

UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO

UNIDADE DE BIOTECNOLOGIA

**O ATIVADOR DE CANAIS DE POTÁSSIO PINACIDIL E SEUS POTENCIAIS
EFEITOS ANTICONVULSIVANTE E ANSIOLÍTICO**

Aluno: Artur Teixeira Pereira

Orientador: Prof. Dr. Renê de Oliveira Beleboni

RIBEIRÃO PRETO

ESTADO DE SÃO PAULO

2024

Artur Teixeira Pereira

O ATIVADOR DE CANAIS DE POTÁSSIO PINACIDIL E SEUS POTENCIAIS
EFEITOS ANTICONVULSIVANTE E ANSIOLÍTICO

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia, da Universidade de
Ribeirão Preto, como requisito para a obtenção do
título de doutor

Orientador: Prof. Dr. Renê de Oliveira Beleboni

Ribeirão Preto

ESTADO DE SÃO PAULO

2024

Ficha catalográfica preparada pelo Centro de Processamento
Técnico da Biblioteca Central da UNAERP

- Universidade de Ribeirão Preto -

PEREIRA, Artur Teixeira, 1990-

P436o O ativador de canais de potássio pinacidil e seus potenciais efeitos anticonvulsivante e ansiolítico / Artur Teixeira Pereira, Renê de Oliveira Beleboni. - Ribeirão Preto, 2024.
68 f. : il.

Orientador: Prof.º Dr.º Renê de Oliveira Beleboni.

Tese (Doutorado) - Universidade de Ribeirão Preto, UNAERP, Biotecnologia, 2024.

1. Ansiedade. 2. Canais Iônicos. 3. Epilepsia. 4. Pinacidil . 5. Reposicionamento de Drogas . II. BELEBONI, Renê de Oliveira, 1975-. III. Título.

CDD 660.6

ARTUR TEIXEIRA PEREIRA

**O ATIVADOR DE CANAIS DE POTÁSSIO PINACIDIL E SEUS POTENCIAIS
EFEITOS ANTICONVULSIVANTE E ANSIOLÍTICO**


Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto, para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde Humana e Animal.

Data da defesa: 05 de agosto de 2024


Resultado: Aprovado

BANCA EXAMINADORA


Documento assinado digitalmente
 **RENE DE OLIVEIRA BELEBONI**
Data: 06/08/2024 14:55:58-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Renê de Oliveira Beleboni


Prof. Dr. Geraldo Magela Nogueira Marques
PPGTA - Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP

Documento assinado digitalmente
 **GERALDO MAGELA NOGUEIRA MARQUES**
Data: 06/08/2024 15:22:11-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Profa. Dra. Erica Aparecida Gelfuso Rossete
TransCure bioServices SAS

Documento assinado digitalmente
 **ERICA APARECIDA GELFUSO ROSSETE**
Data: 06/08/2024 16:44:37-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Ana Lucia Fachin Saltoratto
PPGB - Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP

Documento assinado digitalmente
 **LUIZ LUCIANO FALCONI SOBRINHO**
Data: 06/08/2024 17:09:15-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Luiz Luciano Falconi Sobrinho
USP – Universidade de São Paulo

Documento assinado digitalmente
 **ANA LUCIA FACHIN SALTORATTO**
Data: 07/08/2024 08:16:08-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**RIBEIRÃO PRETO
2024**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, aos meus pais, Renato e Denize, pelo apoio incondicional ao longo de toda a minha vida. Expresso minha gratidão ao meu irmão Bruno, à minha cunhada Vanessa e ao meu afilhado Gabriel, que mesmo distantes, sempre torceram pelo meu sucesso. Não posso deixar de agradecer a uma pessoa muito especial, Marcelo, o meu sincero obrigado.

Também desejo expressar minha gratidão a toda a minha família, amigos e colegas de trabalho. Um agradecimento especial aos meus orientadores, Renê e Erica, e aos membros da banca, por aceitarem o convite para colaborar com o meu trabalho. Por fim, sou grato à Universidade de Ribeirão Preto, em nome da professora Priscilla Bonini, por me proporcionar a oportunidade de me especializar.

Muito Obrigado.

Sumário

1 INTRODUÇÃO	7
2 OBJETIVOS	22
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3 MÉTODOS	22
3.1 ANIMAIS	22
3.2 FÁRMACOS	23
3.3 BIOENSAIOS	23
3.3.1 Teste de Labirinto em Cruz Elevado	24
3.3.2 Teste de Transição Claro-Escuro.....	25
3.3.3 Teste do Campo Aberto (OPEN FIELD).....	25
3.3.4 Teste do Rota Rod	26
3.3.5 Estudo da Atividade Anticonvulsivante em Modelo Agudo.....	26
3.3.6 Estudo da Atividade Anticonvulsivante em Modelo Crônico Kindling PTZ.....	27
3.3.7 Análise Bioquímica.....	28
3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	29
4 RESULTADOS	29
4.1 Testes Anticonvulsivantes Agudo.....	29
4.2 Testes Ansiolíticos.....	31
4.2.1 Open Field.....	31
4.2.2 Labirinto em Cruz Elevado.....	32
4.2.3 Teste de Caixa Claro-Escuro.....	34
4.2.4 Comprometimento motor – Rotarod Agudo.....	35
4.2.5 Ensaio Crônicos PTZ.....	36

4.2.6 Avaliação Bioquímica.....	36
4.2.8 Comprometimento motor – Rotarod Crônico.....	38
5 DISCUSSÃO.....	39
6 CONCLUSÃO.....	46
REFERÊNCIAS	47
ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA I.....	66
ANEXO B - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA II.....	67

RESUMO

A epilepsia é uma desordem neurológica comum que frequentemente aparece em comorbidade com a ansiedade. Apesar da diversidade de drogas disponíveis para o controle dessas desordens, existe também uma gama de efeitos colaterais associados que afetam a adesão terapêutica, motivando a busca por novas opções medicamentosas. Os ativadores de canais de potássio têm aparecido como uma nova possibilidade de tratamento para a epilepsia e, por consequência, para ansiedade. O Pinacidil, um anti-hipertensivo comercial, é um fármaco ativador de canais de potássio sensíveis ao ATP, para o qual nada ou muito pouco tem sido estudado em relação aos seus potenciais efeitos anticonvulsivante e/ou ansiolítico. O objetivo deste trabalho foi o de avaliar os potenciais efeitos anticonvulsivante e ansiolítico de diferentes doses do pinacidil em modelos animais adequados. Foram empregados modelos agudos de convulsão (Pilocarpina e PTZ) e crônico de epilepsia (Kindling PTZ) na indução de convulsões e/ou crises epiléticas para avaliação do potencial desempenho farmacológico do pinacidil. Os testes do Campo Aberto, Labirinto em Cruz Elevado, Transição Claro-Escuro foram empregados para avaliação da atividade ansiolítica e o teste do Rotarod para avaliação do desempenho motor dos animais sob a influência do pinacidil em teste. Além disso, testes bioquímicos para a função renal e hepática de animais tratados cronicamente com o pinacidil foram utilizados para verificação de sua tolerabilidade pelos animais. Os resultados obtidos mostraram que o pinacidil na dose de 10 mg/Kg (i.p.) protege em 100% os animais contra crises convulsivas induzidas por PTZ e em 85.7%; 100% e 100% respectivamente nas doses de 2.5; 5 e 10 mg/Kg (i.p) contra as crises induzidas por pilocarpina. Muito embora as doses de 2.5 e 5 mg/kg (i.p) de pinacidil não protejam significativamente os animais da ocorrência de crises, as mesmas aumentam significativamente o tempo de latência para primeira crise induzida no teste de PTZ. O pinacidil ainda apresenta discreta atividade ansiolítica, sobretudo na dose de 10 mg/Kg (i.p), conforme demonstrado pelo aumento do tempo de permanência dos animais tratados nos ambientes abertos ou iluminados dos testes do Labirinto em Cruz Elevado (EPM) e Teste da Caixa Claro-Escuro (CCE) e pelo aumento da atividade exploratória dos animais nos testes do Open Field, EPM e CCE. No teste do kindling de PTZ foi demonstrado

que o pinacidil bloqueia a ocorrência de crises epilépticas ao longo dos dias de experimentação, bem como reduz significativamente a severidade das crises em animais não completamente protegidos nos primeiros dias de experimento. O pinacidil não afeta o desempenho motor dos animais conforme demonstrado por diferentes testes no rotarod, o que corrobora os seus efeitos anticonvulsivantes e/ou antiepilépticos genuínos. Além disso, o pinacidil é bem tolerado pelos animais, não produzindo alterações bioquímicas nos marcadores da função renal e hepática mesmo após o uso de doses repetidas de tal fármaco. Assim, o presente trabalho apresenta marcada valia médico-farmacêutica, caracterizando pela primeira vez os efeitos anticonvulsivantes e ansiolíticos do pinacidil, sendo dados importantes para o seu potencial reposicionamento terapêutico.

PALAVRAS-CHAVES: Ansiedade; Canais Iônicos; Epilepsia, Modelagem animal; Pinacidil; Reposicionamento de Drogas

ABSTRACT

Epilepsy is a common neurological disorder often comorbid with anxiety. Despite the wide variety of drugs available to manage these disorders, there is also a range of associated side effects that affect therapeutic adherence, driving the search for new medicinal options. Potassium channel activators have emerged as a new potential treatment for both epilepsy and anxiety. Pinacidil, a commercially available antihypertensive drug, is an ATP-sensitive potassium channel activator. However, its potential anticonvulsant and/or anxiolytic effects have been minimally studied. This study aimed to evaluate the potential anticonvulsant and anxiolytic effects of various doses of pinacidil in suitable animal models. Acute seizure models (pilocarpine and PTZ) and a chronic epilepsy model (PTZ kindling) were used to induce seizures and/or epileptic crises to assess the pharmacological performance of pinacidil. The Open Field Test, Elevated Plus Maze, and Light-Dark Transition Test were employed to evaluate anxiolytic activity, while the Rotarod Test assessed motor performance in animals under the influence of pinacidil. Additionally, biochemical tests for renal and hepatic function were conducted on animals chronically treated with pinacidil to verify its tolerability. The results showed that pinacidil at a dose of 10 mg/kg (i.p.) provided 100% protection against PTZ-induced seizures and 85.7%, 100%, and 100% protection at doses of 2.5, 5, and 10 mg/kg (i.p.), respectively, against pilocarpine-induced seizures. Although doses of 2.5 and 5 mg/kg (i.p.) did not significantly protect against seizures, they significantly increased the latency time to the first PTZ-induced seizure. Pinacidil also demonstrated mild anxiolytic activity, especially at a dose of 10 mg/kg (i.p.), as evidenced by increased time spent in open or illuminated areas in the Elevated Plus Maze (EPM) and Light-Dark Box (LDB) tests, and increased exploratory activity in the Open Field, EPM, and LDB tests. In the PTZ kindling test, pinacidil blocked the occurrence of epileptic seizures over the days of experimentation and significantly reduced the severity of seizures in animals not completely protected in the initial days. Pinacidil did not affect the locomotor performance of the animals, as demonstrated by various Rotarod tests, supporting its genuine anticonvulsant and/or antiepileptic effects. Furthermore, pinacidil was well tolerated, with no biochemical alterations in renal and hepatic function markers, even after repeated doses. In conclusion, this study provides significant

medical-pharmaceutical value, characterizing for the first time the anticonvulsant and anxiolytic effects of pinacidil, offering important data for its potential therapeutic repositioning.

Keywords: Animal Models; Anxiety; Drug repositioning; Ion Channels; Epilepsy; Pinacidil.

Lista de Figuras, Quadros e Tabelas

Figura 1	Prevalência de epilepsia no mundo, 2016.....	8
Figura 2	Prevalência de epilepsia por idade e sexo 2016.....	9
Figura 3	Estrutura química do Pinacidil.....	21
Figura 4	Efeitos das drogas antiepilépticas no escore máximo de Racine.....	30
Figura 5	Resultados da análise comportamental no Teste de Campo Aberto.....	32
Figura 6	Resultados da análise comportamental Labirinto em Cruz Elevado.....	33
Figura 7	Efeito do tratamento em ratos avaliados em Teste de Caixa Claro-Escuro.....	35
Figura 8	Ensaio Crônico de PTZ.....	36
Figura 9	Resultado da avaliação Bioquímica.....	37
Quadro 1	Principais drogas antiepilépticas utilizadas na clínica, seus mecanismos de ação e indicações.....	13
Quadro 2	Classificação e descrição dos transtornos de ansiedade.....	16
Quadro 3	Aplicação do Modelo KINDLING - PTZ em dias.....	28
Tabela 1	Índice de desempenho convulsivante de Racine (1972) modificado por Pinel & Rovner (1978).....	27
Tabela 2	Critérios comportamentais para classificação das crises límbicas. (Modificada de Racine e colaboradores, 1972)...	28
Tabela 3	Latência até o início da convulsão (pontuação 7-8) em tratamentos com pinacidil.....	31
Tabela 4	Porcentagem de tempo em braços abertos durante tratamentos com pinacidil.....	34
Tabela 5	Latência até o início das quedas em tratamentos Agudo com pinacidil.....	35
Tabela 6	Avaliação Toxicológica.....	38

Tabela 7	Latência até o início da convulsão (pontuação 7-8) em tratamentos com pinacidil modelo Crônico de PTZ.....	38
----------	--	----

Lista de Abreviaturas e Siglas

ADTs	Antidepressivos Tricíclicos
AMPA	α -Amino-3-Hidroxi-5-Metil-4-Isoxazol Propiônico
CE	Crise Epilética
DAEs	Drogas Antiepilépticas
DDP	Desvio Despolarizante Paroxístico
GABA	Ácido Gama-Aminobutírico
HPA	Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
K ⁺	Potássio
LCE	Labirinto em Cruz Elevado
MNDA	N-Metil-D-Aspartato
OMS	Organização Mundial da Saúde
PEPS	Potencial Pós-Sináptico Excitatório
PIPS	Potencial Inibitório Pós-Sináptico
PTZ	Pentilenotetrazol
SE	Status Epilepticus
SNC	Sistema Nervoso Central
TFT	Taxa de Fecundidade Total
TNF- γ	Fator de Necrose Tumoral
WHO	World Health Organization

1. INTRODUÇÃO

A epilepsia é considerada uma doença cerebral crônica identificada por uma hiperatividade neuronal anormal, acarretando descargas elétricas sincrônicas, repetidas e autossustentadas. Esta patologia é conhecida há séculos, apresentando casos já relatados acerca de 2000 a.C. em textos Sumérios e, posteriormente na Grécia antiga. Com a falta de conhecimento da época, povos antigos relacionaram a epilepsia as possessões demoníacas, bruxaria ou magia. Tal fato levou a uma falsa crença e misticismo pernicioso, sendo perpetuada por séculos, embora Hipócrates já houvesse explicado que o cérebro era o responsável pelos sintomas apresentados, em um livro intitulado “Da Doença Sagrada” (considerada uma das obras de maior impacto do *Corpus hippocraticum*) (MOREIRA, 2004; MARIANI; REKTOR et al., 2013; BOU NASIF M; KOUBEISSI M; AZAR N.J, 2021).

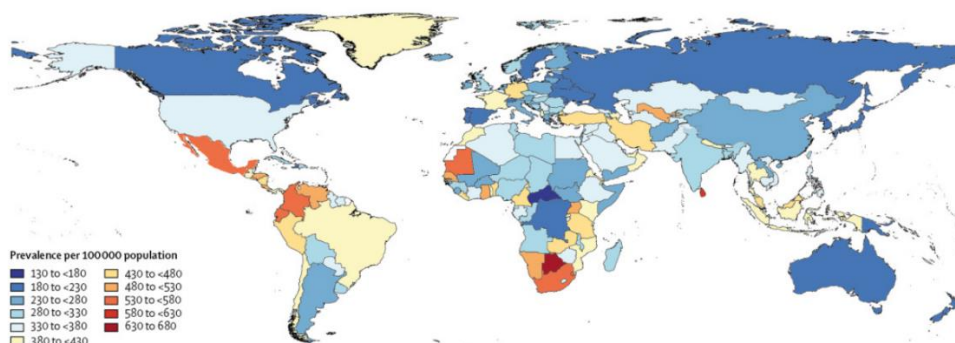
A partir de novos estudos, já no século XIX, a epilepsia começou a ser aceita como uma doença de origem cerebral. Um dos pioneiros, John Hughlings Jackson, a partir de seus estudos, indicou uma base anatômica e fisiológica organizada para a hierarquia e localização das funções cerebrais envolvidas na epilepsia, com o objetivo de desenvolver um tratamento para a doença. Dessa forma, ele comprovaria que se tratava de uma doença e não de uma atribuição espiritual como sustentado nos séculos anteriores (FERNANDES et al., 2013; LEBLANC R., 2020).

Mesmo com os avanços das pesquisas sobre o assunto, a etiologia da doença não é totalmente entendida. Algumas causas para seu desencadeamento são hemorragias cerebrais, baixa oxigenação cerebral, traumas e infecções cerebrais, crises hipertérmicas, intoxicações por drogas e patologias congênitas relacionadas ao Sistema Nervoso Central (SNC), dentre tantas outras. Porém, e em muitos casos, não é possível identificar a causa, dessa forma, as pesquisas constantes sobre o assunto se fazem necessárias (MASIA; DEVINSKY, 2000; THOMAS, 2010; OMELCHENKO A, SINGH N,K; FIRESTEIN B,L., 2020). A partir dos estudos realizados sobre o assunto, foi definido que uma Crise Epilética (CE) é uma manifestação clínica de alteração cerebral transitória podendo apresentar um período de excitação com a contração involuntária dos músculos, associados a movimentos assíncrônicos com perda de consciência. A epilepsia não se restringe à manifestação de uma CE,

havendo estudos que demonstram que o comprometimento cognitivo é um sintoma comum em pacientes epiléticos (KIM, 2016; SCHARFMAN, 2007; CARRIZOSA-MOOG J., 2022).

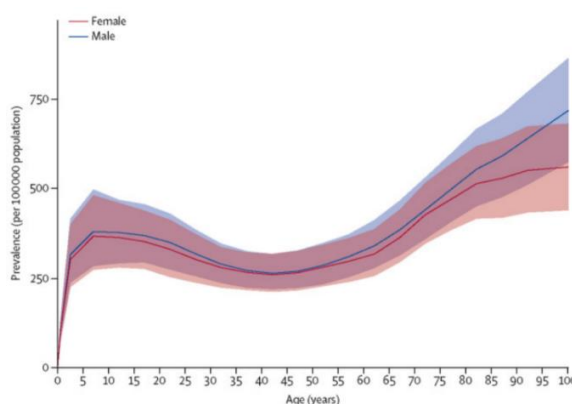
Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) demonstram que a epilepsia é uma das patologias mais comuns e mais incapacitantes, afetando aproximadamente 50 milhões (0,4-1%) de pessoas em todo o mundo. Deste total, 90% vivem em países em desenvolvimento (Figura 1).

