



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR

DANIELLE SANTANA COELHO

**AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DA DULOXETINA EM MODELO DE CONVULSÃO:
ANÁLISE COMPORTAMENTAL, ELETROENCEFALOGRÁFICA E INFLUÊNCIA NO
ESTRESSE OXIDATIVO.**

BELÉM

2014

DANIELLE SANTANA COELHO

**AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DA DULOXETINA EM MODELO DE CONVULSÃO:
ANÁLISE COMPORTAMENTAL, ELETROENCEFALOGRÁFICA E INFLUÊNCIA NO
ESTRESSE OXIDATIVO.**

**Defesa de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Neurociências e Biologia Celular,
Universidade Federal do Pará – UFPA.**

**Orientador (a): Prof^a Dra María Elena Crespo
López.**

BELÉM

2014

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

Coelho, Danielle Santana, 1987-

Avaliação pré-clínica da duloxetina em modelo de convulsão: análise comportamental, eletroencefalográfica e influência no estresse oxidativo / Danielle Santana Coelho. - 2014.

Orientador: María Elena Crespo López.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2014.

1. Epilepsia. 2. Antidepressivos. 3. Stress oxidativo. I. Título.

CDD 22. ed. 616.853

DANIELLE SANTANA COELHO

AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DA DULOXETINA EM MODELO DE CONVULSÃO:
ANÁLISE COMPORTAMENTAL, ELETROENCEFALOGRÁFICA E INFLUÊNCIA NO
ESTRESSE OXIDATIVO.

Defesa de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e
Biologia Celular, Universidade Federal do Pará – UFPA.

Aprovado em / /

Banca:

Prof^a. Dra. María Elena Crespo López (Orientadora)

Prof^a. Dra. Barbarella Matos Macchi

Prof^a. Dra. Vanessa Jóia de Mello

Prof. Dr. Luiz Fernando Freire Royes

RESUMO

O transtorno epiléptico apresenta alta prevalência e severidade. Além da gravidade da epilepsia *per se*, este distúrbio pode ser acompanhado de várias comorbidades, sendo a depressão a principal comorbidade psiquiátrica. Os mecanismos envolvidos na relação epilepsia/depressão ainda não estão bem esclarecidos, e sabe-se que o tratamento de ambos os distúrbios pode ser problemático, já que alguns anticonvulsivantes podem causar ou aumentar sintomas depressivos, enquanto alguns antidepressivos parecem aumentar a susceptibilidade a convulsões. Por outro lado, estudos têm demonstrado que alguns antidepressivos, além de seguros, também possuem atividade anticonvulsivante como a venlafaxina, um inibidor da recaptação de serotonina e noradrenalina (IRSN). Considerando que a duloxetina, outro IRSN, apresenta uma inibição mais potente sobre transportados monoaminérgicos e que não existe nada na literatura a respeito de sua influência sobre convulsões apesar de que está sendo aplicado atualmente na clínica, o objetivo do nosso estudo é verificar o possível efeito anticonvulsivante da duloxetina através do modelo de convulsões induzidas pelo pentilenotetrazol (PTZ) em camundongos. Para tal, camundongos foram pré-tratados com duloxetina (10, 20, 40 mg/kg/i.p.) e trinta minutos após receberam uma injeção intraperitoneal de PTZ (60 mg/kg). Por vinte minutos os animais foram monitorados para a avaliação dos tempos de latência para o primeiro espasmo mioclônico e a primeira crise tônico-clônica, como também o tempo de duração das convulsões e de sobrevivência. A análise eletroencefalográfica foi utilizada para avaliar a severidade das crises (aumento da amplitude das ondas). Após esse período os animais foram sacrificados, o córtex cerebral dissecado e análises bioquímicas (atividade da superóxido desmutase (SOD), catalase (CAT), níveis de nitritos e peroxidação lipídica) foram feitas para investigação dos mecanismos pelos quais a droga influencia as convulsões. Os resultados preliminares demonstraram que a duloxetina apresenta atividade anticonvulsivante, sendo capaz de aumentar significativamente o tempo de latência tanto para o primeiro espasmo clônico, como para a primeira convulsão tônico-clônica induzidas pelo pentilenotetrazol. Ainda a avaliação eletroencefalográfica demonstrou que a duloxetina na dose de 20 mg/kg diminuiu significativamente a amplitude das ondas enquanto a dose de 40 mg/kg

aumentou significativamente a amplitude em comparação a todos os tratamentos. Quanto à avaliação da influência no estresse oxidativo, animais tratados apenas com PTZ apresentaram um aumento significativo do nível de peroxidação lipídica, e diminuição da atividade da SOD e da CAT. Quanto ao nível de nitritos não houve nenhuma alteração significativa entre os tratamentos. A duloxetina na dose de 20 mg/kg se mostrou efetiva para evitar as alterações induzidas pelo PTZ nos parâmetros de estresse oxidativo avaliados. A atividade anticonvulsivante da duloxetina (20 mg/kg) colabora com a teoria que tem sido apresentada nos últimos anos de que a modulação da neurotransmissão serotoninérgica e noradrenérgica pode ter efeito anticonvulsivante. Ainda, a capacidade da duloxetina de inibir a exacerbação do estresse oxidativo envolvido nas convulsões induzidas pelo PTZ corrobora com estudos que demonstram que algumas substâncias anticonvulsivantes podem modular as convulsões pelo menos em parte por sua atividade antioxidante. Portanto concluímos que a duloxetina é um adjuvante promissor para o tratamento de pacientes que apresentam a comorbidade epilepsia e depressão.

Palavra-chave: Epilepsia; antidepressivos; estresse oxidativo; duloxetina.

ABSTRACT

Epilepsy is a disorder with high prevalence and severity. Although there are several anticonvulsant drugs available in the market, 30 to 40% of the patients are refractory to the treatment. Besides the seriousness of epilepsy *per se*, this disorder may be accompanied by many comorbidities such as depression, which is the main psychiatric comorbidity of epilepsy. The mechanisms involved in the relationship between epilepsy and depression are not clarified. Given that some anticonvulsant drugs can trigger or enhance depressive symptoms, while some antidepressant drugs can potentiate the severity of seizure, the concomitant treatments of both disorders can be problematic. On the other hand, some studies have shown that antidepressant drugs can be safe and even possess an anticonvulsant activity such as venlafaxine, a serotonin and noradrenaline reuptake inhibitor (SNRI). Considering that duloxetine, another SNRI, has a more potent inhibition of monoaminergic transporters and that there is no study about its influence on seizures, the aim of our study is to verify the potential anticonvulsant action of duloxetine against seizures induced by pentylenetetrazole (PTZ) on mice. With this aim, mice will be pre-treated with duloxetine (10, 20, 40 mg/kg/i.p.), and thirty minutes after, the animals will receive an intraperitoneal injection of PTZ (60 mg/kg, i.p.). In the following twenty minutes the animals are going to be evaluated. The threshold for the first myoclonic jerk, tonic-clonic seizure, the duration of seizures and survival will be quantified. The electroencephalographic analysis (EEG) was used to assess the severity of the seizures (wave's amplitude increase). After this period the animals will be sacrificed, the cerebral cortex dissected and biochemical analysis (activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), nitrite levels and lipid peroxidation) will be made to investigate the mechanisms by which this drug can influence seizures. The results exhibit the anticonvulsant action of duloxetine. The drug was capable of enhancing the threshold for the first myoclonic and tonic-clonic seizures induced by PTZ. Additionally, the EEG demonstrated that duloxetine at the dose of 20 mg/kg decreased significantly the amplitude of the waves while at the dose of 40 mg/kg it increased the amplitude when compared to all the treatments. Regarding the

evaluation of duloxetine's influence on oxidative stress, all the animals treated solely with PTZ presented a significant increase on lipid peroxidation and a decrease on SOD and CAT activity. Concerning nitrites' level, there was no difference between the treatments. The dose of 20 mg/kg of duloxetine showed a significant protection against the alterations in oxidative stress induced by PTZ. The anticonvulsant action of duloxetine (20 mg/kg) collaborates with the theory which has been presented in the last few years where it is proposed that the modulation of the serotonergic and noradrenergic neurotransmission may exert an anticonvulsant activity. Moreover, the efficiency of duloxetine in preventing the aggravation of oxidative stress involved in the seizures induced by PTZ corroborates with studies that demonstrate that anticonvulsant substances can influence seizures through its antioxidant activity. Given these points, we conclude that duloxetine is a promising adjuvant for the treatment of patients with the comorbidity epilepsy and depression.

