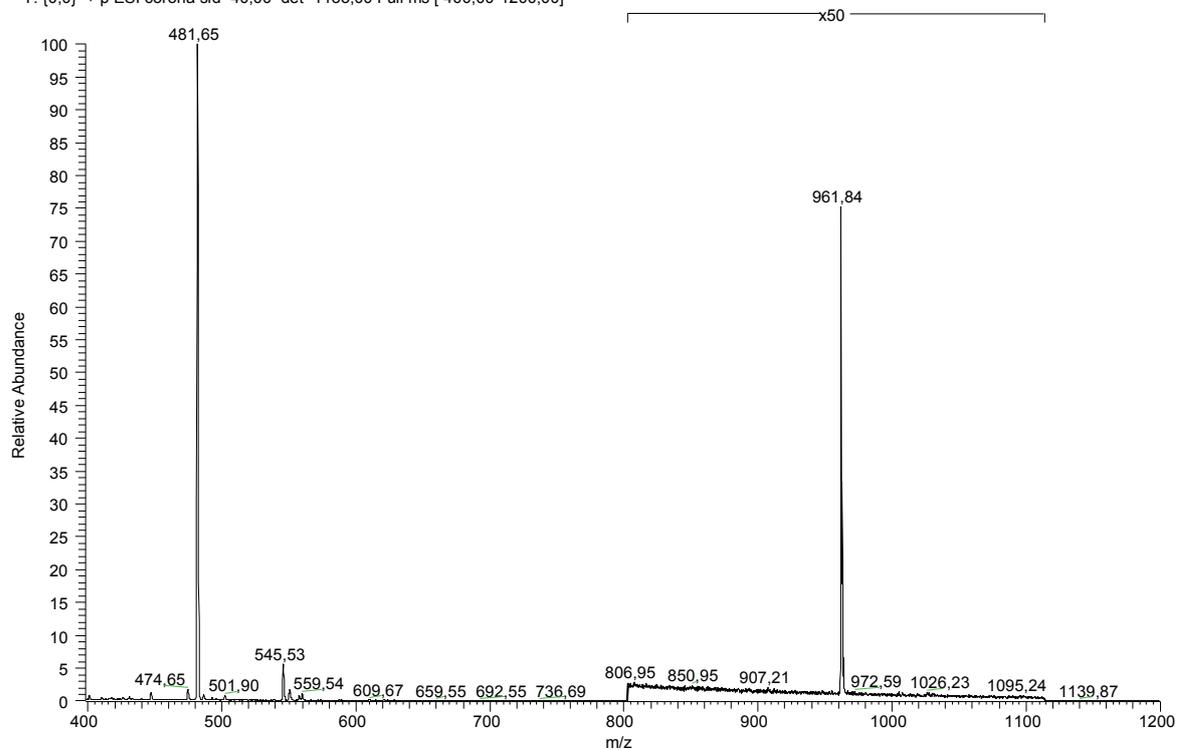
7.2. Anexo 2 - Espectro de massa do peptídeo Neuropolybina

S1221 - FINAL⁻ #178-424 RT: 1,16-3,89 AV: 257 NL: 1,73E5
T: {0;0} + p ESI corona sid=40,00 det=1153,00 Full ms [400,00-1500,00]



7.3. Anexo 3 - Espectro de massa do peptídeo modificado

S 1220 - Final #177-419 RT: 1,68-3,81 AV: 243 NL: 2,25E5
T: {0;0} + p ESI corona sid=40,00 det=1153,00 Full ms [400,00-1200,00]



8. Referências Bibliográficas

- Armijo JA, Shushtarian M, Valdizan EM *et al.* (2005) **Ion channels and epilepsy.** *Curr Pharm Des* 11(15): 1975-2003.
- Arriza JL, Eliasof S, Kavanaugh MP, Amara SG (1997) **Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance.** *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 94(8): 4155-4160.
- Arriza JL, Fairman WA, Wadiche JI *et al.* (1994) **Functional comparisons of three glutamate transporter subtypes cloned from human motor cortex.** *J Neurosci* 14(9): 5559-5569.
- Avoli M, D'Antuono M, Louvel J *et al.* (2002) **Network and pharmacological mechanisms leading to epileptiform synchronization in the limbic system in vitro.** *Prog Neurobiol* 68(3): 167-207.
- Avoli M, de Curtis M (2011) **GABAergic synchronization in the limbic system and its role in the generation of epileptiform activity.** *Prog Neurobiol* 95(2): 104-132.
- Awapara J (1950) **Ocurrence of free gamma-aminobutyric acid in brain and its formation from L-glutamic acid.** *Tex Rep Biol Med* 8(4): 443-447.
- Bai F, Witzmann FA (2007) **Synaptosome proteomics.** *Subcell Biochem* 43: 77-98.
- Beleboni RO, Carolino RO, Pizzo AB *et al.* (2004) **Pharmacological and biochemical aspects of GABAergic neurotransmission: pathological and neuropsychobiological relationships.** *Cell Mol Neurobiol* 24(6): 707-728.
- Beleboni RO, Guizzo R, Fontana AC *et al.* (2006) **Neurochemical characterization of a neuroprotective compound from *Parawixia bistriata* spider venom that inhibits synaptosomal uptake of GABA and glycine.** *Mol Pharmacol* 69(6): 1998-2006.
- Beleboni RO, Guizzo R, Fontana ACK *et al.* (2006) **Neurochemical characterization of a neuroprotective compound from *Parawixia bistriata* spider venom that inhibits synaptosomal uptake of GABA and glycine.** *Mol Pharmacol* 69(6): 1998-2006.
- Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ *et al.* (2010) **Terminologia e conceitos revistos para organização de crises e epilepsias. Relatório da Comissão da ILAE de Classificação e Terminologia, 2005-2009.**