FIGURA 1 | Prevalência de epilepsia no mundo, 2016.



Existe um conceito que a epilepsia tradicionalmente é uma doença da primeira infância. De fato, a maioria dos casos aparecem logo no primeiro ano de vida, principalmente quando a epilepsia se relaciona com síndromes genéticas e complicações da vida perinatal da criança, e entre 5 e 9 anos, segundo dados da OMS (Figura 2). Todavia, outra fase da vida com maior prevalência identificada é a partir dos 65 anos, sendo o pico em torno dos 80 anos. Dessa forma, a epilepsia hoje é caracterizada também como uma doença de idosos. Outro fato importante a ser destacado é que a patologia não está ligada ao fator gênero, não havendo variação significativa na prevalência entre homens e mulheres (OMS, 2016).

FIGURA 2 | Prevalência de epilepsia por idade e sexo 2016.



Em muitos países a epilepsia é considerada um problema de saúde pública, principalmente em regiões onde os recursos tanto de profissionais, quanto de medicamentos e infraestrutura, sejam escassos (WHO, 2012). No Brasil, segundo dados do último censo demográfico (IBGE, 2012), supõe-se que 1.907.327 indivíduos sejam acometidos pelos diferentes tipos de epilepsia, com prevalência média 4 casos/1000 habitantes.

Pessoas com epilepsia têm crises recorrentes não provocadas, ocorrendo assim de forma espontânea. As crises podem ser de natureza focal, onde o evento epilético pode ser originado num ponto de um ou ambos os hemisférios cerebrais, ou generalizada, com uma origem em uma parte que abrange os dois hemisférios do cérebro. Esta segunda forma é mais grave e mais prolongada ou repetida em intervalos mais curtos, caracterizando o estado de mal epilético maior (GALLUCCI et al., 2005; NICKELS K., 2022).

Em 2017, a *International League Against Epilepsy* classificou a epilepsia em seis grupos etiológicos, sendo eles metabólico (alteração metabólica capaz de gerar efeitos sistêmicos que vão desencadear a epilepsia), infeccioso (consequência de processo infeccioso que levou a uma inflamação e desencadeou a epilepsia), genético (epilepsia causada por defeito genético presumido ou conhecido), anatômico (lesão estrutural identificada por exames de imagem, sugerindo assim uma relação direta da lesão com a crise epilética), imunológico (processo autoimune que leva a inflamação do sistema nervoso central) e um grupo “desconhecido”, quando não se

enquadra em nenhuma das outras categorias anteriormente elencadas (FISHER et al., 2017).

A partir dos estudos de classificação, os trabalhos referentes ao processo inflamatório, mais especificamente a inflamação de células neurais (neuroinflamação), pôde se estabelecer um mecanismo importante na fisiopatologia das convulsões e da epilepsia (VEZZANI et al., 2011; PALUMBO L et al., 2023). Doenças cerebrais de caráter inflamatório podem elevar a probabilidade de um paciente desenvolver a patologia (OLIVEIRA, 2009; NICKELS K., 2022). Pacientes com crises epiléticas foram submetidos a exames, sendo encontrados tanto no plasma sanguíneo quanto no sistema nervoso central (SNC), a presença de prostaglandinas e citoninas anti/pró-inflamatórias específicas (HANISCH e KETTENMANN, 2007; KOPEIKINA E et al., 2020). Esses mediadores inflamatórios normalmente são produzidos pelo sistema imunológico devido à ação de agentes patológicos. Entretanto, a partir de estudos, foi comprovado que os mesmos mediadores são produzidos por células do parênquima cerebral como neurônios e células da gliais, além das células da barreira-hematoencefálica, de forma a piorar a lesão e elevar a excitabilidade neuronal em muitos tipos de epilepsias (VEZZANI; GRANATA, 2005; MIRA R. G; LIRA M; CERPA W, 2021). De fato, em modelos animais de epilepsia, são observados intensa ativação das células gliais e conseqüentemente, de mediadores inflamatórios em diferentes áreas cerebrais (RANSOHOFF; PERRY, 2009; PALUMBO L et al., 2023).

As células de defesa do SNC se dividem em micróglia e macroglia (oligodendrócitos e astrócitos). A micróglia possui uma atividade dupla, ambas relacionadas à defesa do SNC. Quando em repouso, ela apresenta função de verificar se existe alguma alteração patológica no parênquima cerebral. Quando ativada, é uma importância forma de defesa do SNC, porém pode agir de forma exacerbada piorando a lesão ou gerando uma possível epilepsia (NIMMERJAHN et al., 2005; MIRA R. G; LIRA M; CERPA W, 2021). A elevação no número de astrócitos é outro fator a ser considerado na neuroinflamação, sendo este encontrado em casos de epilepsia do lobo temporal. Essas células possuem duas formas morfológicas: as fibrilares, que são encontradas na substância branca e, as protoplasmáticas que são encontradas na substância cinzenta (WETHERINGTON et al., 2008; AL-DALAHMAH et. Al., 2024). Dentre suas funções, podemos destacar a manutenção de baixas concentrações intersticiais de glutamato, através da captação desse neurotransmissor, de forma a

controlar a excitabilidade neuronal e regular o balanço entre a estabilidade endotelial e a permeabilidade da barreira-hematoencefálica (CHOI, 2009; KHEZERLOU E; PRAJAPATI N; DECOSTER M. A, 2021).

Quando ocorre lesão no cérebro, sobretudo nas chamadas áreas límbicas, além do aumento de mediadores inflamatórios e das células de defesa da micróglia, ocorre aumento de células gliais, num processo chamado gliose reativa. Este é um evento bem característico de lesões que estejam relacionadas á epilepsias. A gliose reativa é produto de alterações bioquímicas e morfológicas nos astrócitos pré-existentes, bem como na formação de novos astrócitos. Essas células, quando ativadas, estimulam uma resposta inflamatória aguda com a liberação de citocinas pró-inflamatórias na região da lesão, podendo levar a uma “cicatriz gial” característica de diferentes tipos de epilepsia, com aquela do Lobo Temporal. A homeostase do SNC é essencial para manutenção e controle de CE, e a partir do conhecimento de suas funções e dos processos inflamatórios subjacentes a epilepsia e suas diferentes causas, é possível minimizar os efeitos gerados pela patologia, sobretudo a partir do da prevenção de lesões e de seu correto tratamento (BUFFO et al, 2010; MIRA R. G; LIRA M; CERPA W, 2021).

As funções cerebrais precisam ser plenas e reguladas harmonicamente para perfeita homeostase cerebral. Por exemplo, a geração do potencial de ação é de suma importância para desencadear o funcionamento do SNC, ocorrendo quando o potencial da membrana da célula vai de -70 mV até 30 mV de forma rápida. Tal processo é mediado por canais iônicos sensíveis à voltagem. A interação entre os neurônios ocorre quando há a liberação de um neurotransmissor de um axônio terminal pré-sináptico que, ao se ligar ao seu respectivo receptor na membrana pós-sináptica, leva a alterações no potencial de membrana na região terminal pós-sináptico. No caso da sinapse excitatória, o neurotransmissor faz com que os íons Na^+ se encaminhem para a célula pós-sináptica por via de canais específicos, de forma a causar uma despolarização denominada de potencial pós-sináptico excitatório (PEPS). Já uma sinapse inibitória, o neurotransmissor acarreta um influxo de íons Cl^- o que vai gerar uma hiperpolarização chamada de potencial inibitório pós-sináptico (PIPS) (BADAWYVEY; MACDONELL, 2009; STEIN W et al., 2022). O desvio despolarizante paroxístico (DDP) é um evento intracelular, ele ocasiona uma série de despolarizações repetitivas com duração de vários milissegundos, ocasionado por

vários PEPS e controlada por receptores do ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico (AMPA) e receptores do N-metil-D-aspartato (NMDA), sendo assim uma ação exagerada, anormal e prolongada do glutamato. No que tange a epilepsia, o estágio inicial das crises tônico-clônicas está relacionado a uma diminuição repentina da inibição GABAérgica, e por consequência, nas despolarizações repetidas (GRIFFIN; LOWENSTEIN, 2009; RAWAL B; BALLANYI K, 2022).

As CEs não podem ser totalmente controladas em cerca de um terço das pessoas afetadas pela epilepsia, muito embora vários medicamentos anticonvulsivantes possam ter sido empregados isoladamente ou associados. Este fenômeno ocorre devido à resistência a drogas por uma gama de fatores (SCHMIDT e LÖSCHER, 2005; GONG G, 2020). As drogas antiepilépticas (DAEs) podem ser definidas como substâncias que, quando ministradas por um período, podem reduzir a incidência ou gravidade dos quadros epiléticos que acometem indivíduos com crises. Tais medicamentos tem a função de prevenir ou atenuar a CE, de forma a permitir que ocorra a homeostase do SNC. As DAEs podem agir por vários tipos de mecanismos de ação em canais iônicos, receptores ou transportadores sinápticos específicos (ROGAWSKI; LÖSCHER, 2004; JARADA T,N; ROKNE J,G; ALHAJJ R., 2020). Como dito, pelo menos 30% dos pacientes apresentam epilepsia resistente a medicamentos, apresentando epilepsia refratária e continuam a sofrer convulsões, apesar da terapia instituída (DEVINSKY et al., 2017; KUMAR g., 2021).

Atualmente, existe no mercado um enorme arsenal de drogas antiepilépticas que atuam com alguma seletividade no sistema nervoso central (SNC) (GUERREIRO, 2006; GARCÍA-RODRÍGUEZ C et al., 2023). Os anticonvulsivantes apresentam mais de uma geração, sendo representados principalmente pelo o diazepam, fenobarbital, carbamazepina, fenitoína, e valproato de sódio. Apesar de terem efeito no controle das crises, apresentam vários efeitos colaterais que estimulam a busca de novas drogas (ABBASKHANIAN A, SHEIDAEE K, CHARATI J.Y, 2021). Pesquisas recentes sobre possíveis DAEs foram incorporadas a novos conceitos. Neste novo conceito as drogas deveriam não apenas atuar na epileptogênese, inibindo o desenvolvimento e a progressão da epilepsia, mas também evitar que os efeitos colaterais mais sérios sejam evitados.

Numerosos mecanismos têm sido propostos para a ação de drogas antiepilépticas, mas em geral eles agem principalmente através de três mecanismos apresentados abaixo (JARADA T,N; ROKNE J,G; ALHAJJ R., 2020). As drogas mais utilizadas na clínica são citadas no Quadro 1 apresentando seus efeitos adversos, mecanismo de ação e indicação clínica.

QUADRO 1 | Principais drogas antiepilépticas utilizadas na clínica, seus mecanismos de ação e indicações.

Droga	Efeitos Adversos	Mecanismo de ação	Indicação Clínica
Barbitúricos (Fenobarbital)	Depressão; acidose respiratória; hipotensão; bradicardia; hipotermia; erupção; sonolência; letargia; ataxia.	Modulação alostérica de GABA _A	Convulsões tônico-clônicas generalizadas e parciais
Benzodiazepínicos (Diazepam)	Sedação, tolerância	Aumento da ação de GABA	Ausência; convulsões parciais e febris
Carbamazepina	Sedação, ataxia, retenção hídrica, pode haver graves reações de hipersensibilidade	Bloqueio de canais de Na ⁺ dependentes de voltagem	Convulsões tônico-clônicas generalizadas, parciais e da epilepsia do lobo temporal
Etossuximida	Náusea e anorexia	Bloqueio de canais de Ca ⁺² dependentes de voltagem tipo T	Convulsões parciais e crises de ausência
Felbamato	Visão dupla, tontura, náuseas, dor de cabeça, exantema e leucopenia	Bloqueio de canais de Na ⁺ dependentes de voltagem e bloqueando os canais de Ca ⁺² do tipo T	Convulsões parciais e generalizadas
Gabapentina	Sedação leve, náuseas, efeitos no comportamento, distúrbios de movimento, ganho de peso	Agonismo GABAérgico	Convulsões parciais
Hidantoínas (Fenitoína)	Sedação e anemia megaloblástica	Bloqueio de canais de Na ⁺ dependentes de voltagem	Convulsões tônico-clônicas generalizadas e parciais
Lamotrigina	Rash, diplopia, sedação, síndrome de Stevens-Johnson, necrólise epidérmica tóxica	Bloqueio de canais de Na ⁺ dependentes de voltagem e o bloqueio indireto da liberação do glutamato	Coadjuvante para convulsões parciais em adultos; síndrome de Lennox-Gastaut; epilepsia generalizada
Leviracetam	–	Mecanismo desconhecido	Convulsões parciais e generalizadas
Oxycarbazepina	Sonolência, fadiga, cefaléia, tontura, ataxia e vômito	Mecanismo desconhecido	Convulsões parciais
Primidona	Anemia megaloblástica, interações farmacológicas por indução enzimática	Metabolização a barbituratos	Convulsões parciais e generalizadas
Topiramato	Alterações do pensamento, dificuldade de encontrar as palavras, perda de peso, parestesias, nefrolitíase	Bloqueio de canais de Na ⁺ dependentes de voltagem e antagonismo do receptor do glutamato	Coadjuvante no tratamento de crises parciais em adultos e crianças; epilepsia generalizada
Tiagabina	nervosismo, tonteiras, perda de peso	Inibição seletiva da recaptação de GABA	Coadjuvante de crises parciais em adultos
Valproatos	Hepatotoxicidade, perda de pêlos, mal formações fetais	Interfere com a excitação mediada pelo glutamato e bloqueio de canais de Na ⁺ dependentes de voltagem	Epilepsias generalizadas idiopáticas, mioclônicas e crises de ausência
Vigabatrina	Sedação, náuseas, ganho de peso, depressão, psicose, diminuição do campo visual	Aumento dos níveis de GABA, pela inibição da GABA transaminase	Crises parciais e generalizadas

Fonte. Adaptado de PORTO, 2007

No que diz respeito ao tratamento, são observados diferentes padrões de resposta. Alguns pacientes têm respostas satisfatórias e deixam de apresentar crises. Outros, porém, podem apresentar resistência ao tratamento, onde o indivíduo nunca experimenta um período sem convulsões desde o início da terapia. A resistência tardia ocorre quando o paciente inicialmente fica livre de crises, mas elas se repetem e se

tornam incontroláveis com o passar do tempo. A classificação de resistência flutuante se dá quando a epilepsia alterna entre ser controlada e não controlada (CHEN et al., 2018; SERAFINI R, 2021).

O diagnóstico da epilepsia é feito através dos sinais clínicos, anamnese e realização de exames complementares como eletroencefalograma, tomografia e ressonância magnética (PEDLEY et al., 2006; YAN R, 2021). Geralmente o diagnóstico da epilepsia é acompanhado de outros achados clínicos, como algumas comorbidades, ansiedade e depressão mais especialmente.

Uma comorbidade relacionada à epilepsia é a ansiedade, esta correlação apresenta uma relação complexa e frequentemente interconectada, influenciando-se mutuamente de várias maneiras. Estudos indicam que a ansiedade é significativamente mais prevalente em indivíduos com epilepsia em comparação com a população geral, com estimativas sugerindo que até 25-50% dos pacientes com epilepsia podem experimentar algum tipo de transtorno de ansiedade (PAVONE, P et al., 2020).

A epilepsia pode causar alterações neuroquímicas no cérebro que também estão associadas à ansiedade. Disfunções nos sistemas de neurotransmissores, como o GABA, glutamato, além de diversas canalopatias que desempenham um papel crucial em ambas as condições. Além disso, certas áreas do cérebro, como o hipocampo e a amígdala, estão frequentemente envolvidas em crises epiléticas e em sintomas de ansiedade. Lesões ou disfunções nessas áreas podem contribuir para o desenvolvimento das duas condições, que como visto apresentam bases neuroquímicas comuns (COLANGELI R; MORENA M; PITTMAN Q, J; HILL M, N; TESKEY G, C, 2020).

A presença de uma condição crônica como a epilepsia aumenta o risco de desenvolver transtornos de ansiedade devido ao estresse constante e à preocupação com as crises. A ansiedade em pacientes com epilepsia pode manifestar-se em diferentes fases das crises epiléticas: pré-ictal, ictal e pós-ictal. Cada uma dessas fases tem características específicas que podem influenciar a experiência geral do paciente e a abordagem terapêutica (TARRADA, A.; ARON, O.; VIGNAL, J. P.; ERTAN, D.; MAILLARD, L.; HINGRAY, C, 2022).

Com frequência, o tratamento da epilepsia está associado à ansiedade, de forma que muitos dos fármacos com efeitos anticonvulsivantes também têm

propriedades ansiolíticas. Isso ocorre porque eles compartilham bases neuroquímicas comuns, especialmente aqueles que modulam canais iônicos e/ou os sistemas GABAérgico e glutamatérgico. Esses sistemas desempenham papéis cruciais na regulação da excitabilidade neuronal e no controle das crises epilépticas, bem como na modulação da ansiedade no sistema nervoso central (DEVINSKY et al., 2017; DE OLIVEIRA et al., 2020).

A ansiedade é por si só é definida como uma resposta fisiológica e adaptativa do organismo ao ambiente e às situações de vida, caracterizada por componentes psicológicos, sociais e fisiológicos que podem afetar o indivíduo em qualquer fase do desenvolvimento. Até certo ponto, a ansiedade é importante para a adaptação, no entanto, quando se torna excessiva, frequente e desproporcional, é considerada um transtorno psiquiátrico, com muitos inconvenientes e agravos sociais, econômicos e pessoais (GOMES, 2018; RUIZ-FERNÁNDEZ M. D et al., 2021).

Mundialmente, os transtornos de ansiedade são mais usuais em mulheres (4,6 %) do que em homens (2,6 %) e, nas américas os números chegam a 7,7 % para as mulheres enquanto os homens representam 3,6 %. Dados mostram que no Brasil, 9,3 % da população é acometida com algum tipo de transtorno de ansiedade, razão pela qual o país está no topo global em termos de prevalência de casos de ansiedade patológica. Devido a variação dos sintomas da doença e os seus diferentes tipos, foi necessário separar e dividir os transtornos de ansiedade de acordo com suas características em específico, como demonstrado no Quadro 2 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

QUADRO 2 | Classificação e descrição dos transtornos de ansiedade.