Key-Word: Epilepsy; antidepressive drugs; oxidative stress; duloxetine.

LISTA DE ABREVIATURAS

AGPI	Ácido graxo poliinsaturado
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
CAT	Catalase
CEPAE	Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DUL	Duloxetina
EEG	Eletroencefalograma
EROS	Espécies reativas de oxigênio
ERNS	Espécies reativas de nitrogênio
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
FDA	Food Drug Administration
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GSH	Glutathiona reduzida
GSSG	Glutathiona oxidada
GPx	Glutathiona peroxidase
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
ILAE	Liga internacional contra a epilepsia
IMAO	Inibidores da monoamino oxidase
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
ISR	Inibidores específicos da recaptação
ISRS	Inibidores específicos da recaptação de serotonina
ISRN	Inibidores específicos da recaptação de noradrenalina
IRSN	Inibidores da recaptação de serotonina e noradrenalina

L1	Latência para o primeiro espasmo mioclônico
L2	Latência para aparecimento da primeira crise tônico-clônica
LOOH	Hidroperóxido lipídico
L-NAME	L-nitro-arginina metil Ester
MAO	Monoamino oxidase
MDA	Malonaldeído
NE	Noradrenalina
NO [•]	Óxido Nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NMFI	N-metil-2-fenilindol
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
O ₂ ^{•-}	Radical superóxido
OH [•]	Radical hidroxila
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PTZ	Pentilenotetrazol
RL	Radical livre
ROO [•]	Radical peroxil
SOD	Superóxido desmutase
TCA	Antidepressivos tricíclicos
5-HT	Serotonina

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Potencialização da formação de espécies reativas decorrente de convulsões, defesas antioxidantes enzimáticas e danos causados pelo estresse oxidativo.....	p.4
Figura 2. Locais de ação dos antidepressivos.....	p.12
Figura 3. Estrutura química da duloxetina.....	p.15
Figura 4. Fórmula de extrapolação de dose baseada na superfície corpórea.....	p.16
Figura 5. Desenho experimental.....	p.20
Figura 6. Localização dos eletrodos.....	p.21
Figura 7: Efeito da duloxetina na latência para o primeiro espasmo clônico (L1) e para a primeira convulsão tônico-clônica (L2).....	p.25
Figura 8. Efeito da duloxetina na duração das convulsões (tempo total em convulsão).....	p.26
Figura 9. Influência da duloxetina no aumento da amplitude das ondas encefalográficas decorrentes da administração do pentilenotetrazol.....	p.27
Figura 10: Efeito da duloxetina nos níveis de peroxidação lipídica do córtex cerebral de camundongos tratados com pentilenotetrazol.....	p.28
Figura 11: Efeito do pentilenotetrazol e/ou da duloxetina no nível nitritos do córtex cerebral.....	p.29
Figura 12. Efeito da duloxetina na diminuição da atividade da catalase induzida pelo pentilenotetrazol no córtex cerebral.....	p.30
Figura 13. Efeito da duloxetina na diminuição da atividade da superóxido desmutase induzida pelo pentilenotetrazol no córtex cerebral.....	p.31

Tabela 1. Antidepressivos com ação anticonvulsivante.....	p.13
Tabela 2. Farmacocinética da Duloxetina.....	p.16
Tabela 3. Valores do fator Km baseados nas diretrizes do FDA.....	p.19

SUMÁRIO

1.0.	INTRODUÇÃO.....	1
1.1.	Epilepsia.....	1
1.2.	Fisiopatologia da epilepsia.....	2
1.2.1.	Estresse oxidativo e epilepsia.....	2
1.3.	Epilepsia e depressão.....	7
1.3.1.	Antidepressivos na epilepsia.....	10
1.4.	Duloxetina.....	14
2.0.	OBJETIVOS.....	16
2.1.	Objetivo geral.....	16
2.2.	Objetivos específicos.....	16
3.0.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
3.1.	Animais experimentais.....	17
3.2.	Modelo de convulsão induzida pelo pentilenotetrazol e pré-tratamento com duloxetina.....	17
3.3.	Procedimento cirúrgico e estudo eletroencefalográfico.....	20
3.4.	Processamento do tecido.....	20
3.5.	Determinação da peroxidação lipídica.....	21
3.6.	Determinação dos níveis de nitritos.....	21

3.7.	Atividade da catalase (CAT).....	
3.8.	Atividade da superóxido desmutase (SOD)	22
3.9.	Determinação da proteínas.....	23
3.10.	Análise estatística.....	23
4.0.	RESULTADOS	24
4.1.	Análise comportamental da influência da duloxetina no modelo de convulsões induzidas pelo pentilenotetrazol.....	24
4.1.1.	A duloxetina é capaz de aumentar a latência para as convulsões.....	24
4.1.2.	Dose elevada de duloxetina aumenta o tempo total em convulsão.....	25
4.2.	Efeito bifásico da duloxetina na amplitude das ondas encefalográficas decorrentes da administração do pentilenotetrazol.....	25
4.3.	Influência da duloxetina no estresse oxidativo registrado no modelo de convulsões induzidas pelo pentilenotetrazol.....	27
4.3.1.	Dose terapêutica de duloxetina é capaz de prevenir totalmente a peroxidação lipídica provocada pelas convulsões.....	27
4.3.2.	Dose terapêutica de duloxetina e/ou PTZ (60 mg/Kg) não alteram os níveis de nitritos.....	28
4.3.3.	Dose terapêutica de duloxetina é capaz de prevenir totalmente a diminuição da atividade da catalase provocada pelas convulsões.....	28
4.3.4.	Dose terapêutica de duloxetina é capaz de prevenir totalmente a diminuição da atividade da superóxido desmutase (SOD) provocada pelas convulsões	29

5.0	DISCUSSÃO.....	30
6.0	REFERÊNCIAS.....	41

1.0. INTRODUÇÃO

1.1. Epilepsia

Segundo a Liga Internacional Contra a Epilepsia (ILAE), a epilepsia é uma “*desordem do cérebro caracterizada por uma persistente predisposição para gerar ataques epiléticos*”, sendo uma condição que apresenta consequências cognitivas, fisiológicas e sociais (FISHER *et al*, 2005).

A epilepsia é um transtorno neurológico crônico constituído por descargas espontâneas, sincrônicas e repetitivas de certa população neuronal podendo ser de causa genética, estrutural/metabólica ou idiopática (MCNAMARA, 1999; BERG & SCHEFFER, 2011). A epilepsia é genética quando causada por mutações em canais iônicos ou outros. A epilepsia é estrutural ou metabólica quando existe outra doença ou distúrbio no paciente que tenha sido associado ao risco de desenvolvimento de epilepsia. E por fim, a epilepsia idiopática é de origem indefinida por não apresentar nenhuma anormalidade conhecida na estrutura ou função cerebral (MCNAMARA, 1999; BERG & SCHEFFER, 2011).

Além disso, a epilepsia pode ser classificada conforme o tipo de crise apresentada pelo paciente. É primariamente dividida em crises parciais, originadas em um dos hemisférios cerebrais, ou generalizadas, sem um foco definido, com disparos anormais em todas as regiões cerebrais (BERG & SCHEFFER, 2011).

As manifestações comportamentais decorrentes das crises epiléticas são determinadas de acordo com a área cerebral em que ocorrem os disparos neuronais anormais. Por exemplo, a hiperexcitabilidade em certas regiões do córtex visual podem causar alucinações visuais nos pacientes (MCNAMARA, 1999).