- Berg AT, Scheffer IE (2011) **New concepts in classification of the epilepsies: entering the 21st century.** *Epilepsia* 52(6): 1058-62.
- Bialer M, White HS (2010) **Key factors in the discovery and development of new antiepileptic drugs.** *Nat Rev Drug Discov* 9(1): 68-82.
- Bloss EB, Hunter RG (2010) **Hippocampal kainate receptors.** *Vitam Horm* 82: 167-184.
- Blume WT, Lüders HO, Mizrahi E *et al.* (2001) **Glossary of descriptive terminology for ictal semiology: report of the ILAE task force on classification and terminology.** *Epilepsia* 42(9): 1212-1218.
- Borden LA (1996) **GABA transporter heterogeneity: Pharmacology and cellular localization.** *Neurochem Int* 29(4):335-356.
- Bormann J (2000) **The 'ABC' of GABA receptors.** *Trends Pharmacol Sci* 21(1): 16-19.
- Bowie D (2008) **Ionotropic glutamate receptors and CNS disorders.** *CNS Neurol Disord Drug Targets* 7(2): 129-143.
- Bowie D, Lange GD (2002) **Functional stoichiometry of glutamate receptor desensitization.** *J Neurosci* 22(9): 3392-3403.
- Bradford HF, Dodd PR (1976) **Biochemistry and basic mechanisms in epilepsy.** Em (Ed. A.N.Davison) **Biochemistry and Neurological Disease.** Blackwell Scientific publications, Oxford, England.
- Bradford HF, Peterson DW (1987) **Current views of the pathobiochemistry of epilepsy.** Em **Molecular Aspects of Medicine.** Gergely HB, Fanburg BL (Eds).
- Cairrão MAR, Ribeiro AM, Pizzo AB *et al.* (2002) **Anticonvulsant and GABA uptake inhibition properties of *P. bistriata* and *S. raptorial* spider venom fractions.** *Pharm Biol* 40: 472-477.
- Camón L, Vives P, de Vera N, Martínez E (1998) **Seizures and neuronal damage induced in the rat by activation of group I metabotropic glutamate receptors with their selective agonist 3,5-dihydroxyphenylglycine.** *J of Neurosci Res* 51(3): 339-348.
- Campbell S, Hablitz JJ (2005) **Modification of epileptiform discharges in neocortical neurons following glutamate uptake inhibition.** *Epilepsia* 46(Suppl 5): S129-S133.

- Carpay JA, Aldenkamp AP, van Donselaar CA (2005) **Complaints associated with the use of antiepileptic drugs: results from a community-based study.** *Seizure* 14(3): 198-206.
- Casillas-Espinosa PM, Powell KL, O'Brien TJ (2012) **Regulators of synaptic transmission: roles in the pathogenesis and treatment of epilepsy.** *Epilepsia* 53(S9): 41-58.
- Castillo PE, Malenka RC, Nicoll RA (1997) **Kainate receptors mediate a slow postsynaptic current in hippocampal CA3 neurons.** *Nature* 388(6638): 182-186.
- Conn PJ, Pin JP (1997) **Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37: 205-237.
- Cornejo BJ, Mesches MH, Coultrap S *et al.* (2007) **A single episode of neonatal seizures permanently alters glutamatergic synapses.** *Ann Neurol* 61(5): 411-426.
- Corona M, Coronas FV, Merino E *et al.* (2003) **A novel class of peptide found in scorpion venom with neurodepressant effects in peripheral and central nervous system of the rat.** *Biochim Biophys Acta* 1649(1): 58-67.
- Cory-Slechta DA (1989) **Behavioral measures of neurotoxicity.** *Neurotoxicol* 10: 271-296.
- Cosford ND, Meinke PT, Stauderman KA, Hess SD (2002) **Recent advances in the modulation of voltage-gated ion channels for the treatment of epilepsy.** *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 1(1): 81-104.
- Coutinho-Netto J, Abdul-Ghani AS, Norris PJ *et al.* (1980) **Effects of scorpion venom toxin on the release of amino acid neurotransmitters from cerebral cortex in vivo and in vitro.** *J Neurochem* 35(3): 558-565.
- Couto L (2012) **Atividade anticonvulsivante do Ppnp7, um neuropeptídeo isolado da peçonha da vespa social *Polybia paulista*.** Dissertação de mestrado, Universidade de Brasília, Brasil.
- Couto LL; dos Anjos LC; Araújo MA *et al.* (2012). **Anticonvulsant and anxiolytic activity of the peptide fraction isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*.** *Pharmacogn Mag* 8(32): 292-9.
- Coyle JT (2004) **The GABA-glutamate connection in schizophrenia: which is the proximate cause?** *Biochem Pharmacol* 68(8): 1507-1514.