Transtorno de ansiedade	Descrição
Transtorno de ansiedade generalizada	Ansiedade flutuante, nervosismo, tremores, sensação de vazio na cabeça, palpitações, transpiração, tonturas, desconforto epigástrico e medo de doença ou acidente em relação a si e a pessoas próximas
Transtorno obsessivo compulsivo	Recorrência e persistência de comportamento compulsivo e pensamentos obsessivos que causam sofrimento ao indivíduo.
Transtorno do pânico	Ataques de pânico imprevisíveis que levam a dores torácicas, taquicardia, sensação de asfixia, tonturas, calafrios ou onda de calor, parestesias, despersonalização, desrealização, medo de morrer, perder o autocontrole ou a lucidez
Transtorno de estresse pós-traumático	Presença constante de memória e sonhos desagradáveis (de um evento traumático), agir ou sentir que o trauma está acontecendo novamente, desconforto psicológico intenso e reatividade fisiológica diante de situações ou pessoas que lembrem o trauma.
Agorafobia	Medo excessivo de sair de casa, viajar sozinho, lojas, multidões, locais e transporte públicos. Além disso entre os sintomas associados é comum a presença de sintomas depressivos e obsessivos (fobia social).
Fobias específicas	Medo irracional de um objeto ou situação altamente específica que pode interferir intensamente na vida do indivíduo ao provocar ataques de pânico ou fobia social.
Transtorno de ansiedade social	Medo ou ansiedade acentuada de exposição pública, de observação e de críticas, perda de autoestima, tremor, rubor, náuseas, urgência miccional e possibilidade de ataques de pânico.
Transtorno misto de ansiedade e depressão	Presença simultânea e sem predomínio tanto de ansiedade como de depressão.
Ansiedade da separação	Ansiedade excessiva em relação a possível separação de alguém próximo, principalmente na infância.
Mutismo seletivo	Falta de fala em situações em que há expectativa de conversa, mesmo que o indivíduo fale em outros momentos.

Fonte. Adaptado de BANDELOW; MICHAELIS e WEDEKIND, 2017

A ansiedade é desencadeada por estímulos aversivos, que induzem uma resposta inadequada ao estresse, regulada pelo sistema nervoso, incluindo ativação inadequada do hipocampo e outras áreas do sistema límbico. Esses são responsáveis

por analisar as circunstâncias e compará-las com experiências anteriores e promover respostas de luta ou fuga. A comunicação entre essas estruturas é mediada por neurotransmissores e estimulada pela manipulação de neuropeptídeos, hormônios do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), colecistocinina, monoaminas, esteróides como cortisol e aminoácido L. - Glutamato ácido gama-aminobutírico (GABA) e glicina (GOMES et al., 2018; DICKS L. M. T, 2022).

A grande vantagem de utilizar tratamentos que envolvem o neurotransmissor ácido gama-aminobutírico (GABA) é que ele é considerado o principal neurotransmissor inibitório do SNC, além de estar presente em quase todas as regiões do encéfalo, embora sua concentração varie conforme a região, ele desempenha um papel fundamental no controle da ansiedade. A maioria dos efeitos da ansiedade são devidos a uma diminuição na atividade dos neurônios no sistema límbico. Quando o GABA ativa seu receptor GABAA (um receptor acoplado ao canal seletivo de íons cloreto), ocorre uma alteração na conformação e abertura desses canais, causando o influxo de Cl⁻ e a hiperpolarização da membrana do neurônio pós-sináptico, resultando na redução dos impulsos nervosos (SCHINDELIN, 2019; JIMÉNEZ-DINAMARCA I et al., 2022).

A evolução no tratamento dessa doença tem acompanhado os tratamentos de outras psicopatologias. Há alguns anos, a única forma de tratamento para a ansiedade envolvia a administração de fármacos da classe dos benzodiazepínicos, que apresentam efeito ansiolítico. No entanto, atualmente, as principais estratégias para o manejo desse transtorno incluem o uso de outros tipos de fármacos, que proporcionam efeitos a médio e longo prazo, e/ou psicoterapia cognitivo-comportamental (TAKESHIMA M et al., 2021). A terapia cognitivo-comportamental consiste em provocar uma mudança na percepção e no raciocínio sobre o ambiente e especificamente sobre a causa da ansiedade e mudanças no comportamento ansioso (KNOWLES K. A, TOLIN D.F, 2024). A gama de medicamentos disponíveis no mercado possibilita ao profissional responsável utilizar a melhor droga de acordo com a sintomatologia expressa pelo paciente, levando em consideração as comorbidades do mesmo e os efeitos colaterais que o medicamento pode acarretar (RICKELS et al., 2000; JARADA T,N; ROKNE J,G; ALHAJJ R., 2020).

As principais classes farmacológicas empregadas no tratamento da ansiedade também são utilizadas no tratamento da epilepsia. Os barbitúricos foram a

primeira classe sintetizada com intuito de realizar o controle das patologias citadas, porém apresentaram elevados índices de parada respiratória (DURANT, CHRISTMAS, NUTT, 2010; WACHEŁKO O, TUSIEWICZ K, ZAWADZKI M, SZPOT P, 2023). Em seguida outras classes foram apresentadas, os benzodiazepínicos, apesar de controlarem as crises, assim como os barbitúricos, apresentam efeitos colaterais como principalmente sonolência e dependência física (ATACK, 2011; VENKATACHALAM K, ZHONG S, DUBIEL M, SATAŁA G, SADEK B, STARK H, 2022.). Uma outra possibilidade na terapia dessas patologias (epilepsia e ansiedade) é diagnosticar a causa base, sendo as canalopatias um dos principais alvos da atualidade (GITAÍ et al., 2008; SAKLA M, BREITINGER U, BREITINGER H. G, MANSOUR S, NABIL TAMMAM S, 2023).

As Canalopatias são denominadas doenças hereditárias ou autoimunes que levam a uma atividade irregular de um canal iônico específico. As doenças consideradas hereditárias são geradas por mutações nos genes que codificam essas macromoléculas (COOPER; LY, 2003; VAN LOO K. M. J, BECKER A. J, 2020). Tanto em canais sensíveis à voltagem (K^+ , Na^+ , Cl^- e Ca^{2+}) quanto em canais sensíveis a ligantes como o receptor acetilcolina (nAChR), nicotínico, receptor GABAA do GABA e os receptores NMDA e AMPA do glutamato (GITAÍ et al., 2008; JIMÉNEZ-DINAMARCA I et al., 2022).

Os canais iônicos são proteínas transmembranares que possuem a função de regular o fluxo de íons pela membrana celular, sendo ativados por ligação de moléculas específicas ou alteração do potencial de membrana (AVANZINI; FRANCESCHETTI; MANTEGAZZA, 2007; ROSENBAUM T, MORALES-LÁZARO S. L, 2023.). Os canais iônicos associados à epilepsia são classificados de acordo com os estímulos que os provocam em associação à proteína G, dependentes de voltagem, associados a segundo mensageiro e operados por ligantes (RODRIGUES, 2007; LEE K, JO Y. Y, CHUNG G, JUNG J. H, KIM Y. H, PARK C. K, 2021). A maioria das DAEs atualmente disponíveis se enquadra em uma de duas classes principais. A primeira classe modula os canais iônicos de neurônios dependentes de voltagem, enquanto a segunda classe modula a neurotransmissão GABAérgica inibitória (Steinlein, 2004; Jarada et al., 2020).

Pensando em atuar sobre os canais iônicos, estudos revelaram que o genoma humano contém mais de 80 genes relacionados ao canal de K^+ , e diversas

evidências genéticas, moleculares, fisiológicas e farmacológicas têm destacado o papel crítico desses canais na regulação da excitabilidade nervosa e na epilepsia. Devido a isso, os canais de K⁺ estão emergindo como alvos promissores para o desenvolvimento de novos DAEs (Löscher, 2006; Kamuene et al., 2021).

Os canais de potássio são consideradas proteínas de membrana classificadas como tetrâmeros e formadas por subunidades α e acessórias (MILLER, 2000; NIKITIN E. S, VINOGRADOVA L. V, 2021). Canais de K⁺ dependentes de voltagem previnem a recorrência do potencial de ação participando da repolarização e hiperpolarização da membrana após alterações de despolarização paroxística. Mutações nos genes responsáveis pela formação dos canais de potássio causam a redução do efeito de repolarização de forma a gerar hiperexcitabilidade (HERON, 2007; KHAN R, CHATURVEDI P, SAHU P, LUDHIADCH A, SINGH P, SINGH G, MUNSHI A, 2024). Sabe-se que o canal de K⁺, que se abre no potencial de membrana, está próximo do limite de geração do potencial. O mesmo tem uma grande influência na excitabilidade dos neurônios. Exemplos de canais K⁺ são KCNQ2 / Q3, Kv1 e K_{ATP}, os quais são alvos particularmente atraentes para novos DEAs (STEINLEIN, 2004).

Predominantemente no SNC são encontrados canais de K⁺ voltagem dependentes como os KCNQ2 e KCNQ3. Podem estar tanto pré como pós-sinápticamente em áreas do cérebro conhecidas por serem importantes no controle de oscilações e sincronização de redes neurais (COOPER et al., 2001; SUN H, UNDEM B. J, 2024). Os canais KCNQ2 e KCNQ3 são coexpressos em muitas regiões do cérebro e têm o potencial de formar heterotetrâmeros. Várias linhas de evidência sugerir que as correntes M baseadas em KCNQ2 / Q3 desempenham um papel importante na regulação da excitabilidade nervosa e na progressão da epilepsia. De fato, a deleção direcionada do gene KCNQ2 em camundongos resulta em hipersensibilidade ao convulsivante PTZ (Watanabe et al., 2000; TRACY G. C, WILTON A. R, RHODES J. S, CHUNG H.J, 2022). Além disso, a inibição dos canais de potássio KCNQ2/Q3 por agonistas muscarínicos ou linopiridina é pró-convulsivante. Esses dados identificam o canal KCNQ2 / Q3 como um alvo atraente para novos anticonvulsivantes (DEDEK ET AL., 2001; SINHA A. K, LEE C, HOLT J. C, 2024).

Assim como o canal KCNQ2 / Q3, o canal Kv1.1 é de voltagem dependente. São predominantemente expressos no sistema nervoso, sendo localizado principalmente nos axônios e terminais nervosos onde desempenham um papel fundamental no processo de repolarização de um potencial de ação, além da liberação de neurotransmissores (MONAGHAN et al., 2001; SUN H, UNDEM B. J, 2024).

Uma outra classe de canais iônicos relacionados ao potássio são os canais Kir (Inwardly Rectifying Potassium Channels), esses são caracterizados por uma corrente iônica predominantemente direcionada para dentro da célula quando a membrana está hiperpolarizada em relação ao potencial de equilíbrio do potássio. Esses canais de potássio permitem o influxo de K⁺ em resposta a mudanças no potencial de membrana, contribuindo para a repolarização celular e a regulação da excitabilidade neuronal e cardíaca. Eles são encontrados em vários tecidos, incluindo coração, músculo esquelético e células neuronais, e possuem diversas subfamílias. Uma subfamília importante é a dos canais KATP (ATP-sensitive Potassium Channels), que ligam o metabolismo celular ao potencial de membrana, sendo regulados pela concentração intracelular de ATP. Esses canais desempenham papéis fundamentais na fisiologia celular, regulando o potencial de membrana, a excitabilidade neuronal, a contração muscular e as respostas a alterações metabólicas (AKYUZ E; KOKLU B; UNER A; ANGELOPOULOU E; PAUDEL Y,N; 2021).

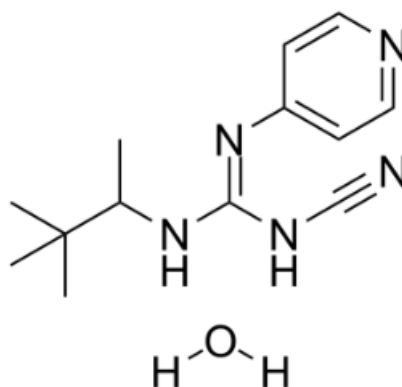
Estudos recentes com camundongos geneticamente modificados proveem evidências que apoiam o papel dos canais K_{ATP} no controle da excitabilidade neuronal e no controle da propagação de convulsões. Um suporte adicional se refere a sua farmacologia, onde esses canais desempenham um papel importante na regulação do limiar convulsivo (YAMADA et al., 2001; LI Y, AZIZ Q, TINKER A, 2021).

Sendo assim, em busca de melhores tratamentos para pacientes acometidos tanto pela epilepsia quanto por algum transtorno de ansiedade, novos medicamentos que atuem em canais iônicos tem se tornado essencial. Atualmente, esses medicamentos estão sendo amplamente estudados por terem menos efeitos colaterais que outras classes farmacológicas utilizadas no tratamento dessas patologias. Um fármaco ainda não testado que apresenta essa característica é o pinacidil (Figura 3). Seu mecanismo de ação envolve a redução na relação ATP/ADP, resultando na ativação de canais KATP (Liss e Roeper, 2001; Yang et al., 2022).

O pinacidil foi citado por RAO (2015) em um estudo onde outro ativador de canais de potássio, o nicorandil, foi testado. Esse estudo avaliou as propriedades anticonvulsivantes do nicorandil e confirmou tal efeito, sugerindo que o pinacidil pudesse também ter os mesmos efeitos.

Como mencionado, o pinacidil é um ativador de canais de potássio KATP, agindo através da saída de potássio, o que hiperpolariza indiretamente as membranas celulares e esgota o cálcio intracelular, resultando no relaxamento do músculo liso vascular. Ele é utilizado na clínica como um anti-hipertensivo que atua por vasodilatação periférica, reduzindo a pressão arterial sem afetar diretamente a eletrofisiologia cardíaca. No entanto, devido ao seu mecanismo de ação, destacasse a hipótese de também ser útil no controle de quadros de epilepsia e ansiedade (FRIEDEL, 1990; IGUCHI K, SAOTOME M, YAMASHITA K, HASAN P, SASAKI M, MAEKAWA Y, WATANABE Y, 2019; SINGAREDDY S. S, 2022).

FIGURA 3 | Estrutura química do Pinacidil.



Fonte: medchemexpress, 2024.

Diante desta nova possibilidade, o uso de medicamentos que ativam canais de potássio como drogas antiepilépticas (DAEs), com o objetivo principal de minimizar os efeitos colaterais nos pacientes, justifica a realização de estudos adicionais com medicamentos que possuam essa característica. O pinacidil aparece como um potencial candidato a ser utilizado como anticonvulsivante devido à sua capacidade de ativar canais de potássio. Além disso, dado que medicamentos com propriedades anticonvulsivantes frequentemente apresentam respostas positivas no tratamento da ansiedade, sobretudo quando atuam em canais iônicos. Apesar da potencialidade,

nada ou muito pouco tem sido relatado acerca da possibilidade de o pinacidil apresentar efeitos anticonvulsivantes ou ansiolíticos.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Considerando o efeito ativador do pinacidil em canais de potássio, e o envolvimento desses canais na epilepsia, o objetivo desse trabalho foi avaliar os potenciais atividades anticonvulsivante e ansiolítica das diferentes doses de pinacidil em diferentes modelos animais.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade anticonvulsivante das diferentes doses do pinacidil fazendo uso dos modelos de convulsão agudo e crônico (promovidos pelas quimios convulsivantes PTZ e pilocarpina).
- Avaliar a atividade ansiolítica das diferentes doses do pinacidil nos testes de Labirinto em Cruz Elevado, Teste de campo aberto – OPEN FIELD- e Teste da Caixa Claro-Escuro.
- Avaliar o potencial impedimento motor provocado pelo pinacidil através do teste de Rota Rod.
- Avaliar o perfil toxicológico de animais tratados com o pinacidil através de exames bioquímicos (Creatinina, Ureia, TGP e TGP).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Os protocolos experimentais envolvendo animais foram realizados de acordo com as diretrizes para o uso de animais em pesquisa, de acordo com o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e as normas da American Guidelines for Animal Care, evitando sacrifício desnecessário e sofrimento dos animais. O referido projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Ribeirão Preto em duas fases. A primeira referente a avaliação aguda de crises convulsivas e dos testes

ansiolíticos foi aprovado com nº 005/2002 em 09 de fevereiro de 2023. Já a fase crônica, o que inclui o kindling de PTZ e os exames toxicológicos obteve aprovação com nº 0011/2023 em 05/12/2023. Foram utilizados ratos Wistar (média 180 a 250 g) alocados em mini-Isolador para ratos Ventilife (comprimento de 497mm X 341mm de largura X 265mm de altura e 1154 cm² de área de piso). Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12/12 horas e temperatura (20 ± 2°C). A alimentação e água foram ofertadas de forma *ad libitum*. Animais foram adquiridos junto a empresa ANILAB (Paulínia-SP) e aclimatizados em sala experimental durante pelo menos 30 minutos antes de cada experimento. Todos os experimentos foram realizados em sala com isolamento acústico entre 07h00 e 12h00. Todas as avaliações foram filmadas e estão disponíveis para consulta científica. Após a realização da pesquisa, os animais envolvidos foram eutanasiados de acordo com as normas preestabelecidas pelas instituições acima citadas.

3.2. FÁRMACOS

As drogas de maior relevância utilizadas no projeto foram o pinacidil Monohidratado adquirido da Sigma Aldrich, Brasil (Número CAS 85 371 -64-8 com grau de pureza > 98%), assim como os pró-convulsivantes pentilenotetrazol (PTZ) (Número CAS: 54-95-5) e a Pilocarpina (Número CAS 54-71-7). O diazepam injetável (DZP) foi adquirido da União Química (Brasil) e o tiopental sódico da Cristália (Tiopentax[®] - Cristália - Brasil).

3.3. BIOENSAIOS

Foram conduzidos testes utilizando diferentes doses de pinacidil para investigar potenciais efeitos ansiolíticos nos modelos de Labirinto em Cruz Elevado, Teste do Open Field e Teste da Caixa Claro-Escuro. Além disso, para avaliar a atividade anticonvulsivante e validar os resultados obtidos, foram empregados modelos agudos de convulsão (Pilocarpina e PTZ) e crônico de epilepsia (Kindling PTZ).

O teste de Rota Rod foi utilizado para avaliar o desempenho motor dos animais submetidos às diferentes doses de pinacidil, desempenhando um papel crucial na validação final da atividade anticonvulsivante do fármaco em estudo em ambas as fases.

Por fim, um teste para avaliar o potencial toxicológico do pinacidil foi realizado, incluindo coleta de sangue para testes de função renal e hepática. Os animais foram divididos em grupos controle positivo e negativo, bem como em grupos experimentais correspondentes a cada uma das doses de pinacidil testadas. Cada grupo foi composto por um número válido e calculado de experimentos, garantindo um poder estatístico a partir do uso de 6-7 animais por grupo.