1.2. Fisiopatologia da epilepsia

Os mecanismos envolvidos na gênese da epilepsia podem estar relacionados com condutância iônica anormal ou outras alterações na membrana neuronal. Ainda, o desequilíbrio entre a neurotransmissão excitatória e inibitória desencadeia convulsões através da exacerbação da atividade de neurotransmissores excitatórios como o glutamato, ou da inibição da atividade de neurotransmissores inibitórios como o ácido gama-aminobutírico (GABA) (BAGDY *et al*, 2007).

A potencialização da neurotransmissão excitatória pode aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio e radicais livres. Danos causados pelo estresse oxidativo podem ser responsáveis pelo desencadeamento ou agravamento das convulsões (OLIVEIRA *et al*, 2004). Estudos têm demonstrado que o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio é uma das consequências das convulsões, como também, pode agir contribuindo para o desencadeamento das mesmas (KANEKO *et al*, 2002).

1.2.1. Estresse oxidativo e epilepsia

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre produção de radicais livres (espécies químicas que contém um ou mais elétrons não pareados nos orbitais externos, se tornando altamente reativas) e a defesa antioxidante do organismo (STOKER & KEANEY, 2004). Entre os radicais livres mais importantes destacam-se as espécies reativas de oxigênio (EROs) e as espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (ILHAN *et al*, 2005). As principais EROs são o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^{\cdot}) (BORRELI *et al* 2014), e as principais ERNs são o óxido nítrico (NO^{\cdot}) e o peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$) (APRIOKU, 2013).

Os radicais livres podem participar de funções fisiológicas como fagocitose, desintoxicação do fígado e processos de sinalização celular. Porém, quando em concentrações muito altas podem provocar o desenvolvimento do estresse oxidativo, interagindo e modificando macromoléculas, principalmente proteínas, DNA e lipídios (APRIOKU, 2013). Quando existe agressão aos lipídios acontece o processo da

peroxidação lipídica, constituída por uma cascata de eventos bioquímicos consequentes da interação entre radicais livres e lipídios insaturados das membranas celulares (HIGDON *et al*, 2012).

A peroxidação lipídica é um processo em cadeia auto-propagado que inicia na reação de uma espécie reativa com um ácido graxo poliinsaturado (AGPI), onde há produção de um hidroperóxido lipídico (LOOH) como produto primário. O AGPI ao reagir com a espécie reativa perde um átomo hidrogênio e forma um radical carbono que, após ser estabilizado por um rearranjo molecular, forma um dieno conjugado. Esse dieno pode reagir com o oxigênio formando radical peroxil (ROO[·]), que irá atacar outros lipídeos de membrana propagando a reação (HIGDON *et al*, 2012).

A peroxidação lipídica é capaz de alterar as características e, conseqüentemente, a permeabilidade da membrana, favorecendo o transporte indiscriminado de substâncias através da célula. Essas alterações da membrana podem acarretar em sérios danos como sua ruptura e a morte celular (JOSEPHY, 1997; IMLAY & LINN, 1988).

A formação de espécies reativas pode ser potencializada por insultos causados por agentes estressores como as convulsões (Figura 1). Existe um aumento drástico do fluxo sanguíneo cerebral na fase inicial das convulsões (INGVAR & SIESJO, 1983; MELDRUM & NILSSON, 1976) e este aumento faz com que o oxigênio seja metabolizado em resposta à alta demanda, potencializando a produção de EROs (AGUIAR *et al*, 2012; KANN & KOVACS, 2007).

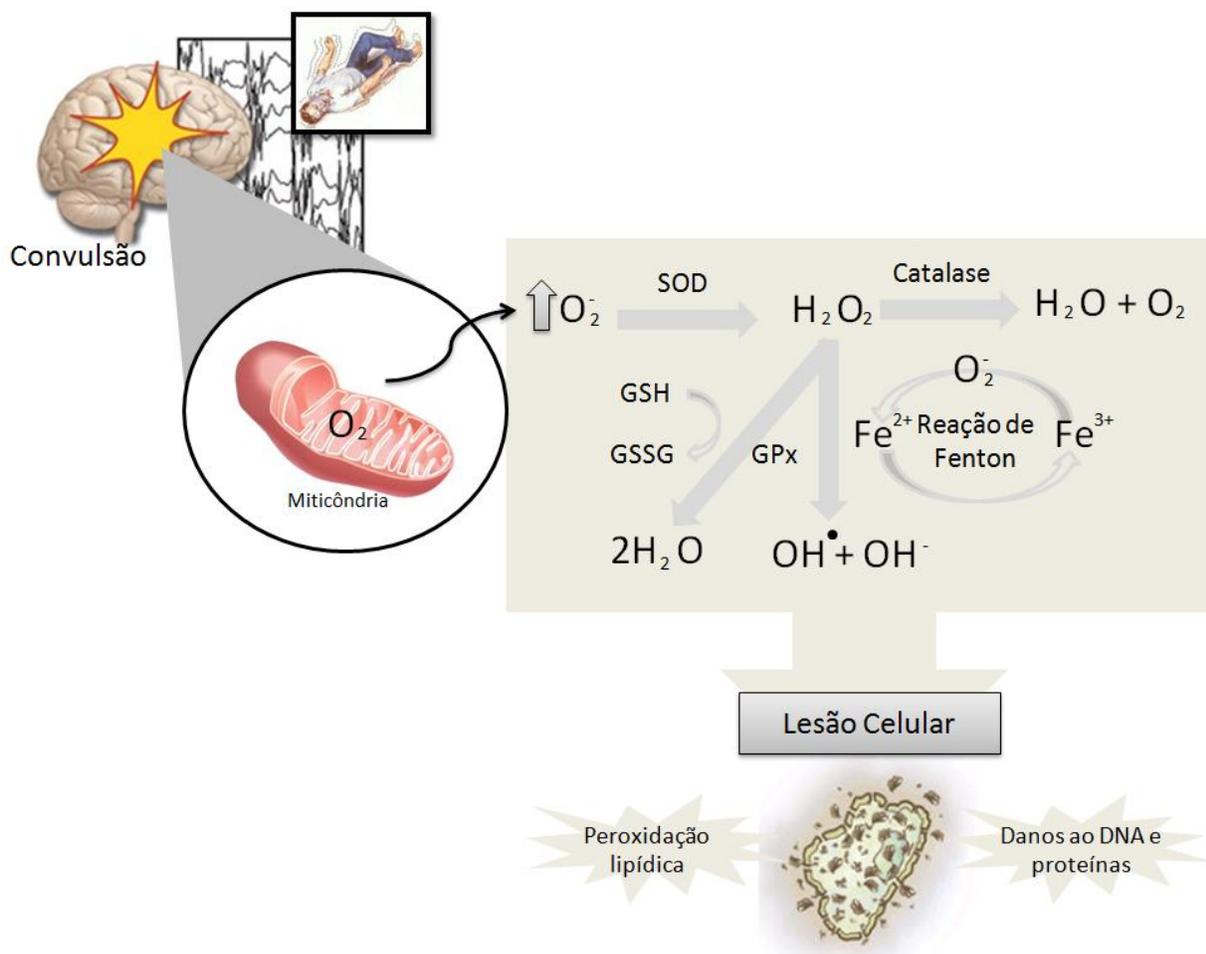


Figura 1. Potencialização da formação de espécies reativas decorrente de convulsões, defesas antioxidantes enzimáticas e danos causados pelo estresse oxidativo. O aumento do metabolismo do oxigênio celular causado pelas convulsões tem como consequência o aumento da produção de espécies reativas. O oxigênio (O_2) é convertido em superóxido (O_2^-) que por sua vez é dismutado em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela superóxido dismutase (SOD). O H_2O_2 pode ser convertido em radical hidroxila (OH^\bullet) pela reação de Fenton, em água (H_2O) e O_2 pela enzima catalase, ou em 2 moléculas de H_2O como produto da oxidação da glutatona reduzida (GSH) em glutatona oxidada (GSSG) feita pela enzima glutatona peroxidase (GPx). Esses radicais livres e espécies reativas vão causar danos às células decorrentes de sua ação em lipídeos de membrana (peroxidação lipídica), DNA e proteínas.