- Cunha AO, Mortari MR, Oliveira L *et al.* (2005) **Anticonvulsant effects of the wasp *Polybia ignobilis* venom on chemically induced seizures and action on GABA and glutamate receptors.** *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 141(1): 50-57.
- Czuczwar SJ, Patsalos PN (2001) **The new generation of GABA enhancers. Potential in the treatment of epilepsy.** *CNS Drugs* 15(5):339-350.
- Czuczwar SK, Borowicz KK (2002) **Polytherapy in epilepsy, the experimental evidence.** *Epilepsy Res* 52(1): 15-23.
- Danbolt NC (2001) **Glutamate uptake.** *Prog Neurobiol* 65(1): 1-105.
- De Deyn PP, D'Hooge R, Marescau B, Pei YQ (1992) **Chemical models of epilepsy with some reference to their applicability in the development of anticonvulsants.** *Epilepsy Res* 12(2): 87-110.
- De Figueiredo SG, de Lima ME, Nascimento Cordeiro M *et al.* (2001) **Purification and amino acid sequence of a highly insecticidal toxin from the venom of the brazilian spider *Phoneutria nigriventer* which inhibits NMDA-evoked currents in rat hippocampal neurons.** *Toxicon* 39(2-3): 309-317.
- De Kinderen RJ, Evers SM, Rinkens R *et al.* (2014) **Side-effects of antiepileptic drugs: The economic burden.** *Seizure* 23(3): 184-90.
- Deckers CLP, Czuczwar SJ, Hekster YA *et al.* (2000) **Selection of antiepileptic drug polytherapy based on mechanism of action, the evidence reviewed.** *Epilepsia* 41(11): 1364-1374.
- DeLorenzo RJ (1988) **Mechanisms of action of anticonvulsant drugs.** *Epilepsia* 29(Suppl 2): S35-S47.
- Depaulis A, Deransart C, Vergnes M, Marescaux C (1997) **GABAergic mechanisms in generalized epilepsies: the neuroanatomical dimension.** *Rev Neurol (Paris)* 153(Suppl 1): S8-S13.
- Dichter MA (1989) **Cellular mechanisms of epilepsy and potential new treatment strategies.** *Epilepsia* 30(Suppl 1): S3-S12.
- Dichter MA (1994) **Emerging insights into mechanisms of epilepsy: implications for new antiepileptic drug development.** *Epilepsia* 35(Suppl 4): S51-S57.
- Doi T, Ueda Y, Tokumaru J, Willmore LJ (2005) **Molecular regulation of glutamate and GABA transporter proteins by clobazam during epileptogenesis in Fe(+++) -induced epileptic rats.** *Brain Res Mol Res* 142(2): 91-96.

- During MJ, Spencer DD (1993) **Extracellular hippocampal glutamate and spontaneous seizure in the conscious human brain.** *Lancet* 341(8861): 1607-1610.
- Engel J (2006) **Report of the ILAE Classification Core Group.** *Epilepsia* 47(9): 1558-1568.
- Fachim HA (2009) **Caracterização da atividade biológica da PbTx10 isolada da peçonha da aranha *Parawixia bistriata* (Aranae: Araneidae) em sistemas de neurotransmissão.** Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto, Brasil.
- Fairman WA, Vandenberg RJ, Arriza JL *et al.* (1995) **An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel.** *Nature* 375(6532): 599-603.
- Fisher RS, van Emde Boas W, Blume W *et al.* (2005) **Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE).** *Epilepsia* 46(4): 470-472.
- Fitzgerald PJ (2012) **The NMDA receptor may participate in widespread suppression of circuit level neural activity, in addition to a similarly prominent role in circuit level activation.** *Behav Brain Res* 230(1): 291-298.
- Fontana AC, Guizzo R, Beleboni RO *et al.* (2003) **Purification of a neuroprotective component of *Parawixia bistriata* spider venom that enhances glutamate uptake.** *Br J Pharmacol* 139(7): 1297-1309.
- Fontana AC, Guizzo R, Beleboni RO *et al.* (2003) **Purification of a neuroprotective componente of *Parawixia bistriata* spider venom that enhances glutamate uptake.** *Br J Pharmacol* 139(7): 1297-1309.
- Franklin K, Paxinos G (1997) **The mouse brain in stereotaxic coordinates.** Academic Press, Inc, San Diego.
- French JA, Faught E (2009) **Rational therapy.** *Epilepsia* 50(Suppl 8): S63-S68.
- Gaitatzis A, Sisodiya SM, Sander JW (2012) **The somatic comorbidity of epilepsy: a weighty but often unrecognized burden.** *Epilepsia* 53(8): 1282-1293.
- Galanopoulou AS (2010) **Mutations affecting GABAergic signaling in seizures and epilepsy.** *Pflugers Arch* 460(2): 505-523.

- Giussani G, Beghi E (2013) **Does mechanism of drug action matter to inform rational polytherapy in epilepsy?** *CNS Neurol Disord Drug Targets* 12(3): 426-435.
- Glauser TA, Cnaan A, Shinnar S *et al.* (2010) **Ethosuximide, valproic acid, and lamotrigine in childhood absence epilepsy.** *N Eng J Med* 362(9): 790–799.
- Gravius A, Pietraszek M, Dekundy A, Danysz W (2010) **Metabotropic glutamate receptors as therapeutic targets for cognitive disorders.** *Curr Top Med Chem* 10(2): 187-206.
- Gray EG, Whittaker VP (1962) **The isolation of nerve ending from brain: an electron- microscopic study of cell fragments derived by homogenization and centrifugation.** *J Anat* 96: 79-87.
- Gray EG, Whittaker VP (1962) **The isolation of nerve ending from brain: an electronmicroscopic study of cell fragments derived by homogenization and centrifugation.** *J Anat* 96: 79-87.
- Green AC, Nakanish K, Usherwood PNR (1996) **Polyamine amides are neuroprotective in cerebellar granule cell cultures challenged with excitatory amino acids.** *Brain Res* 717(1-2): 135-146.
- Guerrini R, Pellacani S (2012) **Benign childhood focal epilepsies.** *Epilepsia* 53(S4): 9-18.
- Han DY, Hoelzle JB, Dennis BC, Hoffman M (2011) **A brief review of cognitive assessment in neurotoxicology.** *Neurol Clin* 29(3): 581-590.
- Hartree EF (1972) **Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response.** *Anal Biochem* 48(2): 422-427.
- Hauser WA, Rich SS, Lee JR *et al.* (1998) **Risk of recurrent seizures after two unprovoked seizures.** *N Engl J Med* 338(7): 429-434.
- Hermann B, Seidenberg M, Jones, J (2008) **The neurobehavioural comorbidities of epilepsy : can a natural history be developed?** *Lancet Neurol* 7(2): 151-160.
- Hill DR, Bowery NG (1981) **3H-baclofen and 3H-GABA bind to bicuculline-insensitive GABA B sites in rat brain.** *Nature* 290(5802): 149-152.
- Holmes GL (2007) **Animal models studies application to human patients.** *Neurology* 69(24 Suppl 3): S28-S32.
- Jackson HC, Scheideler MA (1996) **Behavioural and anticonvulsant effects of Ca⁺⁺ channel toxins in DBA/2 mice.** *Psychopharmacology* 126(1): 85-90.