3.3.1. Teste de Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O labirinto foi formado por dois braços de madeira abertos, medindo 50 x 10 cm e dois braços fechados, apresentando dimensões de 50 x 10 x 40 cm cada um, dispostos de modo que os braços abertos ficassem opostos um ao outro. Esses braços estavam ligados por uma plataforma central de 10 x 10 cm, e o labirinto era mantido a uma altura de 50 cm do chão, sendo os braços abertos cercados por uma pequena borda de acrílico com 0,5 cm de altura, com objetivo de evitar a queda dos animais. Após 30 minutos dos diferentes tratamentos controles ou experimentais, os animais foram colocados no compartimento intermediário do labirinto em cruz (cabeça voltada para o braço aberto) e deixados para explorar livremente o aparelho por 5 min (WU, et al., 2020).

Ao realizar o teste foram avaliados parâmetros comportamentais clássicos como (I) tempo de permanência nos braços abertos (TBA), (II) porcentagem de tempo nos braços abertos ($100 \times \text{tempo no aberto} / (\text{tempo no aberto} + \text{tempo no fechado})$) (%TBA), (III) tempo de permanência nos braços fechados (TBF), (IV) número de mergulhos e (V) número de entradas no braço aberto / fechado.

Para todo os testes ansiolíticos, incluindo o teste atual, os animais foram divididos em grupos (n=6-7 animais) controle negativo (solução salina 0,9 %), controle positivo (Diazepam 2 mg / kg) e experimentais (pinacidil na dose de 2,5; 5 e 10 mg / Kg) e tratados i.p. 30 minutos antes dos experimentos.

3.3.2. Teste de Transição Claro-Escuro

O aparato do Claro-Escuro consistiu em uma caixa (46 x 27 x 30 cm) dividida em um compartimento escuro e outro iluminado, conectados por uma pequena porta

com dimensões de 7.5 x 7.5 cm. O modelo de equipamento utilizado no teste foi o EP158 (Insight, lâmpada fluorescente de 20 W).

Após 30 minutos dos tratamentos, cada animal controle ou experimental foi colocado separadamente no centro do compartimento iluminado, de frente para a abertura de acesso ao campo escuro, sendo avaliado na exploração por 5 minutos (DA SILVA, et al., 2021).

Nesse dispositivo foram avaliados o (I) número de passagens entre os campos claro e escuro (considerando uma transição apenas quando o animal cruza a abertura de acesso entre os campos claro / escuro com as quatro patas); (II) tempo gasto no campo claro e (III) o tempo gasto no campo escuro.

3.3.3. Teste do Campo Aberto (OPEN FIELD)

Para testes em campo aberto, foi utilizada uma arena circular que consiste no modelo OPO199 (Insight), apresentando diâmetro de 60 cm e uma parede circular de acrílico com 50 cm de altura. O piso do dispositivo é subdividido em 12 quadrantes, com 4 deles formando uma zona central e os demais correspondendo às zonas periféricas.

Os animais foram colocados, separadamente, no quadrante central da plataforma e, durante cinco minutos, foram analisados indicadores comportamentais relacionados à ansiedade e ações potenciais sobre o desempenho locomotor e vigília / sedação animal como: (I) atividade locomotora voluntária (número de vezes que as linhas foram cruzadas); (II) preferência do animal ao centro do campo do que áreas periféricas; (III) frequência de *rearings* (exploração vertical do ambiente) e (IV) *groomings* (movimentos de autolimpeza) (DE OLIVEIRA, et al., 2020).

3.3.4. Teste do Rota Rod

Os efeitos de diferentes doses de pinacidil (10 e 20 mg/kg) foram avaliados quanto a potencial interferência nos atributos de coordenação motora e estado de vigília dos animais em comparação aos grupos controles no teste agudo. Já no teste crônico, após realização do ciclo de tratamento de cada modelo indutor, os animais tratados com pinacidil (10 mg/kg) foram submetidas ao teste da mesma forma e com

a mesma finalidade do teste agudo. Sendo assim, foi utilizado o aparelho de rotarod (Acceler Rota-rod, Jones & Roberts, for rats 7750; Ugo Basile, Comercio, Italy) com velocidade de rotação de 4 rev/min. O teste foi precedido por três sessões de treinamento com cada animal com duração de um minuto cada na velocidade rolagem acima destacada. No dia seguinte, os animais foram submetidos novamente ao aparelho e, somente os animais que se mantiveram na barra por 1 minuto foram considerados aptos a participarem do teste de rotarod na fase aguda, no caso da crônica, todos foram utilizados. Trinta minutos após os tratamentos, os animais foram colocados no aparelho por no máximo um minuto, sendo avaliado o tempo para a primeira queda em diferentes janelas temporais (0 min.; 15 min.; 30 min.; 45 min.; 60 min. e 75 min.).

3.3.5. Estudo da Atividade Anticonvulsivante em Modelo Agudo

Do mesmo modo que para os testes ansiolíticos, para avaliar a ação anticonvulsivante do pinacidil em administração única, grupos de animais (n=6-7) foram tratados com solução salina 0,9 % (controle negativo, i.p), diazepam 2 mg / kg (controle positivo, i.p) e diferentes dosagens de pinacidil (2,5, 5 e 10 mg / kg, i.p).

Após 30 minutos da administração dos tratamentos, os animais receberam os respectivos agentes convulsivantes pilocarpina (400 mg/Kg, i.p) e PTZ (90 mg/Kg, i.p), separadamente. Após a administração do agente convulsivante os animais foram filmados por 40 minutos na presença do convulsivantes pilocarpina e 30 minutos após utilização de PTZ.

Todos os animais foram observados quanto a ocorrência de crises, latência para a primeira crise e desempenho convulsivante por meio do índice de Racine (1972) modificado por Pinel & Rovner (1978) (Tabela 1) em comparação com os grupos controles.

TABELA 1 | Índice de desempenho Convulsivante Modificado.

0	Nenhuma atividade de crise;
1	Movimentos orofaciais;
2	Mioclonia da cabeça;
3	Mioclonia da pata traseira;
4	Elevação;
5	Elevação e queda;
6	Mioclonia da cabeça e orelhas, movimentos clônicos, eventos sequenciais de elevação e queda;
7	Rotações, saltos violentos e vocalização;
8	Todos os comportamentos da classe 7 seguidos por períodos de hipertonia;

Fonte. por Pinel & Rovner, 1978)

3.3.6. Estudo da Atividade Anticonvulsivante em Modelo Crônico: Kindling PTZ

O Kindling de PTZ (Quadro 3) foi realizado de forma a induzir a ocorrência de convulsões utilizando o Pentilenotetrazol (PTZ) por meio da administração de uma dose subconvulsivante (via intraperitoneal, i.p) de PTZ (35 mg/kg), a cada dois dias, durante um período de 27 dias (totalizando 15 injeções). Dois grupos de ratos foram utilizados, com um total de oito animais em cada grupo. Um grupo foi submetido ao tratamento com pinacidil, na dose de 10 mg/kg (via i.p), enquanto o outro grupo recebeu um placebo (solução salina a 0,9%). Tanto a administração de solução salina a 0,9% quanto a administração de pinacidil foi realizada 30 minutos antes de cada injeção de PTZ.

Após a injeção de PTZ, os ratos foram observados por um período de 30 minutos, e a ocorrência de convulsões foi registrada de acordo com o índice de Racine (1972) como demonstrado (Tabela 2), em comparação com os grupos de controle.

QUADRO 3 | Aplicação modelo KINDLING PTZ em dias.

MODELO KINDLING – PTZ																											
	<div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center;"> <div style="width: 15px; height: 15px; background-color: #92d050; border: 1px solid black;"></div> Filmagem para observação <div style="width: 15px; height: 15px; background-color: #ffff00; border: 1px solid black;"></div> Administração de PTZ - 35mg/kg <div style="width: 15px; height: 15px; background-color: #4169e1; border: 1px solid black;"></div> Tratamento com Pinacidil </div>																										
dias	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27

TABELA 2 | Critérios comportamentais para classificação das crises límbicas (Modificada).

Classe	Comportamentos
1	Movimentos orofaciais, piscar de olhos
2	Mioclonia de cabeça e/ou movimentos clônicos faciais severos
3	Mioclonia dos membros anteriores
4	Convulsões clônicas dos membros anteriores com elevação
5	Convulsões tônico-clônicas generalizadas associadas à perda do controle postural

Fonte. Racine e colaboradores, 1972).

3.3.7. Análise Bioquímica

Foi realizado o teste toxicológico em três grupos (n=6) por 10 dias, sendo que um recebeu somente solução Salina 0,9% via i.p., o outro pinacidil 10mg/kg pela mesma via e por fim um grupo não foi manipulado (Naïve). Após esse período, cada um dos animais, foi mantido em anestesia inalatória para a coleta de material. Foi feita a coleta de sangue via intra-cardíaca (ventrículo esquerdo) e posteriormente alocado em tubos específicos de dosagens e encaminhados para um laboratório de análises clínicas, devidamente aclimatizados, com objetivo de avaliar possível toxicidade hepática a partir da Alanina Aminotransferase (ALT) e Aspartato Aminotransferase (AST) ou renal (dosagem de ureia e creatinina) do pinacidil em uso crônico.

3.4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas e a elaboração de gráficos foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 5.1 (USA). Para avaliar a proteção contra crises convulsivas induzidas por PTZ ou pilocarpina, foi empregado o teste de Teste de Fisher. Para analisar os dados dos testes crônico de PTZ e Rotarod, foi utilizado o teste ANOVA de duas vias. Os demais testes foram avaliados por meio da ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste de Newman-Kells para os testes de LCE, Caixa Claro-Escuro e toxicológico, enquanto o teste de Tukey foi empregado para analisar o Open Field. Valores de *p < 0.05, **p < 0.01 e ***p < 0.001 foram considerados estatisticamente significativos.

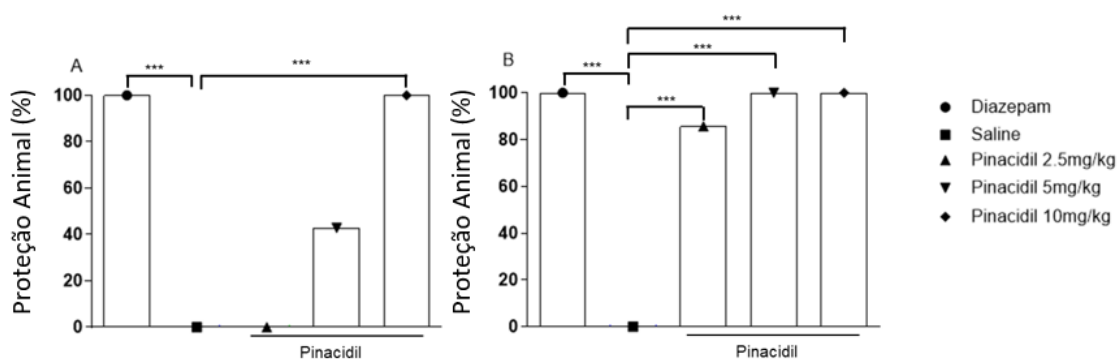
4. RESULTADOS

4.1. TESTES ANTICONVULSIVANTES AGUDOS

No teste com PTZ, apenas a dose de 10 mg/kg de pinacidil mostrou um efeito anticonvulsivante significativo, protegendo os animais em 100% contra convulsões (p=0,0006) (Figura 4A). As outras doses de 2,5 mg e 5 mg não protegeram significativamente os animais contra convulsões de grau 7 e 8, como mostrado na Figura 4A.

No teste com pilocarpina, o pinacidil mostrou um efeito anticonvulsivante para todas as doses testadas. As doses de 2,5 mg/kg (p=0,047), 5 mg/kg (p=0,006) e 10 mg/kg (p=0,006) mostraram diferenças significativas em comparação com o salina a 0,9%, conforme ilustrado na Figura 4B. As doses de 2,5 mg/kg; 5 mg/kg e 10 mg/kg protegeram os animais contra convulsões de grau 7/8 em 85,7%, 100% e 100%, respectivamente, como mostrado na Figura 4B. A proteção contra convulsões oferecida pelo DZP (2 mg/kg) foi de 100% tanto nos testes com PTZ quanto com pilocarpina (Figuras 4A e 4B).

FIGURA 4 | Efeitos das drogas antiepilépticas no escore máximo de Racine.



Avaliação anticonvulsivante aguda. (4A) Animais protegidos por pinacidil induzidos por PTZ e (4B) Animais protegidos por Pinacidil induzidos por pilocarpina. As barras representam a média \pm SD. de segundos acumulados ou número de cruzamentos. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ significativamente no teste Exato de Fisher.

Quanto à latência para a primeira convulsão em animais não completamente protegidos contra convulsões, observamos que o tempo até a primeira convulsão foi significativamente aumentado nos animais tratados com pinacidil em comparação com o grupo controle tratado com salina, especialmente no teste com PTZ. Na verdade, no teste com PTZ, o tempo até a primeira convulsão foi aumentado em cerca de 3,5 vezes em comparação com o grupo salina para as doses de 2,5 mg/kg e 5 mg/kg de pinacidil, conforme mostrado na Tabela 3.

TABELA 3 | Latência até o início da convulsão (pontuação 7-8) em tratamentos com pinacidil.

Latência até início da Convulsão (Segundos)					
Tratamento	Salina (0,9%, i.p)	DZP (2mg/kg, i.p)	Pinacidil (2,5mg/kg, i.p)	Pinacidil (5mg/kg, i.p)	Pinacidil (10mg/kg, i.p)
PTZ (80mg/kg,i.p)	150 \pm 29	Sem Convulsão	529 \pm 304	527 \pm 266	Sem Convulsão
Animais com convulsão/ sem convulsão	n = 0/7	n = 7/0	n = 0/7	n = 3/4	n = 7/0
Pilocarpina (320 mg/Kg,i.p)	1416 \pm 202	Sem Convulsão	1604 \pm 0	Sem Convulsão	Sem Convulsão
Animais com convulsão/ sem convulsão	n = 0/7	n = 7/0	n = 6/1	n = 7/0	n = 7/0

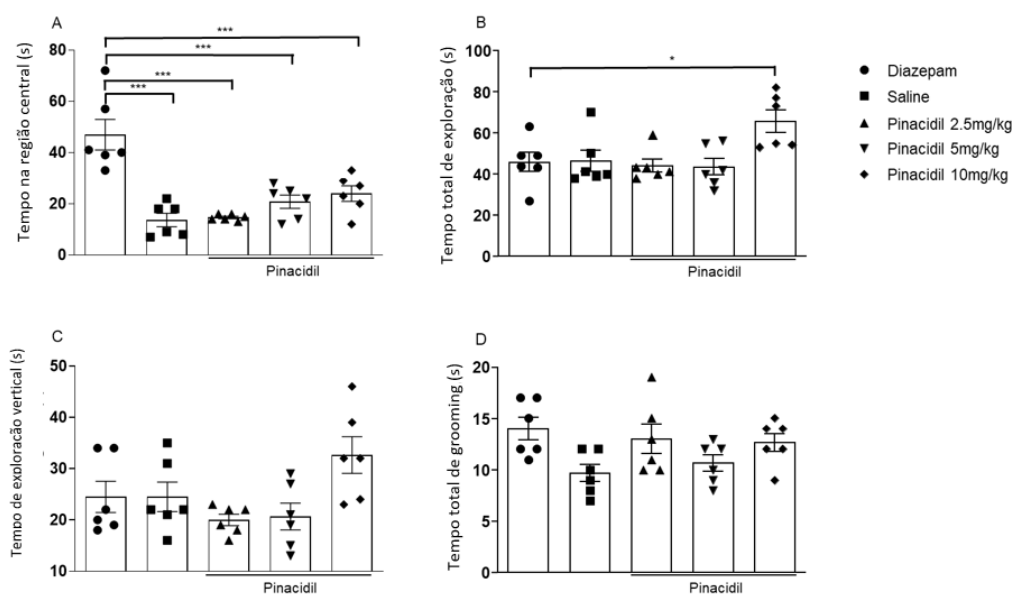
Valores de Latência de convulsão, medidos em segundos, em resposta ao tratamento com Pinacidil administrado i.p. em ratos Wistar (n=6). Todos os dados foram expressos como médias \pm SD.

4.2. TESTES ANSIOLITICOS

4.2.1. Open Field

Exceto por um leve aumento na atividade exploratória induzida pelo pinacidil na dose de 10 mg/kg (i.p) ($F(4,25)= 4,256$; $p=0,0092$) (Figura 5B), não foi observado nenhum outro efeito ansiolítico significativo após a administração de diferentes doses da droga no teste de Campo Aberto. De fato, não foram observadas diferenças estatísticas entre os animais tratados com pinacidil em todas as doses e o grupo controle tratado com salina em termos de tempo gasto na zona central do aparelho ($F(4,25)= 15,59$; $p < 0,0001$), conforme mostrado na Figura 5A. Também não houve diferenças significativas entre as diferentes doses de pinacidil e o grupo salina em relação aos comportamentos de exploração vertical e grooming, como mostrado nas Figuras 5C e 5D, respectivamente.

FIGURA 5 | Resultados da análise comportamental no Teste de Campo Aberto.



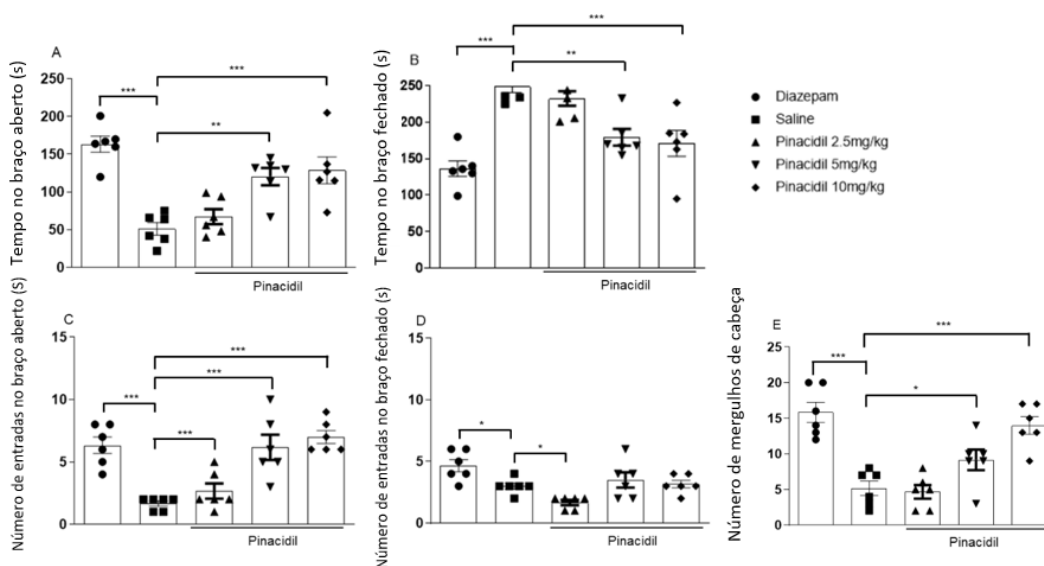
Teste de Campo Aberto. (5A) Hora na zona central; (5B) Tempo total de exploração; (5C) Criação total tempo e (5D) tempo total de preparação. As barras representam a média \pm SD. de segundos acumulados ou número de cruzamentos *** $p < 0,001$ significativamente no teste ANOVA seguido do pós-teste Tukey.