O nível de peroxidação lipídica decorrente da ação das espécies reativas tem sido utilizado como um meio de avaliação do papel do estresse oxidativo na atividade de substâncias anticonvulsivante. Estudos demonstraram em modelos experimentais que após convulsões existe uma elevação no nível de peroxidação lipídica no córtex de roedores (JUNIOR *et al*, 2009). E após a administração de substâncias anticonvulsivantes esse aumento de peroxidação lipídica induzido pela convulsão é prevenido (HUANG *et al*, 2012; GOEL *et al*, 2011; ALDARMAA *et al*, 2010).

Como citado anteriormente, as espécies reativas de nitrogênio também tem um papel importante no estresse oxidativo. Entre essas espécies a que mais se destaca é o óxido nítrico (NO). O NO é formado pelas sintases do óxido nítrico (NOS) a partir do aminoácido L-arginina. Existem três tipos de NOS, endotelial (eNOS), induzida (iNOS) e neuronal (nNOS). O NO possui importantes atividades fisiológicas como a modulação do apetite, temperatura corporal, plasticidade sináptica entre outros (BANACH *et al*, 2011).

O NO reage com o ânion superóxido dando origem ao peroxinitrito, que posteriormente pode se decompor dando origem ao radical hidroxila (OH•) (MEHTA *et al*, 2013). Essa predisposição do NO a formar radicais livres e espécies reativas faz com que ele seja uma fonte de estresse oxidativo. Portanto, ele pode ter um importante papel em desordens como a epilepsia (BANACH *et al*, 2011).

O envolvimento do NO na epilepsia tem sido demonstrado em vários estudos de forma contraditória. Em modelos experimentais a indução de convulsões em roedores causa um aumento da produção de NO em várias áreas do cérebro (SWAMY *et al*, 2012). Ainda, o óxido nítrico modula tanto as convulsões (JELENKOVIC *et al*, 2002) como a ação anticonvulsivante de certas substâncias (RAHMATI *et al*, 2013; SHAFAROODI *et al*, 2012; BOROWICZ *et al*, 1997; LUSZCZKI *et al*, 2007).

Da mesma forma que as EROs e ERNs são produzidas, o organismo possui maneiras de diminuir o dano causado por elas através de mecanismo antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Entre as enzimas antioxidantes as principais são a

superóxido desmutase (SOD), catalase (CAT) e a glutathiona peroxidase (GPx). Entre estas, a SOD e CAT são as mais importantes por formarem as primeiras linhas de defesa antioxidante enzimática do organismo. A superóxido desmutase é uma enzima responsável por dismutar o superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio molecular (O_2). Enquanto a catalase reage com o H_2O_2 formando água (H_2O) e O_2 (BORRELI *et al* 2014). Em certas situações patológicas, como as convulsões, a produção de EROs é muito alta, o que ocasiona por um mecanismo ainda não bem definido uma diminuição da atividade de enzimas antioxidantes (BRANCO *et al*, 2013; RODRIGUES *et al*, 2012).

O envolvimento do estresse oxidativo tanto na epileptogênese quanto como consequência das convulsões tem sido extensamente investigado na última década (NAZIROGLU & YUREKLI, 2013; AGUIAR *et al*, 2012; AZAM *et al*, 2002; SHIN *et al*, 2011). Modelos de indução de convulsão tem demonstrado um aumento da produção de EROs e diminuição da atividade de enzimas antioxidante como consequências das convulsões. A indução de convulsões pelo pentilenotetrazol (PTZ), um antagonista do receptor $GABA_A$ capaz de causar tanto crises tônico-clônicas como mioclônicas, tem demonstrado a propensão de potencializar o estresse oxidativo (BRANCO *et al*, 2013; KUMAR *et al* 2013; RODRIGUES *et al*, 2012).

Estudos demonstraram que há um aumento do nível de peroxidação lipídica e uma diminuição da atividade das enzimas antioxidantes CAT e SOD em decorrência das convulsões induzidas pelo PTZ (CHOWDHURY *et al*, 2013; BRANCO *et al*, 2013; RODRIGUES *et al*, 2012). Quanto ao óxido nítrico, no modelo do PTZ, a administração de L-NAME (inibidor da NOS) em altas doses demonstrou atividade anticonvulsivante (JELENKOVIC *et al*, 2002; KAPUTLU & UZBAY, 1997) e em baixas doses não causou nenhuma influência sobre as convulsões. Enquanto a administração de outro inibidor da enzima produtora de NO, o L-NNA, em doses variadas causou atividade tanto pró-convulsivante quanto anticonvulsivante em roedores (DEL-BEL *et al*, 1997).

A diminuição da atividade das enzimas antioxidantes CAT e SOD, o aumento da produção de NO e do nível de peroxidação lipídica induzidos por convulsões podem ser

revertidos pela administração de substâncias com atividade antioxidante (BRANCO et al, 2013; CHOWDHURY *et al*, 2013) e estudos verificaram que a atividade antioxidante de substâncias não só diminui os danos oxidativos causado pelas convulsões, como também tem ação protetora contra as mesmas. Esta proteção é caracterizada principalmente pelo aumento do tempo de latência para o aparecimento das crises convulsivas, diminuição da severidade e da duração das crises (HOSSEINI & MIRAZI, 2014; KIASALARI et al, 2012; GUPTA & REDDY, 2013).

Portanto, substâncias anticonvulsivantes podem ter sua ação protetora, pelo menos em parte, devido à capacidade de manter a atividade da SOD e da CAT e de diminuir o dano oxidativo a lipídeos de membrana (SOUZA et al, 2009; CHOWDHURY *et al*, 2013; HUANG et al, 2012). Neste contexto, vários antidepressivos tem demonstrado tanto capacidade de modular convulsões como atividade antioxidante (LEE et al, 2013; PAYANDEMEHR et al., 2012 KUMAR & GARG, 2008; DHIR & KULKARNI, 2008).

1.3. EPILEPSIA E DEPRESSÃO

O transtorno epiléptico apresenta alta prevalência e severidade. Existem cerca de 50 milhões de pessoas epiléticas no mundo (WHO, 2012). Cerca de 80% dos casos são encontrados em países em desenvolvimento como o Brasil. Ainda, o risco de morte prematura em pacientes epiléticos é de duas a três vezes maior do que na população geral (MARCHETTI et al, 2005).

Apesar da vasta gama de drogas antiepiléticas disponíveis no mercado, cerca de 30 a 40% dos pacientes são refratários ao tratamento. Além disso, drogas tradicionalmente utilizadas na clínica, como o ácido valpróico, podem causar sérios efeitos adversos como sedação, trombocitopenia, hiperamonemia, intolerância digestiva e também efeito hepatotóxico. Isso faz com que o desenvolvimento de novos fármacos e terapias seja necessário para aumentar a eficácia e a tolerabilidade do tratamento (YACUBIAN, 2002; BETHMANN *et al.*, 2008; DUDEK & STALEY, 2011).

Além da gravidade da epilepsia *per se*, este distúrbio pode ser acompanhado de várias comorbidades. Entre elas, se destacam as comorbidades psiquiátricas por agravarem significativamente a qualidade de vida dos pacientes podendo ocasionar sérias consequências como o suicídio (GILLIAM et al, 2003; RUDZINSKI & MEADOR, 2013). A depressão é uma das principais responsáveis pela má qualidade de vida de pacientes epiléticos, sendo a principal comorbidade psiquiátrica da epilepsia. Um em cada três pacientes epiléticos irá desenvolver sintomas depressivos ao decorrer de sua vida (KANNER *et al*, 2012).