- Jallon P (2002) **Epilepsy and epileptic disorders, an epidemiological marker? Contribution of descriptive epidemiology.** *Epileptic Disord* 4(1): 1-13.
- Jonas P, Racca C, Sakman B *et al.* (1994) **Differences in Ca²⁺ permeability of AMPA-type glutamate receptor channels in neocortical neurons caused by differential GluR-B subunit expression.** *Neuron* 12(6): 1281-1289.
- Jones MG, Lodge D (1991) **Comparison of some arthropod toxins and toxin fragments as antagonists of excitatory amino acid-induced excitation of rat spinal neurons.** *Eur J Pharmacol* 204(2): 203-209.
- Kaminski RM, Banerjee M, Rogawski MA (2004) **Topiramate selectively protects against seizures induced by ATPA, a GluR5 kainate receptor agonist.** *Neuropharmacology* 46(8): 1097-1104.
- Kanai Y, Hediger MA (1992) **Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter.** *Nature* 360(6403): 467-471.
- Karst H, Joëls M, Wadman WJ, Piek T (1994) **Philanthotoxin inhibits Ca⁺⁺-currents in rat hippocampal CA1 neurones.** *Eur J Pharmacol* 270(4): 357-360.
- Kernan CL, Asarnow R, Siddarth P *et al.* (2012) **Neurocognitive profiles in children with epilepsy.** *Epilepsia* 53(12): 2156-2163.
- Ketter TA, Malow BA, Flamini R *et al.* (1996) **Felbamate monotherapy has stimulant-like effects in patients with epilepsy.** *Epilepsy Res* 23(2): 129-137.
- Korpi ER, Gründer G, Lüddens H (2002) **Drug interactions at GABA(A) receptors.** *Prog Neurobiol* 67(2): 113-159.
- Krall RL, Penry JK, Kupferberg HJ, Swinyard, EA (1978) **Antiepileptic drug development: I. History and a program for progress.** *Epilepsia* 19(4):393-408.
- Krnjevic K (1974) **Chemical nature of synaptic transmission in vertebrates.** *Physiol Rev* 54: 418-540.
- Kuo CC, Lin BJ, Chanc HR, Hsieh CP (2004) **Use-dependent inhibition of the N-methyl-D-aspartate currents by felbamate: a gating modifier with selective binding to the desensitized channels.** *Mol Pharmacol* 65(2): 370-80.
- Kwan P, Brodie M (2000) **Early identification of refractory epilepsy.** *N Eng J Med* 342(5): 314-319.
- Kwan P, Brodie MJ (2000) **Early identification of refractory epilepsy.** *N Engl J Med* 342(5): 314-319.

- Kwan P, Brodie MJ (2004) **Drug treatment of epilepsy: when does it fail and how to optimize its use?** *CNS Spectr* 9(2): 110-119.
- Landmarck CJ, Johannessen SI (2008) **Modifications of antiepileptic drugs for improved tolerability and efficacy.** *Perspect Medicin Chem* 14(2): 21-39.
- Lasón W, Chlebicka M, Rejdak K (2013) **Research advances in basic mechanisms of seizures and antiepileptic drug action.** *Pharmacol Rep* 65(4): 787-801.
- Latini G, Verrotti A, Manco R *et al.* (2008) **Topiramate: its pharmacological properties and therapeutic efficacy in epilepsy.** *Mini Rev Med Chem* 8(1): 10-23.
- Lee G, Huang Y, Washington JM *et al.* (2005) **Carbamazepine enhances the activity of glutamate transporter type 3 via phosphatidylinositol 3-kinase.** *Epilepsy Res* 66(1-3): 145-153.
- Lerma J, Paternain AV, Rodríguez-Moreno A, López-García JC (2001) **Molecular physiology of kainate receptors.** *Physiol Rev* 81(3): 971-998.
- Liao D, Hessler NA, Malinow R (1995) **Activation of postsynaptically silent synapses during pairing-induced LTP in CA1 region of hippocampal slice.** *Nature* 375(6530): 400-404.
- Lisman J, Schulman H, Cline H (2002) **The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory.** *Nature Rev Neurosci* 3(3): 175-190.
- Lisman JE, Zhabotinsky AM (2001) **A model of synaptic memory: a CaMKII/PP1 switch that potentiates transmission by organizing an AMPA receptor anchoring assembly.** *Neuron* 31(2): 191-201.
- Liu X, Wen F, Yang J *et al.* (2010) **A review of current applications of mass spectrometry for neuroproteomics in epilepsy.** *Mass Spectrom Rev* 29(2): 197-246.
- Lloyd KG, Morselli PL, Bartholini G (1987) **GABA and affective disorders.** *Med Biol* 65(2-3): 159-165.
- Lopantsev V, Both M, Draguhn A (2009) **Rapid plasticity at inhibitory and excitatory synapses in the hippocampus induced by ictal epileptiform discharges.** *Eur J Neurosci* 29(6): 1153-1164.
- Löscher W (1998) **New visions in the pharmacology of anticonvulsion.** *Eur J Pharmacol* 342(1): 1-13.
- Löscher W, Ebert U (1996) **The role of the piriform cortex in kindling.** *Prog*