4.2.2. Labirinto em Cruz Elevado

Conforme ilustrado nas Figuras 6A e 6B, observamos que as doses de 5 mg/kg e 10 mg/kg de pinacidil mostraram diferença estatística em comparação com a solução salina a 0,9%. Nossos resultados mostram que os animais tratados com pinacidil passaram mais tempo no braço aberto ($F(4,25)= 13,55$; $p<0,001$) e menos tempo no braço fechado ($F(4,25)= 14,81$; $p<0,001$) em comparação com o grupo salina. Também houve um aumento significativo no número de entradas dos animais tratados com as doses de 5 mg/kg e 10 mg/kg de pinacidil em comparação com o grupo salina (Figura 6C e Tabela 4). O número de entradas no braço fechado, conforme mostrado na Figura 6D, não apresentou resultados significativos ao comparar as diferentes doses de pinacidil com o grupo salina. Quanto aos mergulhos, as doses de 5 mg/kg e 10 mg/kg mostraram diferença estatística em comparação com o grupo controle salina ($F(4,25) = 16,83$; $p<0,001$).

Tendo em vista que o teste de LCE tem por objetivo de avaliar condições relacionadas a atividade motora e ansiedade, observamos que os animais tiveram maior permanência expostos ao ambiente, bem como maior movimentação nos aparelhos, inferindo assim um efeito ansiolítico nas doses destacadas.

FIGURA 6 | Resultados da análise comportamental Labirinto em Cruz Elevado.



Labirinto em Cruz Elevado. (6A) Tempo em braço aberto; (6B) Tempo em braço fechado; (6C) Número de entradas de braços abertos; (6D) Número de entradas de braço fechado e (6E) Número de mergulhos de cabeça. As barras

representam a média \pm SD. de segundos acumulados ou número de cruzamentos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ significativamente no teste ANOVA seguido do pós-teste de Newman Kells.

TABELA 4 | Porcentagem de tempo em braços abertos durante tratamentos com pinacidil.

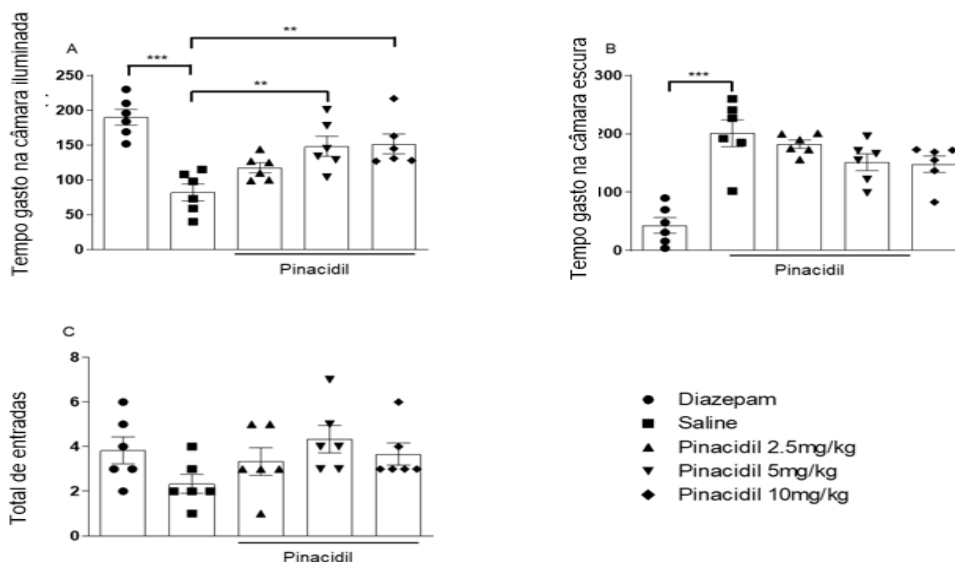
TABELA 4 Porcentagem de tempo em Braço Aberto (%)						
Treatment/time	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5	Animal 6
Saline	21.33	7.33	22.00	14.00	12.67	25.00
Diazepam	56.67***	55.67***	67.00***	53.33***	40.00***	54.67***
Pinacidil 2.5 mg/kg	13.33	18.67	31.33	33.00	22.33	16.00
Pinacidil 5 mg/kg	22.33**	44.00**	48.33**	38.00**	43.33**	45.00**
Pinacidil 10mg/kg	68.33***	38.33***	45.67***	42.33***	24.33***	38.67***

Valores em porcentagem de tempo no tratamento de braço aberto com Pinacidil administrado i.p. em ratos Wistar (n=6). Segundos acumulados ou número de cruzamentos. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ significativamente no teste ANOVA seguido do pós-teste Newman Kells.

4.2.3. Teste de Caixa Claro-Escuro

No teste da caixa claro-escuro, os animais que receberam as doses de 5 mg/kg e 10 mg/kg de pinacidil passaram mais tempo no compartimento claro em comparação com os animais controle ($F(4,25)=11,11$; $p=0,1594$) (Figura 7A). No entanto, o tempo gasto pelos animais no compartimento escuro do aparelho e o número de travessias entre os compartimentos não mostraram diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais e o grupo salina (Figuras 7B e 7C).

FIGURA 7 | Efeito do tratamento em ratos avaliados em Teste de Caixa Claro-Escuro.



Teste de Caixa Claro-Escuro. (A) Tempo gasto na câmara iluminada; (B) Tempo gasto na câmara escura e (C) Total de entradas entre os dois compartimentos da caixa por 5 min. As barras representam a média \pm SD. de segundos acumulados ou número de cruzamentos. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ significativamente no teste ANOVA seguido do pós-teste de Newman Kells.

4.2.4. Comprometimento motor - Rotarod em escala aguda

As médias das latências de queda dos animais no Rotarod estão apresentadas na tabela 5. A administração da maior dose utilizada nos ensaios anticonvulsivantes e ansiolíticos (10 mg/kg, ip), assim como a dose duas vezes maior que aquela efetiva como anticonvulsivante (20 mg/kg, ip) não apresentaram diferenças significativas contra o grupo salina ao longo dos diferentes tempos de observação ($F(4,25) = 0.46$; $p = 0.8801$).

TABELA 5 | Latência até o início das quedas em tratamentos Agudo com pinacidil.

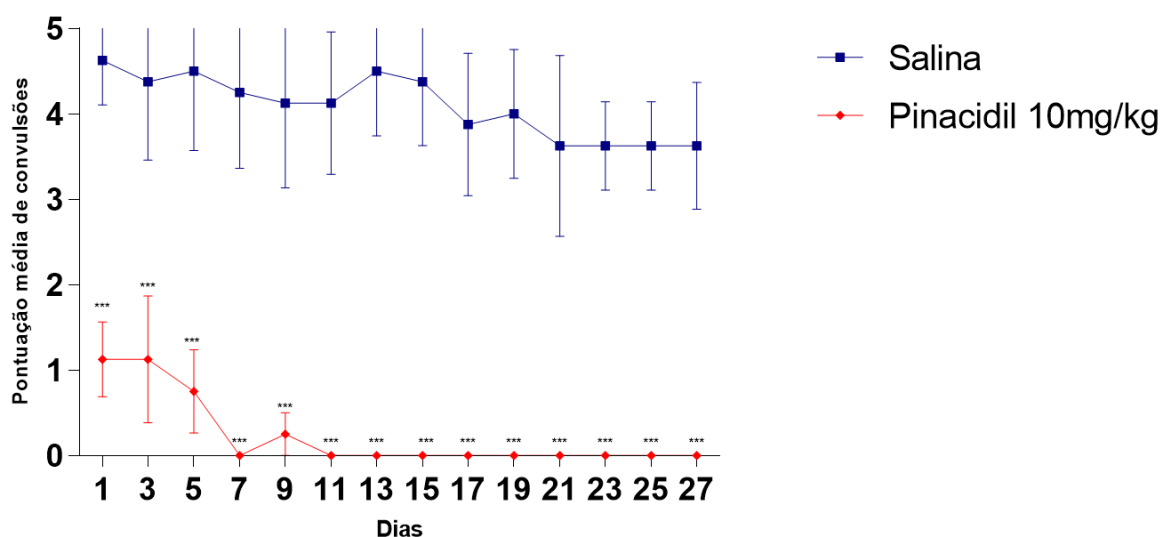
TABELA 5 Latência até o início da primeira queda (segundos)					
Tratamento/tempo	15 min	30 min	45 min	60 min	75 min
Salina	60±0	60±0	60±0	60±0	60±0
Pinacidil 10mg/kg	60±0	53±2	60±0	56±1	60±0
Pinacidil 20mg/kg	60±0	55±1	58±0,2	60±0	60±0

Tabela 5. Valores de latência de queda, medidos em segundos, em resposta ao tratamento com Pinacidil administrado i.p. em ratos Wistar (n=6). Todos dados expressos como médias ± SD.

4.2.5. Ensaio Crônico de PTZ (Kindling de PTZ)

A avaliação crônica foi realizada por meio de aplicações diárias de pinacidil na dose de 10mg/kg no grupo tratamento, e solução salina a 0,9% no grupo placebo. Após a análise dos dados estatísticos, apresentados na Figura 8, podemos confirmar a existência de diferença estatística entre os tratamentos ($F(4,25)= 1.069$; $p=0.3717$). Ao longo dos dias, os animais do grupo salina continuaram a apresentar crises epiléticas, enquanto os animais tratados com pinacidil na dose de 10 mg/kg não apresentaram mais crises após os dias 7-9. Mesmo antes disso e na ocorrência de crises, estas foram em severidade menor nos animais tratados com pinacidil em comparação ao grupo salina, ou seja, demonstraram baixo escore na classificação das crises límbicas.

FIGURA 8 | Ensaio Crônico de PTZ

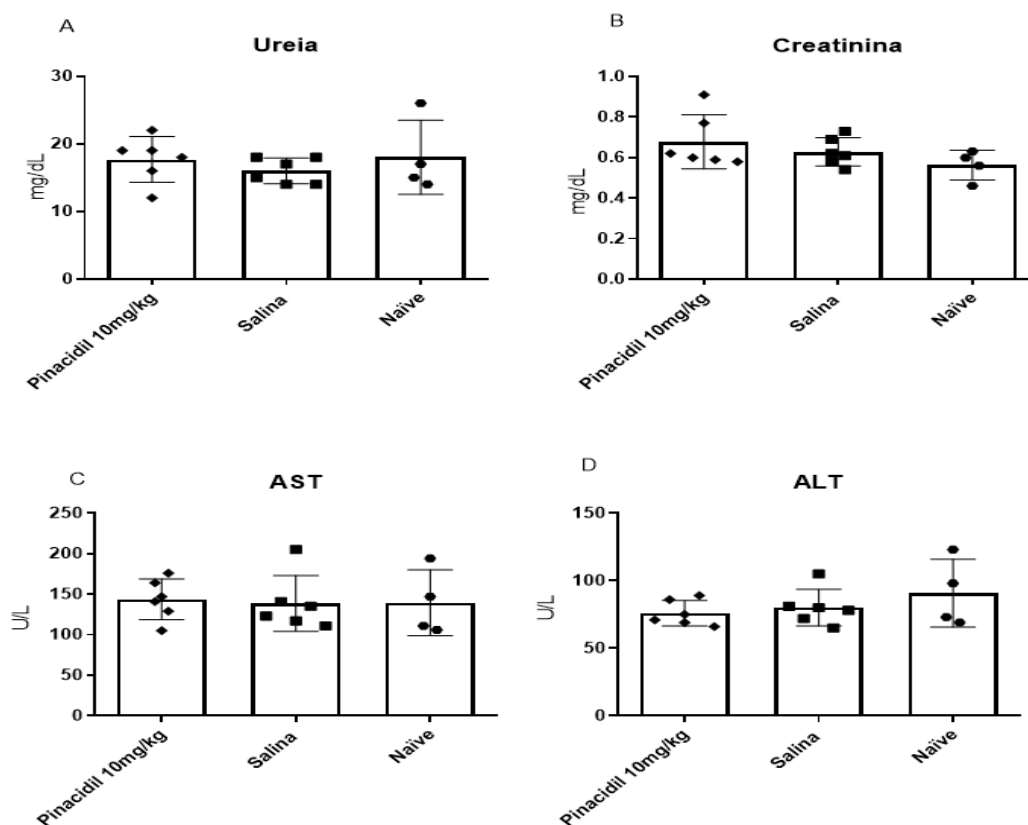


Ocorrência de convulsões classificada de acordo com o índice de Racine em animais tratados e não tratados com Pinacidil 10mg/kg administrado por via i.p. em ratos Wistar (n=6) por 27 dias. As barras representam a média ± SD. de índice de desempenho convulsivante. ***p < 0,001 significativamente no teste ANOVA de duas vias.

4.2.6. Avaliação Bioquímica

O teste de toxicologia foi realizado por meio da análise bioquímica dos animais tratados com pinacidil na dose de 10 mg/kg via intraperitoneal durante dez dias consecutivos. Os parâmetros avaliados incluíram as taxas de creatinina, conforme mostrado na Figura 10A ($F(4,25)= 0.4882$; $p=0.6246$), e a ureia, representada na Figura 10B ($F(4,25)= 1.610$; $p=0.2374$), de modo a se avaliar a função renal. A avaliação da função hepática é apresentada na Figura 10C, com as taxas de ALT ($F(4,25)= 1.069$; $p=0.3717$), e na Figura 10D, com as taxas de AST ($F(4,25)= 0.0386$; $p=0.9623$). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos salina e de tratamento para nenhum dos parâmetros bioquímicos avaliados, mostrando que o tratamento crônico com pinacidil não altera a função renal ou hepática dos animais.

FIGURA 9 | Avaliação Bioquímica



Resultado da avaliação Bioquímica, (10A) Ureia mg/dL, (10B) Creatinina mg/dL, (10C) AST U/L e (10D) ALT U/L. Teste realizado em ratos Wistar (n=6) em três grupos (tratados com Pinacidil 10mg/kg, controle com Solução Salina 0,9% e animais não manipulados (Naive). ANOVA Test seguido do pós-teste de Newman Kells.

Ao comparar os resultados obtidos nos grupos tratados, aos valores de referência descritos na Tabela 6, observou-se que a medicação não apresentou efeitos tóxicos para os animais durante o período avaliado.

TABELA 6 | Média referente a dosagem de enzimas para exame toxicológico em comparação aos valores de referência para a espécie.

TABELA 6 Avaliação Toxicológica					
Enzima/Referência	μ Pinacidil 10mg/kg	μ Salina	μ Naïve	Referência 1	Referência 2
Ureia (mg/dL)	17.67	16	18	41.0 –44.6	30 - 42
Creatinina (mg/dL)	0.61	0.63	0.56	0.3 – 0.6	0.44 – .64
AST (U/L)	143.6	138.67	139,5	129 – 48.1	81 - 180
ALT (U/L)	76	80.17	90.75	114 -290.8	36 - 58

Avaliação toxicológica dos grupos testados comparados a Referência 1 (Dantas, et. Al., 2006) e referência 2 (Universidade Federal do Sergipe).

4.2.7. Comprometimento Motor – Rotarod em escala crônica

O teste de rotarod foi representado pelos resultados de latência, conforme demonstrado na Tabela 7. A atividade motora dos animais foi avaliada em seis períodos e não foram identificadas diferenças significativas entre os tratamentos e o grupo salina nos seis períodos avaliados ($F(4,25)= 0.2456$; $p=0.9110$).

TABELA 7 | Latência até o início das quedas em tratamentos com pinacidil em modelo Crônico de PTZ.

TABELA 7 Latência até o início da primeira queda (segundos)					
Tratamento/tempo	15 min	30 min	45 min	60 min	75 min
Salina	60±0	60±0	53,1±2,4	60±0	60±0
Pinacidil 10mg/kg	54,6±1,8	56,3±1,3	60±0	60±0	56,4±2,3

Valores de latência de queda, medidos em segundos, em resposta ao tratamento com Crônico com Pinacidil administrado i.p. em ratos Wistar (n=6). Todos os dados foram expressos como médias \pm SD.

5. DISCUSSÃO

Existem diversas abordagens no tratamento da epilepsia, uma vez que os medicamentos utilizados podem agir em uma variedade de alvos moleculares para modular respostas neuronais, como a atividade dos canais iônicos, ou visando aumentar a inibição neuronal por meio da ação Gabaérgica, ou mesmo diminuir a excitação glutamatérgica e mesmo a simpática (BRYSON, A.; REID, C; PETROU, S., 2023).

Estudos prévios têm investigado o potencial das drogas ativadoras de canais de potássio, no contexto da ação anticonvulsivante. Resultados recentes comprovaram a eficácia de alguns fármacos nesse aspecto, destacando seu papel na prevenção de convulsões. Além disso, drogas análogas ao pinacidil, como o nicorandil se mostraram promissoras nesse campo, com a possibilidade de produzir resultados comparáveis ou até superiores as drogas convencionais de uso clínico na epilepsia (GOLDBERG, et al., 1989; ZHAO, et al., 2023).

Sendo assim, no intuito de comprovar essa hipótese referente ao pinacidil, nos baseamos no estudo conduzido por RAO em 2015, que investigou os efeitos do nicorandil em camundongos, utilizando doses variadas da substância (5, 10, 20 e 40 mg/kg). Neste trabalho, os animais receberam o tratamento via intraperitoneal e foram posteriormente induzidos a convulsões clônicas com PTZ (100 mg/kg), 30 minutos após tratamento com grupos de tratamento ou controle salina. Os resultados revelaram que mesmo a menor dose testada já apresentou aumento do período de latência para o início das crises, enquanto as doses subsequentes proporcionaram proteção contra o desenvolvimento das convulsões. Isso levou Rao a concluir que o nicorandil pode ser uma nova opção de fármaco antiepiléptico, devido à sua capacidade de ativar os canais de potássio de forma a promover estabilidade da membrana celular, restabelecendo o equilíbrio iônico e regulando a liberação de neurotransmissores (RAO et al., 2005).