Muitos estudos tem estabelecido uma forte conexão entre depressão e epilepsia, tendo em vista que estas desordens muitas vezes podem ser encontradas em um mesmo paciente. A depressão é o sintoma psiquiátrico mais frequente em pacientes que apresentam o distúrbio epilético, atingindo 20 a 55% dos pacientes com crises recorrentes, e 3 a 9% dos pacientes controlados (KANNER, 2003). Acredita-se que pacientes depressivos tenham uma predisponibilidade de desenvolver crises convulsivas mais severas do que pacientes que não tem distúrbios de humor. Hitiris et al (2007) demonstraram que pacientes que eram depressivos antes do aparecimento da primeira convulsão tem maior probabilidade de desenvolver epilepsia farmacoresistente.

A comorbidade epilepsia/depressão também tem sido observada em modelos experimentais. Estudos realizados com ratos Wistar demonstraram que após a indução de convulsões pela administração de pilocarpina, estes animais desenvolveram comportamento depressivo caracterizado pelo aumento do tempo de imobilidade no teste de nado forçado e pela diminuição do consumo de sacarina (PINEDA et al, 2012; MAZERATI, et al 2009).

A depressão é um dos distúrbios psiquiátricos mais comuns ocorrendo em cerca de 350 milhões de pessoas no mundo (OMS, 2012). As suas principais características são distúrbios de sono, de apetite, fadiga, anedonia, perda de interesse, além de alterações endócrinas, metabólicas e inflamatórias (HANSLER, 2010).

A fisiopatologia da depressão tem sido explicada por várias teorias que apontam déficits de neurotransmissores (serotonina, noradrenalina, dopamina, glutamato e GABA), hormônios (disfunção do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e no ciclo circadiano (HANSLER, 2010). Entre elas a que tem sido considerada a teoria clinicamente relevante por cerca de 30 anos é a teoria monoaminérgica.

A teoria monoaminérgica dita que o déficit na neurotransmissão da serotonina e noradrenalina seria o responsável pelo desenvolvimento da depressão. Essa teoria se estabeleceu após a descoberta de que drogas que aumentam a concentração sináptica das monoaminas são capazes de melhorar os sintomas depressivos (HIRSCHFELD, 2000).

O tratamento com antidepressivos que potencializem a neurotransmissão monoaminérgica é eficaz na maioria dos casos. Porém, o fato de que uma parte dos pacientes demonstra resistência ao tratamento e que o tempo para a ação antidepressiva dessas drogas é consideravelmente longo, levam a crença de que exista alguma desordem primária que cause o déficit monoaminérgico. Logo, o déficit monoaminérgico seria uma consequência de uma causa primária que ainda é desconhecida (HANSLER, 2010).

Os mecanismos envolvidos na relação epilepsia/depressão ainda não estão bem esclarecidos. Sabe-se que o tratamento de ambos os distúrbios pode ser problemático. Isso se dá pelo fato de que alguns anticonvulsivantes podem causar ou aumentar sintomas depressivos, enquanto alguns antidepressivos parecem aumentar a susceptibilidade às convulsões (KANNER & BALABANOV, 2002; AHERN *et al.*, 2006).

A crença de que antidepressivos seriam perigosos para pacientes epiléticos se iniciou com relatos de que drogas antidepressivas, como a imipramina, poderiam causar convulsões em pacientes epiléticos (JOBE & BROWNING, 2005). A disseminação dessa crença na literatura médica fez com que muitos médicos

evitassem, e ainda evitem, o uso de antidepressivos em pacientes epiléticos. (HAMID & KANNER, 2013).

Contudo, estudos posteriores tem demonstrado que o risco de desenvolvimento de crises convulsivas em pacientes epiléticos tratados com antidepressivos tem sido superestimado. Os antidepressivos tem demonstrado atividade pró-convulsivante, em sua maioria, quando administrados em doses acima da faixa terapêutica (CUENCA *et al*, 2004; TAVAKOLI & GLEASON, 2003).

A fim de esclarecer se realmente haveria risco nessa terapia, muitos estudos têm tentado investigar se o tratamento simultâneo dos dois distúrbios seria benéfico ou não aos pacientes (ALBANO *et al*, 2006; VERMOESEN *et al*, 2012). Assim foi verificado, tanto em modelos experimentais como em humanos, que alguns antidepressivos, além de seguros, poderiam vir a ser utilizados como drogas de efeito sinérgico a antiepiléticos, diminuindo a necessidade de altas dosagens de droga para se chegar ao efeito anticonvulsivante (BOROWICZ *et al*, 2011).

1.3.1.ANTIDEPRESSIVOS NA EPILEPSIA

O déficit na neurotransmissão monoaminérgica tem sido apontado como a teoria clinicamente mais relevante para o tratamento da depressão. Assim, drogas que aumentam a eficácia da neurotransmissão das monoaminas têm sido utilizadas por décadas para o tratamento desse distúrbio.

As drogas antidepressivas são capazes de modular a ação das monoaminas por vários mecanismos (Figura 2). As primeiras drogas antidepressivas desenvolvidas, denominadas antidepressivos tricíclicos (TCA), tem a capacidade de modular a neurotransmissão de outros neurotransmissores (histamina, acetilcolina e adrenalina) além da serotonina, noradrenalina e dopamina. Essa falta de especificidade dos TCA é responsável pela vasta gama de efeitos adversos decorrentes do uso desses medicamentos (PATEL *et al*, 2011).

Outra classe de antidepressivos são os inibidores da monoamino oxidase (IMAO). Essas drogas aumentam a quantidade de monoaminas através do bloqueio da

enzima responsável pelo seu metabolismo. O principal efeito adverso do consumo dessas drogas está relacionado à alimentação. Pacientes que usam IMAO devem adotar uma dieta pobre em tiramina (aminoácido precursor das catecolaminas) a fim de evitar o desenvolvimento de uma crise hipertensiva severa (PATEL *et al*, 2011).

Ainda, existem os antidepressivos específicos para inibição da recaptação. Esses antidepressivos podem inibir especificamente os transportadores de serotonina e/ou noradrenalina, por isso são chamados de inibidores específicos da recaptação (ISR). Sendo denominados ISRS quando bloqueiam transportadores de serotonina, ISRN quando bloqueiam transportadores de noradrenalina, e IRSN quando bloqueiam tanto os transportadores de serotonina como os de noradrenalina. Estes antidepressivos causam menos efeitos adversos que seus antecessores já que possuem ação mais específica (PATEL *et al*, 2011).

Por fim, os antidepressivos atípicos podem antagonizar receptores alfa-2-adrenérgicos responsáveis pelo feedback negativo que regula a neurotransmissão noradrenérgica. Portanto, o seu bloqueio aumenta a ação desse neurotransmissor (AN *et al*, 2013). Também, foram desenvolvidos antidepressivos que modulam receptores serotoninérgicos (MIKA *et al*, 2013) .