- Neurobiol* 50(5-6): 427-481.
- Löscher W, Schmidt D (1994) **Strategies in antiepileptic drug development: is rational drug design superior to random screening and structural variation?** *Epilepsy Res* 17(2): 95-134.
- Löscher W, Schmidt D (2011) **Modern antiepileptic drug development has failed to deliver: ways out of the current dilemma.** *Epilepsia* 52(4): 657-678.
- Löscher, W (1993) **Basic aspects of epilepsy.** *Curr Opin Neurol Neurosurg* 6(2): 223-232.
- Lowry OH, Rosebrouch NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) **Protein measurement with the folin phenol reagent.** *J Biol Chem* 193(1): 265-275.
- Luoni C, Bisulli F, Canevini MP *et al.* (2011) **Determinants of health-related quality of life in pharmaco-resistant epilepsy: results from a large multicenter study of consecutively enrolled patients using validated quantitative assessment.** *Epilepsia* 52(12): 2181-2191.
- Lüttjohann A, Fabene PF, Luijtelaaar GV (2009) **A revised Racine's scale for PTZ induced seizures in rats.** *Physiology & Behavior* 98(5): 579-586.
- Machado LDV, Frank JE, Tomaz C (2010) **Emotional declarative memory assessment of patients with mesial temporal lobe epilepsy and patients submitted to mesial temporal lobectomy.** *Arq Neuropsiquiatr* 68(5): 737-743.
- Mafra RA, Figueiredo SG, Diniz CR *et al.* (1999) **PhTx4, new class of toxins from *Phoneutria nigriventer* spider venom, inhibits the glutamate uptake in rat brain synaptosomes.** *Brain Res* 831(1-2): 297-300.
- Malenka RC, Nicoll RA (1997) **Silent synapses speak up.** *Neuron* 19(3): 473-476.
- Marcangelo MJ, Ovsiew F (2007) **Psychiatric aspects of epilepsy.** *Psychiatr Clin North Am* 30(4): 781-802.
- Marmioli P, Cavaletti G (2012) **The glutamatergic neurotransmission in the central nervous system.** *Curr Med Chem* (19)(9): 1269:1276.
- Marson AG, Al-Kharusi AM, Alwaidh M *et al.* (2007) **The SANAD study of effectiveness of carbamazepine, gabapentin, lamotrigine, oxcarbazepine, or topiramate for treatment of partial epilepsy: an unblinded randomised controlled trial.** *Lancet* 369(9566): 1000-1015.
- Martin DJ, McClelland D, Herd MB *et al.* (2002) **Gabapentin-mediated inhibition of voltage-activated Ca²⁺ channel currents in cultured sensory neurones is**

- dependent on culture conditions and channel subunit expression.** *Neuropharmacology* 42(3): 353-366.
- Mattson JL, Spencer PJ, Albee RR (1996) **A performance standard for clinical and functional observational battery examinations of rats.** *J Amer Coll Toxicol* 15: 239-254.
- Meldrum BS (1992) **Excitatory amino acids in epilepsy and potential novel therapies.** *Epilepsy Res* 12(2): 189-196.
- Meldrum BS, Rogawski MA (2007) **Molecular targets for antiepileptic drug development.** *Neurotherapeutics* 4(1): 18-61.
- Moldrich RX, Chapman AG, De Sarro G, Meldrum BS (2003) **Glutamate metabotropic receptors as targets for drug therapy in epilepsy.** *Eur J Pharmacol* 476(1-2): 3-16.
- Mortari MR, Cunha AOS, de Oliveira L *et al.* (2005) **Anticonvulsant and behavioural effects of denatured venom of the social wasp *Polybia occidentalis* (Polistinae, Vespidae).** *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 97(5): 289-295.
- Moscardo E, Maurin A, Dorigatti R *et al.* (2007) **An optimised methodology for the neurobehavioral assessment in rodents.** *J Pharmacol Toxicol Methods* 56: 239-255.
- Muir KW (2006) **Glutamate-based therapeutic approaches: clinical trials with NMDA antagonists.** *Curr Opin Pharmacol* 6(1): 53-60.
- Mula M (2009) **New antiepileptic drugs: molecular targets.** *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* 9(2): 79-86.
- Mula M, Trimble MR, Yuen A *et al.* (2003) **Psychiatric adverse events during levetiracetam therapy.** *Neurology* 61(5): 704-706.
- Mussi-Ribeiro A, Miranda A, Gobbo-Neto L *et al.* (2004) **An anticonvulsive fraction from *Scaptocosa raptorial* (Araneae: Lycosidae) spider venom.** *Neurosci Lett* 371(2-3): 171-175.
- Nadler JV (1981) **Minireview: Kainic acid as a tool for the study of temporal lobe epilepsy.** *Life Sci* 29(20) 2031-42.
- Namvar S, Mirnajafi-Zadeh J, Fathollahi Y, Zeraati M (2008) **The role of piriform cortex adenosine A1 receptors on hippocampal kindling.** *Can J Neurol Sci* 35(2): 226-231.