Dessa forma, por se tratar de um fármaco análogo ao nicorandil, que já apresenta efeitos comprovados perante a sua ação anticonvulsivante, o pinacidil, é um potencial candidato no tratamento de convulsões, conforme sugerido até mesmo por RAO em 2005. Com efeito, no presente estudo e pela primeira vez, este efeito anticonvulsivante do pinacidil foi comprovado, tendo em vista diferentes doses da

droga protegerem animais contra as crises induzidas por PTZ e Pilocarpina, tão bem como aumentar o tempo de latência para primeira crise no caso de animais não completamente protegidos das crises no teste do PTZ. O fato de o pinacidil mostrar efeito anticonvulsivante em mais de um modelo de convulsão, cujas convulsões sejam geradas por mecanismos neuroquímicos diferentes, afasta a possibilidade de que os efeitos anticonvulsivantes do pinacidil não sejam genuínos, ou seja fruto de um efeito falso positivo. O mesmo pinacidil também demonstra este efeito anticonvulsivante em modelo crônico de epilepsia, no caso o kindling de PTZ, aumentando o interesse para a droga. Mais do que isso, este trabalho também demonstra os efeitos ansiolíticos discretos do pinacidil, com base nos dados obtidos nos testes do Open Field, LCE e CE.

Inicialmente, o objetivo do estudo era investigar as potenciais propriedades anticonvulsivantes do pinacidil. No entanto, considerando que pacientes epiléticos frequentemente sofrem também de ansiedade, e levando em conta que muitos dos medicamentos utilizados no tratamento da epilepsia possuem efeitos ansiolíticos devido à sua influência nos neurotransmissores através dos canais iônicos, sendo este o principal mecanismo de ação estudado, decidimos conduzir testes adicionais para explorar essa possível propriedade do pinacidil.

A relação entre anticonvulsivantes e ansiolíticos pode ser explicada pela influência desses medicamentos no sistema nervoso central, especialmente através da regulação do neurotransmissor GABA. Os anticonvulsivantes frequentemente aumentam a atividade do GABA no cérebro, o que é crucial para inibir a atividade neuronal excessiva que pode levar a convulsões. Se os níveis de GABA no organismo estiverem baixos, a capacidade inibitória do neurotransmissor é reduzida, o que pode resultar em hiperatividade neuronal, contribuindo para quadros de crises convulsivas e, indiretamente para a ansiedade (KOH. W, KWAK. H, CHEONG. E, LEE. C.J., 2023).

Além de seu papel na inibição neuronal, o GABA também desempenha um papel na regulação de outros neurotransmissores importantes, como a serotonina e a dopamina. A serotonina está envolvida na regulação do humor, sono e apetite, enquanto a dopamina desempenha um papel crucial na motivação, recompensa e movimento. Portanto, modificações nos níveis de GABA podem afetar indiretamente esses sistemas neurotransmissores, influenciando não apenas a atividade convulsiva,

mas também os estados de humor e ansiedade (VAUGHAN. R.A; HENRY L.K; FOSTER J.D; BROWN C.R, 2024).

Já com relação direta aos canais iônicos no tratamento simultâneo da epilepsia e da ansiedade, podemos destacar os canais de potássio, que alteram a polaridade da membrana para promover o esgotamento de cálcio. Este cálcio modula a ação de neurotransmissores excitatórios. Através da ação combinada sobre esses canais, os medicamentos conseguem controlar a hiperexcitabilidade associada às crises epiléticas e reduzir a atividade excessiva que contribui para a ansiedade, proporcionando um efeito terapêutico abrangente (SOBOLEVA, E. B.; AMAKHIN, D. V.; SINYAK, D. S.; ZAITSEV, A. V, 2022).

Essa interconexão mostra como os anticonvulsivantes, ao afetarem canais iônicos, o GABA e outros sistemas neurotransmissores, podem ter implicações não apenas no controle de convulsões, mas também na gestão farmacológica de transtornos de ansiedade. É por isso que, em certos casos clínicos, ambos os tipos de medicamentos podem ser prescritos para tratar condições neurológicas complexas que envolvem tanto convulsões quanto ansiedade (PERUCCA E, BIALER M, WHITE HS, 2023.).

De forma a comprovar os efeitos ansiolíticos do pinacidil, os testes de Campo Aberto; Labirinto em Cruz Elevado (LCE) e Caixa Claro-Escuro foram empregados avaliando as atividades comportamentais de cada modelo animal e, de maneira complementar. Os resultados obtidos revelaram um aumento moderado na atividade exploratória dos animais nos três testes. Além disso, outras variáveis avaliadas demonstraram resultados significativos, como observado no teste de LCE, no qual houve um aumento no número de entradas dos animais no aparelho, assim como no número de mergulhos. Vale ressaltar também o aumento do tempo que os animais permaneceram nos braços abertos do labirinto, um parâmetro que pode ser correlacionado com os dados obtidos na caixa claro-escuro, na qual os animais passaram mais tempo na área clara. Isso sugere que os animais podem estar se expondo a áreas consideradas aversivas em ambos os testes (DE OLIVEIRA, et al., 2020). Portanto, considerando que o pinacidil aumentou tanto a taxa exploratória quanto a frequência de comportamentos etiológicos considerados de risco,

concluimos que o fármaco apresenta atividade ansiolítica, ainda que de discreta a moderada potência.

Quanto à propriedade anticonvulsivante do pinacidil, sabe-se que a ação das drogas ativadoras de canais de potássio baseia-se na repolarização da membrana celular. Isso ocorre através do influxo de potássio de dentro para fora das células neuronais.

Quando os canais de potássio são ativados, os íons K^+ saem do meio intracelular, onde estão mais concentrados, e migram para o meio extracelular. Esse movimento ajuda a reduzir as concentrações de cálcio e sódio, controlando assim a transmissão neuronal. Além disso, contribui para manter a membrana hiperpolarizada (SUN. J; LIU. Y;BAUDRY. M; BI. X., 2020). Para compreender os mecanismos dos canais de potássio (K^+), é essencial primeiro identificar a classe à qual esses canais pertencem. Em termos gerais, existem quatro classes principais: canais ativados por cálcio, dependentes de voltagem, K_2P e K_{ir} . O pinacidil é conhecido por sua capacidade de abrir os canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}), que são um tipo específico da família K_{ir} (canais $K_{ir6.x}$). Esses canais são encontrados em diversos tecidos como cérebro, músculo cardíaco, músculo liso vascular e pâncreas (TAURA J; KIRCHER D, M; GAMEIRO-ROS I; SLESINGER P, A., 2021).

Uma das formas de induzir convulsão aos animais utilizados na presente pesquisa, foi a administração do Pentilenotetrazol, este é um fármaco antagonista competitivo do receptor $GABA_A$. Como este receptor tem a função de inibir os efeitos sobre a atividade neuronal, sua inibição irá desencadear convulsões em grau mais acentuado (GONZÁLEZ et al., 2023). Quando ocorre o bloqueio de $GABA$, as concentrações de íons de Na^+ e Ca^{2+} vão estar elevados, o que favorece a hiperexcitabilidade do SNC, sendo esse um dos motivos de uma crise epilética (OLIVEIRA, 2001).

Nos estudos agudos, ao pinacidil em doses de 2,5 e 5 mg/kg observamos que não ocorreu proteção, o que pode ser explicado pelo fato de ao bloquear o neurotransmissor $GABA$, não ocorre o influxo de cloro oriundo da ligação $GABA/GABA_A$, sendo assim a concentração de potássio fornecida pela administração do pinacidil nessas doses não foi o suficiente para causar uma repolarização e hiperpolarização da célula, de forma a interromper a crise epilética. Já os animais que

receberam a dose de 10 mg/kg apresentaram proteção nos scores 7 e 8, o que se dá pela maior disponibilidade de íons potássio na região pós-sináptica, de forma a conseguir alterar a polaridade da célula, promovido pelo esgotamento de cálcio e sódio. O mesmo ocorreu quando considerado o experimento de kindling de PTZ com essa mesma dose de 10 mg/kg.

O outro indutor instituído no protocolo do estudo foi a pilocarpina, está é uma substância agonista colinérgico muscarínico, que vai atuar em receptores muscarínicos. Tais receptores estão distribuídos abundantemente pelo SNC, de forma a atuar na homeostase da excitabilidade neuronal. Sendo assim, a pilocarpina vai atuar elevando a disponibilidade desses receptores, o que gera um aumento de ligações entre glutamato/(M1-M5) resultando no maior influxo de íons Na^+ e Ca^{2+} o que gera excitabilidade do sistema desencadeando as crises epiléticas (LEE et al., 2022).

No caso do estudo utilizando a pilocarpina como indutor de crises e o pinacidil como tratamento observamos proteção em todas as doses de pinacidil utilizadas. Uma hipótese para tais resultados se dá pelo fato que o mesmo com a menor dose administrada de 2,5 mg/kg vai disponibilizar uma baixa concentração de potássio, somado a ação do cloro que é liberado pela ligação GABA/GABAA, vão ser o suficiente para impedir a progressão da crise.

Na fase crônica, o modelo Kindling de PTZ foi realizado. Com base nos dados obtidos na fase aguda, a dose que demonstrou os melhores resultados frente aos dois indutores foi de 10 mg/kg (ip), sendo, portanto, selecionada como a dose teste para a realização da fase crônica. O teste referente ao Kindling de PTZ teve por objetivo a indução de convulsões repetitivas, de forma a induzir uma patologia similar a epilepsia, sendo que a latência e a duração das crises vão alterando ao longo da avaliação (SHIMADA, T; YAMAGATA, K, 2018).

Os animais tratados com pinacidil apresentaram pontuações baixas nos critérios comportamentais para classificação das crises límbicas, conforme a tabela de Racine e colaboradores de 1972, em comparação ao grupo salina. As crises ocorreram até o nono dia dos 27 dias de tratamento. É relevante destacar que apenas 3.2% dos animais tratados experimentaram crises. Em contraste, todos os animais do grupo salina apresentaram crises com pontuação máxima ao longo de todo o tratamento.

O teste crônico de PTZ, confirma os resultados obtidos no teste agudo, fazendo uso da mesma dose, sendo capaz de uma proteção maior que 95% dos animais tratados.

Em relação ao teste de rotarod, observou-se que o pinacidil não causa nenhum impedimento motor nos animais, tanto na fase aguda quanto na fase crônica do estudo. É importante ressaltar que, mesmo em dose duas vezes superior àquela em que os efeitos anticonvulsivantes e ansiolíticos foram observados, não houve impacto negativo no desempenho motor dos animais. De fato, a maior dose em que os referidos efeitos foram observados nos testes anticonvulsivantes foi de 10 mg/kg (i.p). As doses de 10 mg/kg (i.p) e 20 mg/kg (i.p) foram avaliadas no experimento de rotarod para verificar o efeito do pinacidil no desempenho motor dos animais. Os resultados demonstraram que o pinacidil é bem tolerado pelos animais, não apresentando efeitos extrapiramidais significativos nem qualquer impedimento motor associado. Conseqüentemente, podemos afirmar que a análise evidencia que o efeito anticonvulsivante do pinacidil não é resultado de qualquer potencial impedimento motor causado pela droga, mas sim de um efeito farmacológico genuinamente anticonvulsivante.

Os testes toxicológicos de um medicamento são realizados principalmente para avaliar seus impactos na metabolização, excreção e potenciais toxidades. Nesse sentido, os principais focos de pesquisa incluem as alterações das funções hepáticas e renais. Dado que muitos medicamentos antiepiléticos podem induzir hepatotoxicidade, manifestada por inflamação em doenças agudas ou crônicas, as enzimas Alanina Aminotransferase (ALT) e Aspartato Aminotransferase são frequentemente utilizadas como indicadores dessas alterações (Dwivedi & Jena, 2018). Para avaliar a função renal, os níveis séricos de Creatinina e Ureia são dosados.

Em nossas avaliações, nenhuma das enzimas testadas apresentaram alteração durante o tempo de tratamento, quando comparadas a dois valores de referência de laboratórios distintos ou mesmo ao grupo controle interno do experimento, o que indica que a droga é segura nesse tempo de avaliação e quanto aos parâmetros de função renal e hepática avaliados.

Após realização de todos os testes descritos, tendo em vista seus resultados, observamos a importância que esse fármaco representa, uma vez que

apresentou resultados positivos para mais de uma patologia, e mais que isso, não desencadeou sonolência e privação de movimentos dos animais, sendo estes um dos principais efeitos colaterais causados por drogas que já são utilizadas na clínica da epilepsia e ansiedade.

Um dos principais motivos pela pesquisa de novos medicamentos que atuem principalmente no controle da epilepsias e transtornos mentais se dá justamente pela busca de drogas que causem menores efeitos colaterais aos seus usuários (KWON J,Y; JEON M,T; JUNG U,J; KIM D,W; MOON G,J; KIM S,R., 2019). Dentre os principais efeitos adversos que essas medicações vão causar estão a sonolência, tonturas, distúrbios gastrointestinais, alteração de humor e comportamento, incoordenação motora, dificuldade de cognição, ganho de peso, falta de libido e sobrecarga hepática (SOLMI M; FORNARO M; OSTINELLI E,G; ZANGANI C; CROATTO G; MONACO F; KRINITSKI D; FUSAR-POLI P; CORRELL C,U., 2020). Por tanto, devido a essa vasta gama de efeitos, muitos pacientes abandonam o tratamento, sendo assim observamos a necessidade de apresentar medicamentos como o pinacidil, de forma a minimizar tais efeitos, permitindo o tratamento contínuo sem abandono por contas das adversidades causados pelos medicamentos.

Sendo assim, estes novos efeitos farmacológicos se somam aqueles outros já sabidos para o pinacidil, como principalmente o efeito anti-hipertensivo (LIU, et al., 2024). Tal interação de efeitos como ação hipertensiva e ansiolítica já está descrito na literatura na através dos beta-bloqueadores (REPOVA, et al., 2022) Dessa forma temos uma incrementação da ação da droga, o que pode favorecer usuários que sejam portadores de epilepsia e crises de ansiedade, sendo assim e possível que seja sugerido um reposicionamento terapêutico do fármaco.

Com base nisso, ao compararmos o processo de desenvolvimento de um novo medicamento com o reposicionamento, observamos que criar algo completamente novo exige altos investimentos financeiros, especialmente em relação aos estudos necessários (JARADA T,N; ROKNE J,G; ALHAJJ R., 2020). Estes estudos envolvem a exploração de novas opções de tratamento para várias doenças, partindo do desenvolvimento de hipóteses sobre seus mecanismos de ação na fase pré-clínica, seguidos por procedimentos mais complexos de teste e, se aprovados, de produção. Por outro lado, o reposicionamento, que estamos propondo com nosso trabalho, representa economia significativa de tempo e investimento, uma vez que os

custos são consideravelmente menores em comparação à pesquisa de novos medicamentos. Obviamente, trata-se aqui de um estudo inicial que carece de maiores comprovações e experimentos adicionais para o concreto reposicionamento do fármaco para além de suas atividades farmacológicas já conhecidas.

Outro ponto a ser considerando que essas atividades farmacológicas observadas neste trabalho se deram após a administração sistêmica (i.p.) de pinacidil, é razoável concluir que este composto consegue penetrar a barreira hematoencefálica. Drogas que apresentam essa característica, podem oferecer benefícios significativos em termos de eficácia terapêutica, principalmente no tratamento de condições neurológicas e psiquiátricas, como a epilepsia e a ansiedade, tornando os mais atrativos em termos de perspectivas farmacocinéticas e farmacêuticas (SCHMIEDEBERGS, et al., 2023).

6. CONCLUSÃO

A presente pesquisa demonstrou as propriedades anticonvulsivante do pinacidil. Os resultados obtidos evidenciaram a efetividade do fármaco em dois modelos de convulsão, PTZ e pilocarpina, no estudo agudo e kindling de PTZ no modelo crônico. Do mesmo modo, os testes do Labirinto em Cruz Elevado, Open Field e Teste Claro-Escuro revelaram uma atividade ansiolítica de discreta a moderada para o fármaco. Nenhum déficit motor foi causado pelo pinacidil aos animais conforme mostrado pelos tetes do rotarod. Além disso, o fármaco é bem tolerado pelos animais, uma vez que o mesmo não promove alterações das funções hepática e renal como medido por marcadores bioquímicos. O trabalho apresenta marcado interesse farmacêutico ao sugerir possível reposicionamento terapêutico do fármaco para além de suas ações anti-hipertensivas e anti-angina já conhecidos da prática médica.

7. REFERÊNCIAS

ABBASKHANIAN, A. et al. Comparison of the effect of continuous intravenous infusion of sodium valproate and midazolam on management of status epilepticus in children. *Archives de Pédiatrie*, v. 28, n. 8, p. 696-701, nov. 2021. DOI: 10.1016/j.arcped.2021.08.003.

AL-DALAHMAH, O. et al. The Matrix Receptor CD44 Is Present in Astrocytes throughout the Human Central Nervous System and Accumulates in Hypoxia and Seizures. *Cells*, v. 13, n. 2, p. 129, jan. 2024. DOI: 10.3390/cells13020129.

AKYUZ, E.; KOKLU, B.; UNER, A.; ANGELOPOULOU, E.; PAUDEL, Y. N. Envisioning the role of inwardly rectifying potassium (Kir) channel in epilepsy. *J Neurosci Res*, v. 100, n. 2, p. 413-443, fev. 2022. DOI: 10.1002/jnr.24985.

ALONSO, W. J. et al. Covid-19 em contexto: comparação com a mortalidade mensal por causas respiratórias nos estados brasileiros. *InterAmerican Journal of Medicine and Health*, v. 3, p. 1-21, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.31005/iajmh.v3i0.93>>. Acesso em: 24 jun. 2024.

AMBRIZ-PEREZ, D. L. et al. Phenolic compounds: Natural alternative in inflammation treatment. A Review. *Cogent Food & Agriculture*, [S.l.], v. 2, n. 1, p. 1-14, 2016. Informa UK Limited. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/23311932.2015.1131412>>. Acesso em: 24 jun. 2024.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. *DSM-IV. Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais*. Porto Alegre: ARTMED, 5. ed., 992 p., 2014.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PSIQUIATRIA. *Transtornos de Ansiedade: Diagnóstico e Tratamento*. Projeto Diretrizes - Associação Médica Brasileira, Conselho Federal de Medicina, 2008.