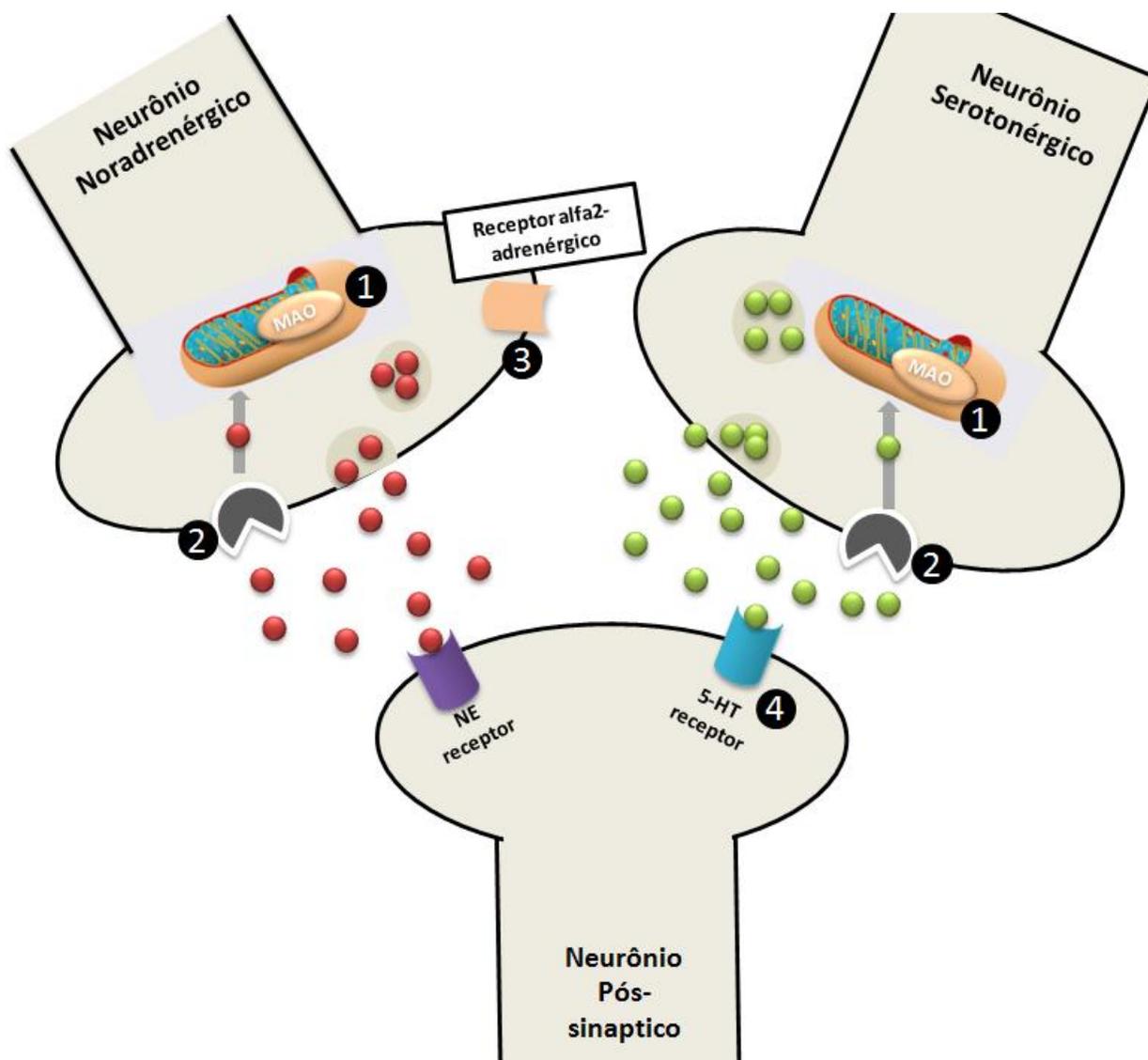


Figura 2. Locais de ação dos antidepressivos. 1. Enzima monoamino oxidase (MAO). 2. Transportador de noradrenalina e/ou serotonina. 3. Receptor alfa2-adrenérgico. 4. Receptores de serotonina.

A potencialização da neurotransmissão monoaminérgica tem demonstrado, além de ação antidepressiva, potencial ação anticonvulsivantes em diversos modelos animais, e em alguns estudos em humanos (Tabela 1). O aumento de serotonina provocado por drogas que inibem a recaptação pode causar um aumento do tempo de

latência e da sobrevida de animais tratados com o agente convulsivante pentilenotetrazol (PTZ) (MAGYAR *et al*, 2003; KECKSKEMETI *et al*, 2005).

Antidepressivo	Classe	Ação	Modelo de convulsão	Referência
Reboxetina	Inibidor da recaptação de NE	Aumento do tempo de latência para convulsões	Eletrochoque máximo	Borowicz et al, 2014
Bupropiona	Inibidor da recaptação de DA e NE.	Aumento do tempo de latência para convulsões	Kainato	Lin et al, 2013.
Sertralina	Inibidor da recaptação de 5-HT	Aumento do tempo de latência para convulsões	4-AP e PTZ	Sitges et al, 2012
Fluoxetina	Inibidor da recaptação de 5-HT	Aumento do tempo de latência para convulsões	PTZ	Borowicz et al, 2012
Paroxetina	Inibidor da recaptação de 5-HT	Aumento do tempo de latência para convulsões	Picrotoxina	Kamal, 2012
Citalopram	Inibidor da recaptação de 5-HT	Aumento do tempo de latência para convulsões	PTZ	Payandemehr et al , 2012
Citalopram e reboxetina	Inibidor da recaptação de 5-HT e inibidor da recaptação de NE	Diminuição da frequência das convulsões	Kainato	Vermoese et al, 2012.
Milnacipram	Inibidor da recaptação de NE e 5-HT	Aumento do tempo de latência para convulsões	Eletrochoque máximo	Borowcz et al, 2010

Tabela 1. Antidepressivos com ação anticonvulsivante. NE: noradrenalina. 5-HT: serotonina. DA: dopamina. 4-AP: 4-aminoperidina. PTZ: pentilenotetrazol.

Não se sabe ao certo como a noradrenalina influencia a gênese das convulsões, mas o dano na principal fonte de noradrenalina (*locus coeruleus*) acelera a indução de convulsões no modelo abrasamento (*kindling*) de amígdala, um modelo crônico de epileptogênese (CORCORAN, 1988; MCINTRYRE, 1980). Além disso, a administração

de drogas que potencializam a neurotransmissão noradrenérgica também foi capaz de amenizar a severidade das crises convulsivas em modelos experimentais (AHERN et al, 2006). Tais drogas demonstraram que, além de possuírem ação anticonvulsivante, também são seguras quando administrados juntamente com anticonvulsivantes clássicos (KAMAL, 2012).

Como discutido acima, o aumento da neurotransmissão serotoninérgica ou da noradrenérgica, individualmente é capaz de inibir tanto sintomas depressivos como convulsões. Sendo assim, parece lógico se hipotetizar que drogas que aumentem simultaneamente esses dois neurotransmissores (serotonina e noradrenalina) poderiam ter ação semelhante. Logo, estudos começaram a ser feitos para avaliar se inibidores da recaptação de serotonina e noradrenalina seriam capazes de exercer tais efeitos benéficos.

A venlafaxina, um IRSN, administrada crônicamente ou agudamente, demonstrou atividade anticonvulsivante. A droga foi capaz de aumentar significativamente o tempo de latência em convulsões induzidas por eletrochoque máximo em camundongos. Ainda, agiu potencializando a ação anticonvulsivante de drogas tradicionalmente utilizadas na clínica como o valproato (Borowicz *et al.*, 2011). A duloxetina, outro IRSN, exibe um bloqueio mais potente desses transportadores, porém ainda não existem estudos relacionados a sua influência em convulsões.

1.4. DULOXETINA

A duloxetina é um potente inibidor específico da recaptação de serotonina e noradrenalina (Figura 3). Inibe de forma fraca a recaptação de dopamina e não apresenta afinidade por receptores histamínicos, dopaminérgicos, colinérgicos ou adrenérgicos (KARPA *et al*, 2002). É indicada para depressão, incontinência urinária e mais recentemente para dor neuropática (WAITEKUS & KIRKPATRICK, 2004).

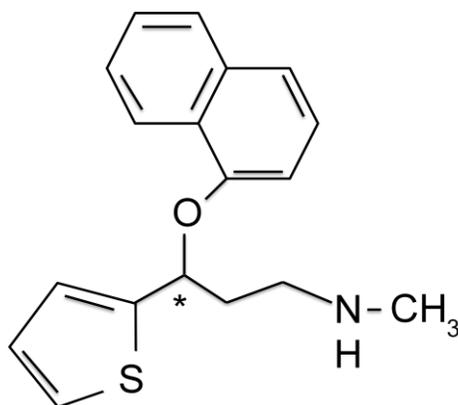


Figura 3. Estrutura química da duloxetina.

Ela é capaz de inibir canais de Na_v1.7 e de K_v3.4 em células renais e células ovarianas, respectivamente (WANG *et al*, 2010; CHOI & HAHN,2012). Ainda, regula negativamente proteínas pró-apoptóticas e aumenta a expressão gênica de neurotrofinas no hipocampo e córtex de camundongos (ENGEL *et al*, 2013). Também foi comprovado que essa droga é capaz de aumentar a quantidade plasmática do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (BALL *et al*, 2013).