- Narayanan JT, Labar DR, Schaul N (2008) **Latency to first spike in the EEG of epilepsy patients.** *Seizure* 17(1): 34-41.
- Nencioni AL, Lebrun I, Dorce VA (2003) **A microdialysis study of glutamate concentration in the hippocampus of rats after TsTX toxin injection and blockade of toxin effects by glutamate receptor antagonists.** *Pharmacol Biochem Behav* 74(2): 455-463.
- Palma MS, de Souza BM (2009) **Peptides from Hymenoptera venoms.** Em Lima ME, Pimenta AMC, Martin-Eauclaire *et al.* (2009) **Animal Toxins: State of the Art - Perspectives in health and biotechnology.** Belo Horizonte: Editora UFMG.
- Patsalos PN (2013) **Drug interactions with the newer antiepileptic drugs (AEDs)-- part 1: pharmacokinetic and pharmacodynamic interactions between AEDs.** *Clin Pharmacokinet* 52(11): 927-66.
- Patsalos PN, Fröscher W, Pisani F, van Rijn CM (2002) **The importance of drug interactions in epilepsy therapy.** *Epilepsia* 43(4): 365-385.
- Pavlov I, Huusko N, Drexel M *et al.* (2011) **Progressive loss of phasic, but not tonic, GABAA receptor-mediated inhibition in dentate granule cells in a model of post-traumatic epilepsy in rats.** *Neuroscience* 194:208-219.
- Paxinos G, Watson C (1986) **The rat brain in stereotaxic coordinates.** 2nd edition. Academic Press, Inc, Sidney.
- Penry K (1981) **Proposal for Revised Clinical and Electroencephalographic Classification of Epileptic Seizures.** *Epilepsia* 22(4): 489-501.
- Perucca E (1997) **Pharmacological advantages of antiepileptic drug monotherapy.** *Epilepsia* 38(Suppl 5): S6-S8.
- Perucca E (2005) **An introduction to antiepileptic drugs.** *Epilepsia* 46 (Suppl 4): S31-S37.
- Perucca P, Carter J, Vahle V, Gilliam FG (2009) **Adverse antiepileptic drug effects: toward a clinically and neurobiologically relevant taxonomy.** *Neurology* 72(14): 1223-1229.
- Piazzini A, Beghi E, Turner K, Ferraroni M, LICE Quality of Life Group (2008) **Health-related quality of life in epilepsy: findings obtained with a new Italian instrument.** *Epilepsy Behav* 13(1): 119-126.
- Piedad J, Rickards H, Besag FM, Cavanna AE (2012) **Beneficial and adverse psychotropic effects of antiepileptic drugs in patients with epilepsy: a**

- summary of prevalence, underlying mechanisms and data limitations.** *CNS Drugs* 26(4): 319-335.
- Pines G, Danbolt NC, Bjoras M *et al.* (1992) **Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter.** *Nature* 360(6403) 464-467.
- Pinheiro AC, Gómez RS, Massensini AR *et al.* (2006) **Neuroprotective effect on brain injury by neurotoxins from the spider *Phoneutria nigriventer*.** *Neurochem Int* 49(5): 543-547.
- Pinheiro P, Mulle C (2006) **Kainate receptors.** *Cell Tissue Res* 326(2): 457-82.
- Pinheiro PS, Mulle C (2008) **Presynaptic glutamate receptors: physiological functions and mechanisms of action.** *Nature Rev Neurosci* 9(6): 423-436.
- Porter RJ, Rogawski MA (1992) **New antiepileptic drugs: from serendipity to rational discovery.** *Epilepsia* 33(Suppl 1): S1-S6.
- Possani LD, Becerril B, Delepierre M, Tytgat J (1999) **Scorpion toxins specific for Na⁺-channels.** *Eur J Biochem* 264(2): 287-300.
- Poulsen CF, Schousboe I, Sarup A *et al.* (2006) **Effect of topiramate and dBcAMP on expression of the glutamate transporters GLAST and GLT-1 in astrocytes cultured separately, or together with neurons.** *Neurochem Int* 48(6-7): 657-661.
- Poza JJ (2012) **The genetics of focal epilepsies.** *Handb Clin Neurol* 107: 153-161.
- Prado MA, Guatimosim C, Gómez MV *et al.* (1996) **A novel tool for the investigation of glutamate release from rat cerebrocortical synaptosomes: the toxin Tx3-3 from the venom of the spider *Phoneutria nigriventer*.** *Biochem J* 314(1): 145-150.
- Racine RJ (1972) **Modification of seizure activity by electrical stimulation. II: Motor seizure.** *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 32(3): 281-294.
- Rakhade SN, Fitzgerald EF, Klein PM *et al.* (2012) **Glutamate receptor 1 phosphorylation at serine 831 and 845 modulates seizure susceptibility and hippocampal hyperexcitability after early life seizures.** *J Neurosci* 32(49): 17800-17812.
- Rakhade SN, Zhou C, Aujla PK *et al.* (2008) **Early alterations of AMPA receptors mediate synaptic potentiation induced by neonatal seizures.** *J Neurosci* 28(32): 7979-7990.
- Rangel M, Malpezzi EL, Susini SM, de Freitas JC (1995) **Hemolytic activity in extracts**