ATACK, J. R. Gabaa receptor subtype-selective modulators. I. A2/α3-selective agonists as non-sedating anxiolytics. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, [S.l.], v. 11, n. 9, p. 1176-1202, maio 2011.

AVANZINI, G.; FRANCESCHETTI, S.; MANTEGAZZA, M. Epileptogenic channelopathies: experimental models of human pathologies. *Epilepsia*, v. 48, n. 2, p. 51-64, 2007.

BADAWY, R. A. B.; HARVEY, A. S.; MACDONELL, R. A. L. Cortical hyperexcitability and epileptogenesis: understanding the mechanisms of epilepsy – part 1. *Journal of Clinical Neuroscience*, v. 16, p. 355-365, 2009.

BAI, Y. F. et al. Molecular mechanisms of topiramate and its clinical value in epilepsy. *Seizure*, v. 98, p. 51-56, maio 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2022.03.024>.

BALENTINE, D. et al. Recommendations on reporting requirements for flavonoids in research. *The American Journal Of Clinical Nutrition*, [S.l.], v. 101, n. 6, p. 1113-1125, 2015. Oxford University Press (OUP). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3945/ajcn.113.071274>.

BELTRAMI, L. et al. Ansiedade e depressão em mães de crianças com distúrbios de linguagem: a importância do trabalho interdisciplinar. *Fractal – Revista de Psicologia*, v. 25, n. 3, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s1984-02922013000300007>.

BLASER, Heiko et al. TNF and ROS crosstalk in inflammation. *Trends in Cell Biology*, v. 26, n. 4, p. 249-261, 2016.

BOLETI, A. et al. Pathophysiology to Risk Factor and Therapeutics to Treatment Strategies on Epilepsy, n. 14, p. 71, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/brainsci14010071>.

BOU NASIF, M.; KOUBEISSI, M.; AZAR, N. J. Epilepsy - from mysticism to science. *Rev Neurol (Paris)*, v. 177, n. 9, p. 1047-1058, nov. 2021. Epub 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.neurol.2021.01.021>>. Acesso em: 24 jun. 2024.

BOWIE, D. Ionotropic glutamate receptors & CNS disorders. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, v. 7, n. 2, p. 129-143, abr. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/187152708784083821>.

BOZDA G, M.; ERASLAN, G. The effect of diosmin against lead exposure in rats. *Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology*, v. 393, p. 639–649, 2020.

BRADWEJN, J. et al. Cholecystokinin antagonists in panic and anxiety disorders. In: HALBREICH, U.; MONTGOMERY, A. S. *Pharmacotherapy for Mood, Anxiety, and Cognitive Disorders*. Washington, DC: American Psychiatric Press, 2000, p. 411-437.

BRITO, Fausto et al. As tendências da população mundial: rumo ao crescimento zero. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos – População e Políticas Sociais no Brasil: os desafios da transição demográfica e das migrações internacionais. CGEE, Brasília, DF, 2008.

BRYSON, A. et al. Fundamental Neurochemistry Review: GABAA receptor neurotransmission and epilepsy: Principles, disease mechanisms and pharmacotherapy. *Journal of Neurochemistry*, v. 165, n. 1, p. 6-28, abr. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jnc.15769>.

BUFFO, A.; ROLANDO, C.; CERUTI, S. Astrócitos no cérebro danificado: insights moleculares e celulares sobre sua resposta reativa e potencial de cura. *Bioquímica e Farmacologia*, v. 79, p. 77–89, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016>.

CALLAGHAN, J. T.; GOLDBERG, M. R.; BRUNELLE, R. Double-blind comparator trials with pinacidil, a potassium channel opener. *Drugs*, v. 36, Suppl 7, p. 77-82, 1988. DOI: 10.2165/00003495-198800367-00014. PMID: 3076139.

CARRIZOSA-MOOG, J. Historical review of the cultural concepts around the denominations of epilepsy. *Epilepsy & Behavior*, v. 137, Pt A, 108979, dec. 2022. DOI: 10.1016/j.yebeh.2022.108979.

CASCELLA, M. et al. Características, avaliação e tratamento do coronavírus (COVID-19). Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/nbk554776/>. 2022.

CHANG, C. K. R. H. et al. Mortalidade por todas as causas entre pessoas com doença mental grave (SMI), transtornos por uso de substâncias e transtornos depressivos no sudeste de Londres: um estudo de coorte. *BMC Psiquiatria, Diálogos em Neurologia Clínica*, v. 3, 2011.

CHEN, Lei et al. Modifications of dietary flavonoids towards improved bioactivity: an update on structure–activity relationship. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 58, n. 4, p. 513-527, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2016.1196334>.

CHEN, Z. et al. Resultados do tratamento em pacientes com epilepsia recém-diagnosticada tratados com drogas antiepilépticas estabelecidas e novas: um estudo de coorte longitudinal de 30 anos. *Jama Neurology*, v. 75, p. 279-286, 2018.

CHOI, J. et al. Cellular injury and neuroinflammation in children with chronic intractable epilepsy. *Journal of Neuroinflammation*, v. 6, p. 38, 2009.

COLANGELI, R.; MORENA, M.; PITTMAN, Q. J.; HILL, M. N.; TESKEY, G. C. Anandamide Signaling Augmentation Rescues Amygdala Synaptic Function and Comorbid Emotional Alterations in a Model of Epilepsy. *J Neurosci*, v. 40, n. 31, p. 6068-6081, 29 jul. 2020. Epub 29 jun. 2020. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0068-20.2020.

COOPER, E. C. et al. Colocalization and coassembly of two human brain M-type potassium channel subunits that are mutated in epilepsy. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, v. 97, n. 9, p. 4914-4919, 2000. DOI: 10.1073/pnas.090092797.

CUI, Y. et al. Aberrant Connectivity During Pilocarpine-Induced Status Epilepticus. *International Journal of Neural Systems*, v. 30, n. 5, 2020. DOI: 10.1142/S0129065719500291. PMID: 31847633.

DA SILVA, C. P. et al. Antidepressant activity of Riparin A in murine model. *Behavioural Pharmacology*, v. 32, n. 7, p. 599-606, 2021. DOI: 10.1097/FBP.0000000000000654.

DE OLIVEIRA, D. D. et al. Vitexin possesses anticonvulsant and anxiolytic-like effects in murine animal models. *Frontiers in Pharmacology*, v. 11, 2020. DOI: 10.3389/fphar.2020.01181.

DECKERS, C. L. P.; GENTON, P.; SCHMIDT, D. Current limitations of antiepileptic drug therapy: a conference review. *Epilepsy Research*, v. 53, p. 1-17, 2003.

DEDEK, K. et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v. 98, p. 12272-12277, 2001.

DEVINSKY, O. et al. Trial of cannabidiol for drug-resistant seizures in the Dravet syndrome. *New England Journal of Medicine*, v. 376, n. 21, p. 2011-2020, 2017. DOI: 10.1056/nejmoa1611618.

DICKS, L. M. T. Gut Bacteria and Neurotransmitters. *Microorganisms*, v. 10, n. 9, 1838, sep. 2022. DOI: 10.3390/microorganisms10091838.

DURANT, C.; CHRISTMAS, D.; NUTT, D. The pharmacology of anxiety. *Current Topics in Behavioral Neuroscience*, v. 2, p. 303-330, 2010. DOI: 10.1007/7854_2009_8.

DUTRA, R. C. et al. Medicinal plants in Brazil: pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. *Pharmacological Research*, v. 112, p. 4-29, 2016.

DWIVEDI, D. K.; JENA, G. B. Glibenclamide protects against thioacetamide-induced liver damage in Wistar rats: investigation on NLRP3, MMP-2 and stellate cell activation.

Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, v. 391, n. 11, p. 1257–1274, 2018.

FAN, C. et al. Calcium-gated potassium channel blockade via membrane-facing fenestrations. *Nature Chemical Biology*, v. 20, p. 52–61, 2024. DOI: 10.1038/s41589-023-01406-2.

FATTORI, V. et al. Diosmin treats lipopolysaccharide-induced inflammatory pain and peritonitis by blocking NF- κ B activation in mice. *Journal of Natural Products*, v. 83, p. 1018–1026, 2020.

FERNANDES, M. J. S. Epilepsia do lobo temporal: mecanismos e perspectivas. *Estudos Avançados*, v. 27, n. 77, p. 85-96, 2013. DOI: 10.1590/s0103-40142013000100007.

FISCHER, R.; MAIER, O. Interrelation of oxidative stress and inflammation in neurodegenerative disease: role of TNF. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2015, p. 1-18, 2015. DOI: 10.1155/2015/610813.

FISHER, R. S. et al. Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*, 2017.

FRIEDEL, H. A.; BROGDEN, R. N. Pinacidil. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in the treatment of hypertension. *Drugs*, v. 39, n. 6, p. 929-967, 1990. DOI: 10.2165/00003495-199039060-00008.

GALLUCCI NETO, J.; MARCHETTI, R. L. Aspectos epidemiológicos e relevância dos transtornos mentais associados à epilepsia. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v. 27, p. 323-328, 2005.

GARCÍA-RODRÍGUEZ, C. et al. Probenecid, an Old Drug with Potential New Uses for Central Nervous System Disorders and Neuroinflammation. *Biomedicines*, v. 11, n. 6, 1516, may 2023. DOI: 10.3390/biomedicines11061516.

GITAÍ, D. L. G. et al. Genes e epilepsia i: epilepsia e alterações genéticas. Revista da Associação Médica Brasileira, v. 54, n. 3, p. 272-278, 2008.

GOMES, J. P.; GASPAR, D. M. A origem da depressão: teorias sobre o desconhecido. IV Simpósio de Pesquisa em Ciências Médicas, 2018.

GOMES-SILVA, A. C. G.; GIBERTONI, T. B. Checklist of the aphylophoraceous fungi (agaricomycetes) of the Brazilian Amazonia. Mycotaxon, v. 108, p. 319-322, 2009.

GONG, G. et al. In Vivo Screening of Xanthones from *Garcinia oligantha* Identified Oliganthin H as a Novel Natural Inhibitor of Convulsions. Journal of Natural Products, v. 83, n. 12, p. 3706-3716, dec. 2020. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.0c00963.

GONZÁLEZ-TRUJANO, M. E. et al. Pharmacological and toxicological effects of *Ruta chalepensis* L. on experimentally induced seizures and electroencephalographic spectral power in mice. Journal of Ethnopharmacology, v. 271, p. 113866, 2021. DOI: 10.1016/j.jep.2021.113866.

GOYATÁ, S. L. T. et al. Effects from acupuncture in treating anxiety: integrative review. Revista Brasileira de Enfermagem, v. 69, n. 3, p. 564-571, 2016.

GRIFFIN JR, E. A.; LOWENSTEIN, D. H. Farmacologia da neurotransmissão elétrica anormal no sistema nervoso central. In: GOLAN DE, TASHJIAN AH, ARMSTRONG EJ, ARMSTRONG AW. (eds). Princípios de Farmacologia: A Base Fisiopatológica da Farmacoterapia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 203-216, 2009.

GUERREIRO CAM. História do surgimento e desenvolvimento das drogas antiepilépticas. J Epilepsy Clin Neurophysiol; 12(1):18-21, 2006.

HANISCH, U. K.; KETTENMANN, H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. Nature Neuroscience, v. 10, n. 11, p. 1387-1394, 2007.

HERON, S. E. et al. Channelopathies in idiopathic epilepsy. *Neurotherapeutics*, v. 4, n. 2, p. 295-304, 2007. DOI: 10.1016/j.nurt.2007.01.009.

HOSSAIN, M. M. et al. Epidemiology of mental health problems in covid-19: a review. *F1000Research*, v. 9, p. 636, 2020.

IGUCHI, K. et al. Pinacidil, a KATP channel opener, stimulates cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchanger function through the NO/cGMP/PKG signaling pathway in guinea pig cardiac ventricular myocytes. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, v. 392, n. 8, p. 949-959, aug. 2019. DOI: 10.1007/s00210-019-01642-1.

IMAM, F. et al. Pharmacological research. *Pharmacological Research*, v. 102, p. 1-11, 2015.

JARADA, T. N.; ROKNE, J. G.; ALHAJJ, R. A review of computational drug repositioning: strategies, approaches, opportunities, challenges, and directions. *Journal of Cheminformatics*, v. 12, n. 1, p. 46, 2020. DOI: 10.1186/s13321-020-00450-7.

JIMÉNEZ-DINAMARCA, I. et al. GABAergic Regulation of Astroglial Gliotransmission through Cx43 Hemichannels. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 21, 13625, nov. 2022. DOI: 10.3390/ijms232113625.

KAMUENE, J. M.; XU, Y.; PLANT, L. D. The Pharmacology of Two-Pore Domain Potassium Channels. *Handbook of Experimental Pharmacology*, v. 267, p. 417-443, 2021. DOI: 10.1007/164_2021_462.

KHAN, R. et al. Role of Potassium Ion Channels in Epilepsy: Focus on Current Therapeutic Strategies. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets*, v. 23, n. 1, p. 67-87, 2024. DOI: 10.2174/1871527322666221227112621.

KHEZERLOU, E.; PRAJAPATI, N.; DECOSTER, M. A. Negative Feedback Role of Astrocytes in Shaping Excitation in Brain Cell Co-cultures. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, v. 15, 651509, jul. 2021. DOI: 10.3389/fncel.2021.651509.

KIM, E. H. Comprometimento cognitivo na epilepsia de início na infância: informações atualizadas sobre suas causas, *Korean Journal of Pediatrics*, v. 59, p. 155-164, 2016.

KNOWLES, K. A.; TOLIN, D. F. Reductions in Anxiety are Associated with Decreased Expressive Suppression and Increased Cognitive Reappraisal After Cognitive-Behavioral Treatment: A Naturalistic Study in Youth. *Child Psychiatry and Human Development*, mar. 2024. DOI: 10.1007/s10578-024-01684-4.

KOH, W. et al. GABA tone regulation and its cognitive functions in the brain. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 24, n. 9, p. 523-539, 2023. DOI: 10.1038/s41583-023-00724-7.

KOPEIKINA, E. et al. Platelets promote epileptic seizures by modulating brain serotonin level, enhancing neuronal electric activity, and contributing to neuroinflammation and oxidative stress. *Progress in Neurobiology*, v. 188, 101783, may 2020. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2020.101783.

KRAWCZYK, M. C. et al. Critical role of hippocampal muscarinic acetylcholine receptors on memory reconsolidation in mice. *Neurobiology of Learning and Memory*, v. 177, p. 107360, 2021. DOI: 10.1016/j.nlm.2020.107360.

KUMAR, G. Evaluation and management of drug resistant epilepsy in children. *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care*, v. 51, n. 7, p. 101035, jul. 2021. DOI: 10.1016/j.cppeds.2021.101035.

KWON, J. Y. et al. Perspective: Therapeutic Potential of Flavonoids as Alternative Medicines in Epilepsy. *Advances in Nutrition*, v. 10, n. 5, p. 778-790, 2019. DOI: 10.1093/advances/nmz047.

KWON, M. J. et al. The Influence of Tyrosol-Enriched *Rhodiola sachalinensis* Extracts Bioconverted by the Mycelium of *Bovista plumbe* on Scopolamine-Induced Cognitive, Behavioral, and Physiological Responses in Mice. *Molecules*, v. 27, n. 14, p. 4455, 2022. DOI: 10.3390/molecules27144455.

LACERDA, D. C.; OLIVEIRA, J. B.; ALMEIDA, R. N. Flavonóides com atividade ansiolítica: mecanismos de ação e perspectivas de incorporação no manejo dos transtornos de ansiedade. Congresso Nacional de Pesquisa e Ensino em Ciências Médicas, 2019.

LEBLANC, R. Charcot's motor brain map and 19th-century neurosurgery. *Journal of Neurosurgery*, v. 135, n. 6, p. 1843-1848, apr. 2021. DOI: 10.3171/2020.10.JNS202651.

LEE, K. et al. Functional Importance of Transient Receptor Potential (TRP) Channels in Neurological Disorders. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 9, p. 611773, mar. 2021. DOI: 10.3389/fcell.2021.611773.

LEE, S. et al. The Application of the Neuroprotective and Potential Antioxidant Effect of Ergotamine Mediated by Targeting N-Methyl-D-Aspartate Receptors. *Antioxidants*, v. 11, n. 8, p. 1471, 2022. DOI: 10.3390/antiox11081471.

LI, M. et al. Pinacidil ameliorates cardiac microvascular ischemia–reperfusion injury by inhibiting chaperone-mediated autophagy of calreticulin. *Basic Research in Cardiology*, v. 119, p. 113-131, 2024. DOI: 10.1007/s00395-023-01028-8.

LI, Y.; AZIZ, Q.; TINKER, A. The Pharmacology of ATP-Sensitive K⁺ Channels (KATP). *Handbook of Experimental Pharmacology*, v. 267, p. 357-378, 2021. DOI: 10.1007/164_2021_466.

LIANG, Y. et al. Mental health in frontline medical workers during the 2019 novel coronavirus disease epidemic in China: a comparison with the general population. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 17, n. 18, p. 6550, 2020. DOI: 10.3390/ijerph17186550.

LISS, B.; ROEPER, J. Fisiologia molecular de canais k-atp neuronais. *Molecular Membrane Biology*, v. 18, p. 117-127, 2001.

LISS, B.; ROEPER, J. Molecular physiology of neuronal K-ATP channels (review). *Molecular Membrane Biology*, v. 18, n. 2, p. 117-127, 2001. DOI: 10.1080/09687680010012953.

LOESCHER, W.; FRIEDMAN, A. Structural, Molecular, and Functional Alterations of the Blood-Brain Barrier during Epileptogenesis and Epilepsy: A Cause, Consequence, or Both? *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, p. 591, 2020. DOI: 10.3390/ijms21020591.

LOESCHER, W.; SCHMIDT, D. New horizons in the development of antiepileptic drugs. *Epilepsy Research*, v. 50, p. 3-16, 2002.

MAROIS, G.; MUTTARAK, R.; SCHERBOV, S. Avaliação do impacto potencial do covid-19 na expectativa de vida. *PLOS ONE*, v. 15, n. 9, p. e0238678, 2020. DOI: 10.1371/journal.pone.0238678.

MIRA, R. G.; LIRA, M.; CERPA, W. Traumatic Brain Injury: Mechanisms of Glial Response. *Frontiers in Physiology*, v. 12, 740939, oct. 2021. DOI: 10.3389/fphys.2021.740939.