A duloxetina é altamente ligada a proteínas plasmáticas, com uma taxa de ligação de 95.9%. Seu tempo de meia vida é alto, de cerca de 12 horas (Tabela 1) . É bem absorvida quando administrada via oral com volume de distribuição de 10-14 L/kg. Seu metabolismo é primariamente hepático envolvendo as enzimas CYP2D6 e CYP1A2. Além disso, é um inibidor moderado da CYP2D6, logo, sua administração concomitante com outras drogas que também inibam a CYP2D6 não é recomendável (PATEL *et al*, 2011).

Parâmetros farmacocinéticos	Média (variação)
C_{max} ($\mu\text{g/L}$)	27.5
T_{max} (hr)	~6 (4–16)
V_d/F (L)	1943 (803-3531)
$t_{1/2}$ (hr)	12 (9.2-19.1)
Biodisponibilidade oral (%)	50 (30-80)
Ligação a Proteínas (%)	> 90
Estado de equilíbrio	3 – 5 dias

Tabela 2. Farmacocinética da duloxetina. C_{max} = Concentração máxima; T_{max} = tempo para atingir a C_{max} . ; V_d/F = Volume de distribuição oral; $t_{1/2}$ = meia vida de eliminação plasmática. Adaptado de Patel et al, 2011.

A dosagem inicial recomendada para o tratamento de depressão é de 60 mg de duloxetina ao dia, que pode ser aumentada até 120 mg ao dia dividido em duas capsulas. A faixa terapêutica para depressão é de 20 a 120 mg ao dia (PATEL *et al*, 2011).

Por ser uma droga relativamente nova, além da propriedade de bloquear transportadores de noradrenalina (NE) e serotonina (5-HT), ainda se sabe pouco sobre o mecanismo de ação da duloxetina. Da mesma forma, pouco foi investigado sobre sua influência em outras patologias, entre elas a epilepsia.

Entretanto, outra droga da mesma classe, a venlafaxina, é capaz de modular convulsões (BOROWICZ *et al.*, 2011). Considerando que a duloxetina é capaz de inibir os transportadores de noradrenalina e serotonina com uma potência significativamente maior que a venlafaxina e que drogas que modulam a neurotransmissão das monoaminas como a duloxetina apresentam atividade anticonvulsivante, faz-se necessário investigar se a duloxetina também é capaz de modular convulsões (DUGAN & FULLER, 2004; PATEL *et al*, 2011).

2.0. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Verificar o possível efeito da duloxetina no modelo agudo de convulsões induzidas pelo pentilenotetrazol (PTZ) em camundongos.

2.2. Objetivos Específicos

Avaliar se doses terapêuticas de duloxetina apresentam efeitos anti e/ou pró-convulsivante no modelo do PTZ (análise eletroencefalográfica e comportamental).

Avaliar a possível influência da duloxetina no estresse oxidativo que acompanha as convulsões induzidas pelo PTZ.

3.0. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais experimentais

Foram utilizados camundongos Swiss machos pesando entre 25 a 35 gramas, divididos em grupos de 6 a 8 animais. Os animais utilizados no estudo são provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Pará. Tais animais são mantidos sob condições controladas de temperatura ($21 \pm 2^\circ \text{C}$) e de iluminação (ciclo claro/escuro de 12 horas), e com livre acesso a água e ração.

Os procedimentos experimentais propostos neste estudo estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação (CEPAE) da UFPA sob o parecer #150-13.

3.2. Modelo de convulsão induzida pelo pentilenotetrazol e pré-tratamento com duloxetina

Diferentes grupos de camundongos ($n=8$) foram tratados intraperitonealmente (i.p) com duloxetina (10, 20, 40 mg/kg) ou solução salina isotônica (0,01 ml/g) trinta minutos antes da administração do pentilenotetrazol (Figura 5). As doses de duloxetina utilizadas nos experimento são baseadas na dosagem utilizada na clínica para o tratamento da depressão (Dedke et al, 2002). A extrapolação alométrica das doses de humanos para animais foi feita com base no método de normalização da área de superfície corpórea descrito por Reagan-Shaw et al (2008), conforme a fórmula abaixo:

$$DH \text{ (mg/kg)} = DA \text{ (mg/kg)} \text{ multiplicado por } K_mH/K_mA$$

Figura 4. Fórmula de extrapolação de dose baseada na superfície corpórea. DH= Dose em humanos; DA= Dose no animal; K_mH = Fator K_m no humano; K_mA = Fator K_m no animal.

O fator K_m para cada espécie é baseado no peso corporal dividido pela área de superfície corpórea. Este fator foi normatizado pela Food Drug Administration (FDA) para auxiliar na extrapolação segura e eficaz de doses entre humanos e animais (Tabela 2). Imediatamente após a injeção do agente convulsivante na dose de 60 mg/kg (Branco *et al*, 2013), os animais foram acomodados em caixas plásticas (30 x 15 cm) para observação por 20 minutos. Neste período foi feita a quantificação da latência para o primeiro espasmo mioclônico (L1), latência para aparecimento da primeira crise tônico-clônica (L2), tempo total em convulsão e sobrevida.

Espécies	Fator K_m
Humano	
Adulto	37
Criança	25
Cachorro	20
Macado	12
Coelho	12
Rato	6
Hamster	5
Camundongo	3

Tabela 3. Valores do fator K_m baseados nas diretrizes do FDA. Fonte: Reagan-Shaw *et al*, 2007.

As convulsões clônicas e tônico-clônicas generalizadas são classificadas de acordo com Ferraro *et al* (1999), onde a crise clônica se caracteriza por episódios de atividade clônica parcial afetando a cabeça, a face, as vibríceas e os membros anteriores. Tais eventos podem ser curtos, durando cerca de 1-2 segundos e podendo ocorrer individualmente ou repetidamente em vários episódios antes da generalização das crises.

Os episódios convulsivos generalizados tônico-clônicos são caracterizados por atividade clônica envolvendo os quatro membros e a cauda, “rearing” (levantar as duas patas dianteiras se apoiando somente nas patas traseiras), “wild running” (correr) e pular, súbita perda de postura e sinais autonômicos (ex: defecação e hipersalivação).

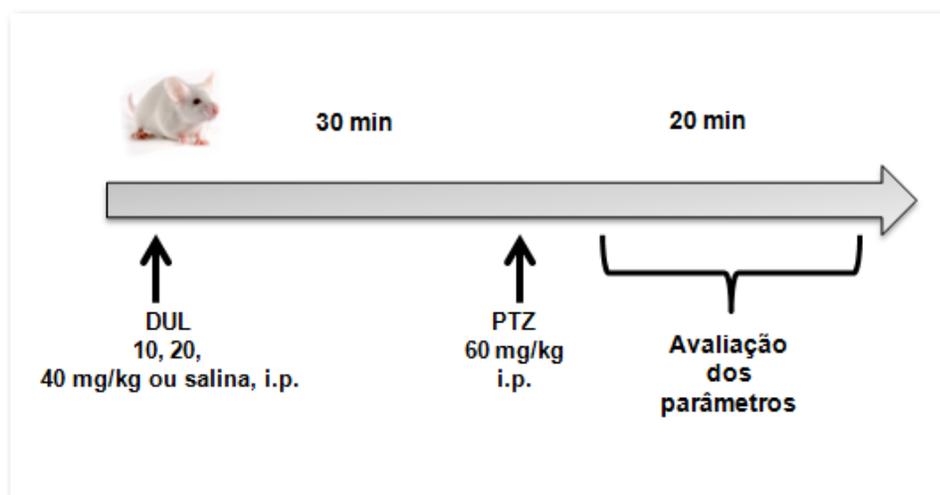


Figura 5. Desenho experimental. DUL – Duloxetina. PTZ – pentilenotetrazol. Parâmetros – Latência para primeiro espasmo clônico, latência para primeira convulsão tônico-clônica, tempo total em convulsão e sobrevivência.