- of the diatom Nitzschia.** *Toxicon* 35(2): 305-309.
- Reis HJ, Prado MA, Kalapothakis E *et al.* (1999) **Inhibition of glutamate uptake by a polypeptide toxin (phoneutriatoxin 3-4) from the spider *Phoneutria nigriventer*.** *Biochem J* 343(2): 413-418.
- Richards RK, Everett GM (1946) **Tridione: a new anticonvulsant drug.** *J Lab Clin Med* 31(12): 1330-1336.
- Roberts E (1986) **What do GABA neurons really do? They make possible variability generation in relation to demand.** *Exp Neurol* 93(2):279-290.
- Roberts E, Frankel S (1950) **gamma-Aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid.** *J Biol Chem* 187(1): 55-63.
- Rochat H, Bernard P, Couraud F (1979) **Scorpion toxins: chemistry and mode of action.** *Adv Cytopharmacol* 3: 325-334.
- Rogawski MA (2000) **Low affinity channel blocking (uncompetitive) NMDA receptor antagonists as therapeutic agents-toward an understanding of their favorable tolerability.** *Amino Acids* 19(1): 133-149.
- Rogawski MA (2011) **Revisiting AMPA receptors as an antiepileptic drug target.** *Epilepsy Curr* 11(2): 56-63.
- Rogawski MA, Donevan SD (1999) **AMPA receptors in epilepsy and as targets for antiepileptic drugs.** *Adv Neurol* 79: 947-963.
- Rogawski MA, Löscher W (2004) **The neurobiology of antiepileptic drugs.** *Nat Rev Neurosci* 5(7): 553-564.
- Rogawski MA, Porter RJ (1990) **Antiepileptic drugs: pharmacological mechanisms and clinical efficacy with consideration of promising developmental stage compounds.** *Pharmacol Rev* 42(3): 223-286.
- Ruggiero RN, Bueno-Júnior LS, de Ross JB *et al.* (2011) **Neurotransmissão glutamatérgica e plasticidade sináptica: aspectos moleculares , clínicos e filogenéticos.** *Medicina (Ribeirão Preto. Online)* 44(2): 143-156.
- Russel PA (1979) **Fear-evoking stimuli.** Em Sluckin W (Ed.) **Fear in animals and man.** Princeton, NJ.: Van Nostrand Reinhold Co. Ltd.
- Saidenberg DM, Silva-Filho LC, Tognoli LM, *et al.* (2010) **Polybioside, a neuroactive compound from the venom of the social wasp *Polybia paulista*.** *J Nat Pro* 73(4): 527-531.

- Sanacora G, Gueorguieva R, Epperson CN *et al.* (2004) **Subtype-specific alterations of gamma-aminobutyric acid and glutamate in patients with major depression.** *Arch Gen Psychiatry* 61(7):705-713.
- Sandoval MR, Lebrun I (2003) **TsTx toxin isolated from *Tityus serrulatus* scorpion venom-induced spontaneous recurrent seizures and mossy fiber sprouting.** *Epilepsia* 43(7): 904-911.
- Sayin U, Osting S, Hagen J *et al.* (2003) **Spontaneous seizures and loss of axo-axonic and axo-somatic inhibition induced by repeated brief seizures in kindled rats.** *J Neurosci* 23(7): 2759-2768.
- Schickerová R, Mares P, Trojan S (1984) **Correlation between electrocorticographic and motor phenomena induced by pentamethylenetetrazol during ontogenesis in rats.** *Exp Neurol* 84(1): 153-164.
- Schmidt D (2009) **Drug treatment of epilepsy: options and limitations.** *Epilepsy Behav* 15(1): 56-65.
- Schmidt D, Beyenburg S (2009) **Antiepileptic drugs.** Em Aronson JK (Ed.) Side effects of drugs. Annual 31. Elsevier, Amsterdam, pp. 105- 148.
- Schousboe A, Madsen KK, White HS (2011) **GABA transport inhibitors and seizure protection: the past and future.** *Future Med Chem* 3(2):183-187.
- Schrimpf SP, Meskenaite V, Brunner E *et al.* (2005) **Proteomic analysis of synaptosomes using isotope-coded affinity tags and mass spectrometry.** *Proteomics* 5(10): 2531-2541.
- Scorza FA, Cavalheiro EA (2004) **Epilepsias: aspectos sociais e psicológicos.** *R Cult, R IMAE* 5(11): 48-53.
- Sheldon AL, Robinson MB (2007) **The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention.** *Neurochem Int* 51(6-7): 333-355.
- Sherif FM, Ahmed SS (1995) **Basic aspects of GABA-transaminase in neuropsychiatric disorders.** *Clin Biochem* 28(2): 145-154.
- Shibley H, Smith BN (2002) **Pilocarpine-induced status epilepticus results in mossy fiber sprouting and spontaneous seizures in C57BL/6 and CD-1 mice.** *Epilepsy Res* 49(2): 109-120.
- Shorvon SD (2009) **Drug treatment of epilepsy in the century of the ILAE: the second 50 years, 1959-2009.** *Epilepsia* 50(Suppl 3): S93-S130.

- Sills GJ (2003) **Pre-clinical studies with the GABAergic compounds vigabatrin and tiagabine.** *Epileptic Disord* 5(1): 51-56.
- Smith PF (2003) **Therapeutic N-methyl-D-aspartate receptor antagonists: will reality meet expectation?** *Curr Opin Investig Drugs* 4(7): 826-832.
- Snead OC (1992) **Pharmacological models of generalized absence seizures in rodents.** *J Neural Transm Suppl* 35: 7-19.
- Speller JM, Westby GW (1996) **Bicuculline-induced circling from the rat superior colliculus is blocked by GABA microinjection into the deep cerebellar nuclei.** *Exp Brain Res* 110(3): 425-434.
- St Louis EK (2009) **Truly "rational" polytherapy: maximizing efficacy and minimizing drug interactions, drug load, and adverse effects.** *Curr Neuropharmacol* 7(2): 96-105.
- Storck T, Schulte S, Hofman K, Stoffel W (1992) **Structure, expression, and functional analysis of a Na(+)-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain.** *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 89(22): 10955-10959.
- Stromgaard K, Mellor I (2004) **AMPA receptor ligands: synthetic and pharmacological studies of polyamines and polyamine toxins.** *Med Res Rev* 24(5): 589-620.
- Sutula TP (2004) **Mechanisms of epilepsy progression: current theories and perspectives from neuroplasticity in adulthood and development.** *Epilepsy Res* 60(2-3): 161-171.
- Takazawa A, Yamazaki O, Kanai H *et al.* (1996) **Potent and long-lasting anticonvulsant effects of 1-naphthylacetyl spermine, an analogue of Joro spider toxin, against amygdaloid kindled seizures in rats.** *Brain Res* 706(1): 173-176.
- Tanaka K, Watase K, Manabe T *et al.* (1997) **Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1.** *Science* 276(5319): 1699-1702.
- Tang FR, Bradford HF, Ling EA (2009) **Metabotropic glutamate receptors in the control of neuronal activity and as targets for development of anti-epileptogenic drugs.** *Curr Med Chem* 16(17): 2189-2204.
- Tang FR, Chen PM, Tang YC *et al.* (2007) **Two-methyl-6-phenylethynyl-pyridine (MPEP), a metabotropic glutamate receptor 5 antagonist, with low doses of**