MIRANDAT, S. et al. Incidência dos casos de transtornos mentais durante a pandemia da covid-19. *Revista Eletrônica Acervo Científico*, v. 17, p. 4873, 2020. URL: <https://acervomais.com.br/index.php/cientifico/article/view/4873>.

MONAGHAN, M. M. et al. Localização experimental de subunidades δ e γ do canal k^+ dependente de voltagem da família $kv1$ na formação do hipocampo de ratos. *Journal of Neuroscience*, v. 21, p. 5973-5983, 2001.

MONTIEL, J. M. et al. Caracterização dos sintomas de ansiedade em pacientes com transtorno de pânico. *Boletim Academia Paulista de Psicologia*, v. 34, n. 86, p. 171-185, 2014.

MORAES, L. R. et al. Aspectos neuropsiquiátricos da covid-19. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 4, 2021. URL: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/13803>.

MOREIRA, S. R. G. Epilepsia: concepção histórica, aspectos conceituais, diagnóstico e tratamento. *Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology*, v. 2, n. 3, p. 1-12, 2004.

MRAZEK, D. A. et al. Uma revisão da carga clínica, econômica e social da depressão resistente ao tratamento: 1996-2013. *Serviço de Psiquiatria*, 2014.

NERI, S. et al. Epilepsy in neurodegenerative diseases. *Epileptic Disorders*, v. 24, n. 2, p. 249-273, 2022. DOI: 10.1684/epd.2021.1406.

NETO, J. G.; MARCHETTI, R. L. Aspectos epidemiológicos e relevância dos transtornos mentais associados à epilepsia. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, São Paulo, v. 27, n. 4, p. 323-328, mar. 2005.

NICKELS, K. Childhood Neurologic Conditions: Epilepsy Management. *FP Essentials*, v. 523, p. 15-19, dec. 2022.

NIKITIN, E. S.; VINOGRADOVA, L. V. Potassium channels as prominent targets and tools for the treatment of epilepsy. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, v. 25, n. 3, p. 223-235, mar. 2021. DOI: 10.1080/14728222.2021.1908263.

NILSSON, M. et al. An epilepsy-associated KV1.2 charge-transfer-center mutation impairs KV1.2 and KV1.4 trafficking. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*, v. 119, n. 17, 2022. DOI: 10.1073/pnas.2113675119.

NIMMERJAHN, A. et al. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*, v. 308, n. 5726, p. 1314-1318, mai. 2005.

OLIVEIRA, M. S. et al. Prostaglandin E2 modulates Na⁺,K⁺-ATPase activity in rat hippocampus: implications for neurological diseases. *Journal of Neurochemistry*, v. 109, n. 2, p. 416-426, abr. 2009.

OMELCHENKO, A.; SINGH, N. K.; FIRESTEIN, B. L. Current advances in in vitro models of central nervous system trauma. *Current Opinion in Biomedical Engineering*, v. 14, p. 34-41, jun. 2020. DOI: 10.1016/j.cobme.2020.05.002.

PAKALA, R. S.; BROWN, K. N.; PREUSS, C. V. Cholinergic Medications. *StatPearls*, 2023. PMID: 30844190.

PAVONE, P.; GULIZIA, C.; LE PIRA, A.; GRECO, F.; PARISI, P.; DI CARA, G.; FALSAPERLA, R.; LUBRANO, R.; MINARDI, C.; SPALICE, A.; RUGGIERI, M. Cerebral Palsy and Epilepsy in Children: Clinical Perspectives on a Common Comorbidity. *Children (Basel)*, v. 8, n. 1, p. 16, 31 dez. 2020. DOI: 10.3390/children8010016.

PEDLEY, T. A.; BAZIL, C. W.; MORRELL, M. J. Epilepsia. In: ROWLAND, L. P. Merritt Tratado de Neurologia. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 705-722.

PERRY, V. H.; HOLMES, C. Microglial priming in neurodegenerative disease. *Nature Reviews Neurology*, v. 10, n. 4, p. 217-224, 18 mar. 2014. DOI: 10.1038/nrneurol.2014.38.

PERUCCA E, BIALER M, WHITE HS. New GABA-Targeting Therapies for the Treatment of Seizures and Epilepsy: I. Role of GABA as a Modulator of Seizure Activity and Recently Approved Medications Acting on the GABA System. *CNS Drugs*. 2023 Sep;37(9):755-779. DOI: 10.1007/s40263-023-01027-2.

PITKÄNEN, A.; LUKASIUK, K. Molecular and cellular basis of epileptogenesis in symptomatic epilepsy. *Epilepsy & Behavior*, v. 14, p. 16-25, 2009.

PORTO, L. A. et al. O papel dos canais iônicos nas epilepsias e considerações sobre as drogas antiepilépticas – uma breve revisão. *J Epilepsy Clin Neurophysiol*, v. 13, n. 4, p. 169-175, 2007.

RANSOHOFF, R. M.; PERRY, V. H. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annual Review of Immunology*, v. 27, p. 119-145, 2009.

RAO, T. B. et al. Effect of nicorandil on pentylentetrazole (PTZ) induced convulsions in mice. *International Journal of Clinical and Biomedical Research*, v. 1, n. 2, p. 99-101, 2015. Available at: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/sea-178598>.

RAWAL, B.; BALLANYI, K. Mediation of Sinusoidal Network Oscillations in the Locus Coeruleus of Newborn Rat Slices by Pharmacologically Distinct AMPA and KA Receptors. *Brain Sciences*, v. 12, n. 7, 945, jul. 2022. DOI: 10.3390/brainsci12070945.

REKTOR, I. et al. Epilepsy, behavior, and art (Epilepsy, Brain, and Mind, part 1). *Epilepsy & Behavior*, v. 28, p. 261-282, 2013. DOI: 10.1016/j.yebeh.2013.

REPOVA, K. et al. Cardiovascular therapeutics: A new potential for anxiety treatment? *Medicine Research Reviews*, v. 42, n. 3, p. 1202-1245, 2022. DOI: 10.1002/med.21875.

RICKELS, K. et al. A double-blind, placebo-controlled trial of abecarnil and diazepam in the treatment of patients with generalized anxiety disorder. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, v. 20, n. 1, p. 12-18, 2000.

ROBERTS, S. M.; BEZINOVER, D. S.; JANICKI, P. K. Reappraisal of the role of dolasetron in prevention and treatment of nausea and vomiting associated with surgery or chemotherapy. *Cancer Management and Research*, v. 4, p. 67-73, 2012.

RODRÍGUEZ, T. Síndromes convulsivos y epilepsia: mecanismos fisiopatológicos. 2002. Disponível em: <http://www.iespana.es/medicinausach/fisiopat/epi.htm>.

ROGAWASKI, M. A.; LÖSCHER, W. The neurobiology of antiepileptic drugs. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 5, n. 7, p. 553-564, 2004.

ROSENBAUM, T.; MORALES-LÁZARO, S. L. Regulation of ThermoTRP Channels by PIP2 and Cholesterol. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 1422, p. 245-277, 2023. DOI: 10.1007/978-3-031-21547-6_9.

RUIZ-FERNÁNDEZ, M. D. et al. Emotions, Feelings, and Experiences of Social Workers While Attending to Vulnerable Groups: A Qualitative Approach. *Healthcare (Basel)*, v. 9, n. 1, 87, jan. 2021. DOI: 10.3390/healthcare9010087.

SAKLA, M. et al. A Review of Current and Prospective Treatments for Channelopathies, with a Focus on Gene and Protein Therapy. *Current Pharmaceutical Design*, v. 29, n. 17, p. 1341-1360, 2023. DOI: 10.2174/1381612829666230601122846.

SCHARFMAN, H. E. The neurobiology of epilepsy. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, v. 7, n. 4, p. 348-354, 2007.

SCHMIDT, D.; LÖSCHER, W. Resistência a drogas na epilepsia: neurobiológica putativa e mecanismos clínicos. *Epilepsia*, 2005.

SCOTT, A. J. et al. Systematic Review and Meta-Analysis of Anxiety and Depression in Youth With Epilepsy. *Journal of Pediatric Psychology*, v. 45, n. 2, p. 133-144, 2020. DOI: 10.1093/jpepsy/jsz099.

SERAFINI, R. How much can medical management alone improve the outcome of adult drug-resistant epilepsy? An exploratory study on possibilities and limitations of combining multiple therapeutic actions. *Epilepsy & Behavior*, v. 122, 108065, sep. 2021. DOI: 10.1016/j.yebeh.2021.108065.

SHALKAMI, A. S.; HASSAN, M.; BAKR, A. G. Anti-inflammatory, antioxidant and anti-apoptotic activity of diosmin in acetic acid-induced ulcerative colitis. *Human & Experimental Toxicology*, v. 37, p. 78–86, 2017.

SHIMADA, T.; YAMAGATA, K. Pentylentetrazole-Induced Kindling Mouse Model. *Journal of Visualized Experiments*, n. 136, p. 56573, 12 jun. 2018. DOI: 10.3791/56573.

SINGAREDDY, S. S. et al. ATP-sensitive potassium channels in zebrafish cardiac and vascular smooth muscle. *The Journal of Physiology*, v. 600, n. 2, p. 299-312, jan. 2022. DOI: 10.1113/JP282157.

SINHA, A. K.; LEE, C.; HOLT, J. C. KCNQ2/3 regulates efferent mediated slow excitation of vestibular afferents in mammals. *bioRxiv*, jan. 2024. DOI: 10.1101/2023.12.30.573731.

SOARES, J. M. et al. Diosmin induces caspase-dependent apoptosis in human glioblastoma cells. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 91, 2019.

SOBOLEVA, E. B.; AMAKHIN, D. V.; SINYAK, D. S.; ZAITSEV, A. V. Modulation of seizure-like events by the small conductance and ATP-sensitive potassium ion channels. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 623, p. 74-80, 1 out. 2022. Epub 19 jul. 2022. DOI: 10.1016/j.bbrc.2022.07.057.

SOLMI, M. et al. Safety of 80 antidepressants, antipsychotics, anti-attention-deficit/hyperactivity medications and mood stabilizers in children and adolescents with psychiatric disorders: a large scale systematic meta-review of 78 adverse effects. *World Psychiatry*, v. 19, n. 2, p. 214-232, 2020. DOI: 10.1002/wps.20765.

STEIN, W. et al. The dynamic range of voltage-dependent gap junction signaling is maintained by Ih-induced membrane potential depolarization. *Journal of Neurophysiology*, v. 127, n. 3, p. 776-790, mar. 2022. DOI: 10.1152/jn.00545.2021.

STEINLEIN, O. K. Genetic mechanisms that underlie epilepsy. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 5, p. 400-408, 2004.

SUN, H.; UNDEM, B. J. Selective KCNQ2/3 Potassium Channel Opener ICA-069673 Inhibits Excitability in Mouse Vagal Sensory Neurons. *The Journal of Pharmacology*

and Experimental Therapeutics, v. 389, n. 1, p. 118-127, mar. 2024. DOI: 10.1124/jpet.123.001959.

SUN, J. et al. SK2 channel regulation of neuronal excitability, synaptic transmission, and brain rhythmic activity in health and diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, v. 1867, n. 12, 118834, 2020. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2020.118834.

SWEENEY, M. D.; SAGARE, A. P.; ZLOKOVIC, B. V. Blood–brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Nature Reviews Neurology*, v. 14, p. 133–150, 2018. DOI: 10.1007/s00210-023-02485-7.

TAKESHIMA, M. et al. Does cognitive behavioral therapy for anxiety disorders assist the discontinuation of benzodiazepines among patients with anxiety disorders? A systematic review and meta-analysis. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, v. 75, n. 4, p. 119-127, apr. 2021. DOI: 10.1111/pcn.13195.

TARRADA, A.; ARON, O.; VIGNAL, J. P.; ERTAN, D.; MAILLARD, L.; HINGRAY, C. Anticipatory anxiety of seizures is associated with ictal emotional distress and amygdala onset seizures. *Epilepsia*, v. 63, n. 5, p. 1130-1140, maio 2022. Epub 20 mar. 2022. DOI: 10.1111/epi.17215.

THOMAS, W. B. Idiopathic epilepsy in dogs. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v. 40, p. 161-179, 2010.

TOLLEFSON, G. D. Why a peptide as an anxiolytic? In: HALBREICH, U.; MONTGOMERY, A. S. *Pharmacotherapy for Mood, Anxiety, and Cognitive Disorders*. Washington (DC): American Psychiatric Press, 2000. p. 399-409.

TRACY, G. C. et al. Heterozygous Deletion of Epilepsy Gene KCNQ2 Has Negligible Effects on Learning and Memory. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, v. 16, p. 930216, jul. 2022. DOI: 10.3389/fnbeh.2022.930216.

VAN LOO, K. M. J.; BECKER, A. J. Transcriptional Regulation of Channelopathies in Genetic and Acquired Epilepsies. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, v. 13, p. 587, jan. 2020. DOI: 10.3389/fncel.2019.00587.

VAUGHAN RA, HENRY LK, FOSTER JD, BROWN CR. Post-translational mechanisms in psychostimulant-induced neurotransmitter efflux. *Adv Pharmacol.* 2024;99:1-33. doi: 10.1016/bs.apha.2023.10.003. Epub 2024 Feb 17. PMID: 38467478.

VAZQUEZ; DEVINSKY, Orrin. Epilepsy and anxiety. *Epilepsy & Behavior*, v. 4, Suppl 4, p. 20-25, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2003.10.005>.

VENKATACHALAM, K. et al. The Novel Pimavanserin Derivative ST-2300 with Histamine H3 Receptor Affinity Shows Reduced 5-HT2A Binding, but Maintains Antidepressant- and Anxiolytic-like Properties in Mice. *Biomolecules*, v. 12, n. 5, 683, may 2022. DOI: 10.3390/biom12050683.

VEZZANI, A. et al. The role of inflammation in epilepsy. *Nature Reviews Neurology*, v. 7, n. 1, p. 31-40, jan. 2011.

WACHEŁKO, O. et al. New approach for barbiturates, phenytoin, methyprylon and glutethimide determination and fragmentation (UHPLC-MS/MS). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 228, 115318, may 2023. DOI: 10.1016/j.jpba.2023.115318.

WANG, C. et al. Immediate psychological responses and associated factors during the initial stage of the 2019 coronavirus disease (COVID-19) epidemic among the general population in China. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 17, n. 5, 1729, 2020. DOI: 10.3390/ijerph17051729.

WATANABE, H. et al. A ruptura do gene *kcnq2* da epilepsia resulta em hiperexcitabilidade neural. *Jornal de Neuroquímica*, v. 75, p. 28-33, 2000.

WETHERINGTON, J.; SERRANO, G.; DINGLEDINE, R. Astrocytes in the epileptic brain. *Neuron*, v. 58, n. 2, p. 168-78, 24 abr. 2008.

WHITEFORD, H. A. et al. Global burden of disease attributable to mental and substance use disorders: findings from the Global Burden of Disease Study 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Fact sheet nº999: epilepsy. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/en/index.html>. Acesso em: 02/09/2022.

WU, C. et al. Effects of Exercise Training on Anxious-Depressive-like Behavior in Alzheimer Rat. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, v. 52, n. 7, p. 1456-1469, jul. 2020. DOI: 10.1249/MSS.0000000000002294.

YAMADA, K. et al. Papel protetor de canais de potássio sensíveis a ATP na convulsão generalizada induzida por hipóxia. *Ciência*, v. 292, p. 1543-1546, 2001.

YAN, R. et al. Application value of molecular imaging technology in epilepsy. *Ibrain*, v. 7, n. 3, p. 200-210, sep. 2021. DOI: 10.1002/j.2769-2795.2021.tb00084.x.

YANG, B. et al. Rab35 GTPase positively regulates endocytic recycling of cardiac KATP channels. *Channels (Austin)*, v. 16, n. 1, p. 137-147, dec. 2022. DOI: 10.1080/19336950.2022.2090667.

YANG, F. et al. Roles of astrocytes and microglia in seizure-induced aberrant neurogenesis in the hippocampus of adult rats. *Journal of Neuroscience Research*, v. 88, n. 3, p. 519-529, 15 fev. 2010.

ZHAO, J. et al. Nicorandil exerce efeitos anticonvulsivantes em convulsões induzidas por pentilenotetrazol e convulsões induzidas por eletrochoque máximo, regulando negativamente a excitabilidade em neurônios piramidais do hipocampo. *Neurochemical Research*, v. 48, p. 2701–2713, 2023. DOI: 10.1007/s11064-023-03932-w.

ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA I



Ribeirão Preto, 10 de fevereiro de 2023.

Prezado (a) Pesquisador ARTUR TEIXEIRA PEREIRA

Vimos por meio desta, informar que a proposta intitulada “O ATIVADOR DE CANAIS DE POTÁSSIO PINACIDIL E SEUS POTENCIAIS EFEITOS ANTICONVULSIVANTES E ANSIOLÍTICOS”, registrada sob o nº 005/2022 e sob a responsabilidade do **pesquisador ARTUR TEIXEIRA PEREIRA** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrala (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e foi **aprovado** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA UNAERP, em reunião realizada em 09 de fevereiro de 2023.

Solicitamos que nos encaminhe os relatórios parciais e finais, bem como envie-nos possíveis emendas, notifique qualquer evento adverso sério ocorrido no centro e novas informações sobre a segurança do estudo para que possamos fazer o devido acompanhamento.

Atenciosamente,

Profª Drª Selma Maria Proença Costa
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade de Ribeirão Preto

ANEXO B - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA II



Ribeirão Preto, 08 de dezembro de 2023.

Prezado (a) Pesquisador (a) Prof. Dr. RENÊ DE OLIVEIRA BELEBONI,

Vimos por meio desta, informar que a proposta intitulada "O ATIVADOR DE CANAIS DE POTÁSSIO PINACIDIL E SEUS POTENCIAIS EFEITOS ANTICONVULSIVANTE E ANSIOLÍTICO" registrada sob o nº **0011/2023** e sob a responsabilidade do pesquisador **Prof. Dr. RENÊ DE OLIVEIRA BELEBONI** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA UNAERP, em reunião realizada em 05/12/2023.

Atenciosamente,

Documento assinado digitalmente
gov.br ADRIANA APARECIDA LOPES
Data: 08/12/2023 15:31:41-0300
Verifique em <https://validar.jc.gov.br>

Profª Drª Adriana A. Lopes
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade de Ribeirão Preto

Finalidade: <input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa
Vigência da Autorização: a partir de ___/___/___
Espécie / Linhagem / Raça: _____
Peso/Idade: _____
Nº de Animais: _____
Sexo: _____
Origem: _____