- MK801 and diazepam: a novel approach for controlling status epilepticus.** *Neuropharmacology* 53(7): 821-831.
- Thapar A, Kerr M, Harold G (2009) **Stress, anxiety, depression, and epilepsy: Investigating the relationship between psychological factors and seizures.** *Epilepsy Behav* 14(1): 134-140.
- Tilson HA (1987) **Behavioral indices of neurotoxicity: What can be measured.** *Neurotoxicol Teratol* 9: 427-443.
- Tilson HA (1990) **Neurotoxicology in the 1990s.** *Neurotoxicol Teratol* 12: 293-300.
- Tilson HA (1993) **Neurobehavioral methods used in neurotoxicological research.** *Toxicol Lett* 68: 231-240.
- Tilson HA, Cabe PA (1978) **Strategy for the assessment of neurobehavioral consequences of environmental factors.** *Environ Health Perspect* 26: 287-299.
- Treiman DM (2001) **GABAergic mechanisms in epilepsy.** *Epilepsia* 42(Suppl 3): S8-S12.
- Uchitel OD (1997) **Toxins affecting calcium channels in neurons.** *Toxicon* 35(8): 1161-1191.
- Ueda Y, Doi T, Tokumaru J, Willmore LJ (2003) **Effect of zonisamide on molecular regulation of glutamate and GABA transporter proteins during epileptogenesis in rats with hippocampal seizures.** *Brain Res Mol Brain Res* 116(1-2): 1-6.
- Ueda Y, Doi T, Tsuru N *et al.* (2002) **Expression of glutamate transporters and ionotropic glutamate receptors in GLAST knockout mice.** *Brain Res Mol Brain Res* 104(2): 120-126.
- Uijl SG, Uiterwaal CS, Aldenkamp AP *et al.* (2009) **Adjustment of treatment increases quality of life in patients with epilepsy: a randomized controlled pragmatic trial.** *Eur J Neurol* 16(11): 1173-1177.
- Vincent P, Mulle C (2009) **Kainate receptors in epilepsy and excitotoxicity.** *Neuroscience* 158(1): 309-323.
- Wang CG, He XL, Shao F *et al.* (2001) **Molecular characterization of an anti-epilepsy peptide from the scorpion *Buthus marthensi* Karsch.** *Eur J Biochem* 268(8): 2480-2485.

- Watanabe Y, Takechi K, Fujiwara A, Kamei C (2010) **Effects of antiepileptics on behavioral and electroencephalography seizure induced by pentetrazol in mice.** *J Pharmacol Sci* 112(3): 282-289.
- Weintraub D, Buchsbaum R, Resor Jr SR *et al.* (2007) **Psychiatric and behavioral side effects of the newer antiepileptic drugs in adults with epilepsy.** *Epilepsy Behav* 10(1): 105-110.
- Wemmer D, Kallembach NR (1982) **Assignments and structure of apamin and related peptides in bee venom.** *Biochemistry* 22: 1901-1906.
- White HS (2005) **Molecular pharmacology of topiramate: managing seizures and preventing migraine.** *Headache* 45(Suppl 1): S48-S56.
- White HS (2005) **Molecular pharmacology of topiramate: managing seizures and preventing migraine.** *Headache* 45(Suppl 1): S48-S56.
- Wiebe S, Blume WT, Girvin JP, Eliasziw M, Effectiveness and Efficacy of Surgery for Temporal Lobe Epilepsy Study Group (2001) **A randomized, controlled trial of surgery for temporal-lobe epilepsy.** *N Eng J Med* 345(5): 311-318.
- Witzmann FA, Arnold RJ, Bai F *et al.* (2005) **A proteomic survey of rat cerebral cortical synaptosomes.** *Proteomics* 5(8): 2177-2201.
- Wong CG, Bottiglieri T, Snead OC (2003) **GABA, gamma-hydroxybutyric acid, and neurological disease.** *Ann Neurol* 54(Suppl 6): S3-S12.
- Wu G, Malinow R, Cline HT (1996) **Maturation of a central glutamatergic synapse.** *Science* 274(5289): 972-976.
- Xiao MY, Wasling P, Hanse E, Gustafsson B (2004) **Creation of AMPA-silent synapses in the neonatal hippocampus.** *Nat Neurosci* 7(3): 236-243.
- Xiong ZG, Pignataro G, Li M *et al.* (2008) **Acid-sensing ion channels (ASICs) as pharmacological targets for neurodegenerative diseases.** *Curr Opin Pharmacol* 8(1): 25-32.
- Yacubian EM (2004) **Tratamento medicamentoso das epilepsias.** 2.ed. São Paulo: Lemos-Editorial. 318p
- Yoshimura Y, Aoi C, Yamauchi T (2000) **Investigation of protein substrates of Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II translocated to the postsynaptic density.** *Brain Res Mol Brain Res* 81(1-2): 118-128.
- Zhou XH, Yang D, Zhang JH *et al.* (1989) **Purification and N-terminal partial sequence of anti-epilepsy peptide from the venom of the scorpion *Buthus martensii***

Karsch. *Biochem J* 257(2): 509-517.

Zukin SR, Young AB, Snyder SH (1974) **Gamma-aminobutyric acid binding to receptor sites in the rat central nervous system.** *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 71(12): 4802-4807.