3.3. Procedimento cirúrgico e estudo eletroencefalográfico

Um grupo de animais diferente dos utilizados no comportamento foi anestesiado com quetamina (100 mg/kg, i.p.) e xilazina (30 mg/kg, i.p.) e a implantação dos eletrodos foi feita com auxílio de um aparelho estereotáxico. Foram implantados cinco eletrodos, dois na caixa craniana acima do córtex parietal (um no hemisfério direito e

outro no esquerdo), dois acima do córtex occipital (um no hemisfério direito e outro no esquerdo), e um sob o seio nasal (Figura 6). Os eletrodos foram ligados a um conector com múltiplos pinos e fixados ao crânio do animal com cimento acrílico dentário.

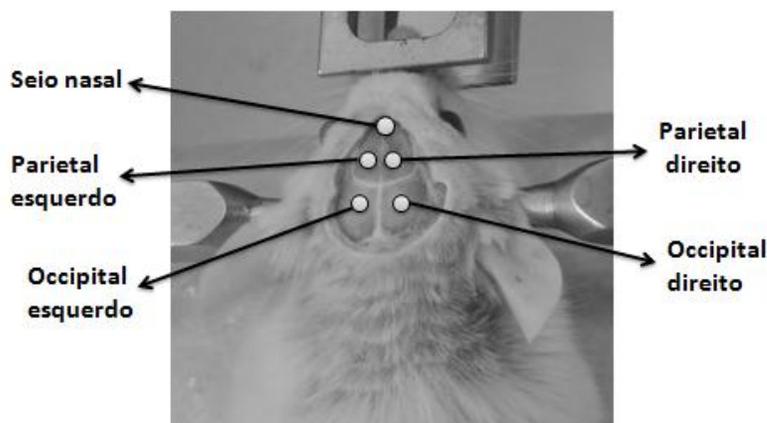


Figura 6. Localização dos eletrodos.

Três dias após o procedimento cirúrgico para a implantação dos eletrodos de registros no córtex, foram feitos os registros eletroencefalográficos. Para a avaliação da atividade eletroencefalográfica os animais foram colocados em uma gaiola de acrílico totalmente transparente que, por sua vez, foi mantida dentro de um sistema aterrado (gaiola de Faraday). O microconector do animal foi então conectado a um plugue ligado, por meio de um cabo flexível e blindado, a um “swivel” (dispositivo rotatório) permitindo ao animal livre movimentação dentro da caixa. A partir do “swivel” os cabos foram ligados ao terminal de um eletroencefalograma digital de marca Neuromap, modelo EQSA 26i. Os registros eletroencefalográficos foram amplificados, filtrados (0.1- 70.0 Hz, band pass), digitalizados e armazenados para análise posterior. A amplitude das ondas foi calculada automaticamente utilizando a função de altura média no software LabChart 7.2.

3.4. Processamento do tecido

Imediatamente após a análise comportamental os animais foram sacrificados por decapitação. O cérebro de cada animal foi removido da caixa craniana e o córtex foi

dissecado rapidamente e homogenizado em 30 mM de tampão Tris-HCL (pH 7.4) gelado. A amostra homogeneizada foi congelada a -80°C .

3.5. Determinação do nível de peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica das amostras foi determinada de acordo com Esterbauer e Cheeseman (1990) pela quantificação do cromóforo produzido pela reação do malonaldeído (MDA) com N-metil-2-fenilindol (NMF1) em presença de ácido metanosulfônico. A quantidade de cromóforo produzido é mensurada por espectrofotometria sendo proporcional à concentração de lipídeos oxidados.

Após descongelamento, as amostras foram centrifugadas a 5600 rpm por 10 minutos a 4°C . O sobrenadante foi separado em alíquotas para determinação dos níveis de peroxidação lipídica e quantificação de proteínas totais. Trezentos e vinte e cinco μL de NMF1 a 10,3 mM diluído em 650 μL metanol, e 75 μL de ácido metanosulfônico foram adicionados 100 μL de soluções padrões de MDA ou das amostras. A mistura foi aquecida a 45°C por 40 minutos. A leitura foi feita no comprimento de onda de 570 nm e os resultados expressos como picomoles de MDA por miligrama de proteína.

3.6. Determinação dos níveis de nitritos

A quantificação dos níveis de nitritos foi feita de acordo com Green et al (1981), onde estes reagem com o reagente de Griess (Naftil-etileno-diamina 0,1% e Sulfanilamida 1% em ácido fosfórico ao 5%, 1:1) formando compostos azóicos. Tais compostos formam uma coloração azulada que é quantificada por espectrofotometria em um comprimento de onda de 550 nm.

As amostras de córtex foram centrifugadas a 14.000 rpm por 10 minutos a 4°C . O sobrenadante foi separado em alíquotas para a posterior determinação dos nitritos.

Foram utilizados 50 μL de sobrenadante da amostra ou solução padrão de nitritos adicionados a 50 μL de reagente de Griess e, posteriormente, incubados por 20 minutos a temperatura ambiente. A leitura feita por espectrofotometria é expressa em micromoles de nitritos por miligrama de proteínas.

3.7. Atividade da catalase (CAT)

A atividade da catalase foi medida pela metodologia de Aebi (1984) baseada na decomposição de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). As amostras homogeneizadas em Tris (item 3.4) foram centrifugada a 16000 G por 30 minutos à 4°C. Após a centrifugação, 100 μL do sobrenadante foi homogenizado em 600 μL de tampão de fosfato de potássio (TFK) a 10mM com pH 7,6 e 50 μL de H_2O_2 . A leitura foi feita no espectrofotômetro com o comprimento de onda de 240 nm. Os resultados foram expressos em unidades de atividade de catalase por miligrama de proteína (U/mg de proteína). Uma unidade de atividade da enzima é definida como 1 μmol de peróxido de hidrogênio consumido por minuto.

3.8. Atividade da superóxido desmutase (SOD)

A atividade da SOD foi medida de acordo com Misra e Fridovich (1972). A técnica é baseada na capacidade da superóxido desmutase inibir a autooxidação da epinefrina. A reação enzimática foi iniciada pela adição da amostra (10,20 e 30 μL) previamente homogeneizada em Tris (item 3.4) em meio de tampão Carbonato de Sódio (0,05M) em pH de 10.2 e 17 μL de epinefrina à 33°C. A oxidação da epinefrina leva a formação do adenocromo, um produto colorido, que é detectado pelo espectrofotômetro. Uma unidade de SOD (U SOD) é definida como a quantidade de enzima que inibe em 50% da formação do adenocromo. A leitura foi feita no espectrofotômetro em um comprimento de onda de 480 nm. Os resultados são expressos em U SOD/mg de proteína.

3.9. Determinação da Proteína

A quantidade de proteína foi determinada nas amostras através do método colorimétrico de Bradford (1976) usando concentrações conhecidas de albumina sérica bovina (BSA) para a construção da curva-padrão.

3.13. Análise estatística

A análise de dados e avaliação estatística foi realizada através do software GraphPad Prisma 5. Foi testada a normalidade de cada grupo pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Caso o $p < 0,05$ foi feita a análise com o teste de variância ANOVA de uma via ou duas vias de acordo com o desenho experimental seguido do *post hoc* de Bonferroni.

Caso o $p > 0,05$ foi aplicado o teste Krustal-Wallis e *post hoc* de Dunn.

Foram considerados os valores de $P < 0,05$ como estatisticamente significativos. Os dados dos grupos experimentais foram expressos como média \pm erro padrão da média.

4.0. RESULTADOS

4.1. Análise comportamental da influência da duloxetina no modelo de convulsões induzidas pelo pentilenotetrazol.

4.1.1. A duloxetina é capaz de aumentar a latência para as convulsões.

Todas as doses testadas de duloxetina foram capazes de aumentar significativamente o tempo para o aparecimento do primeiro espasmo mioclônico (Figura 7), sendo a dose de 20 mg/Kg a mais eficaz. Interessantemente, a dose de 20 mg/kg de duloxetina também aumentou de forma significativa a latência para a primeira crise tônico-clônica (Figura 7).

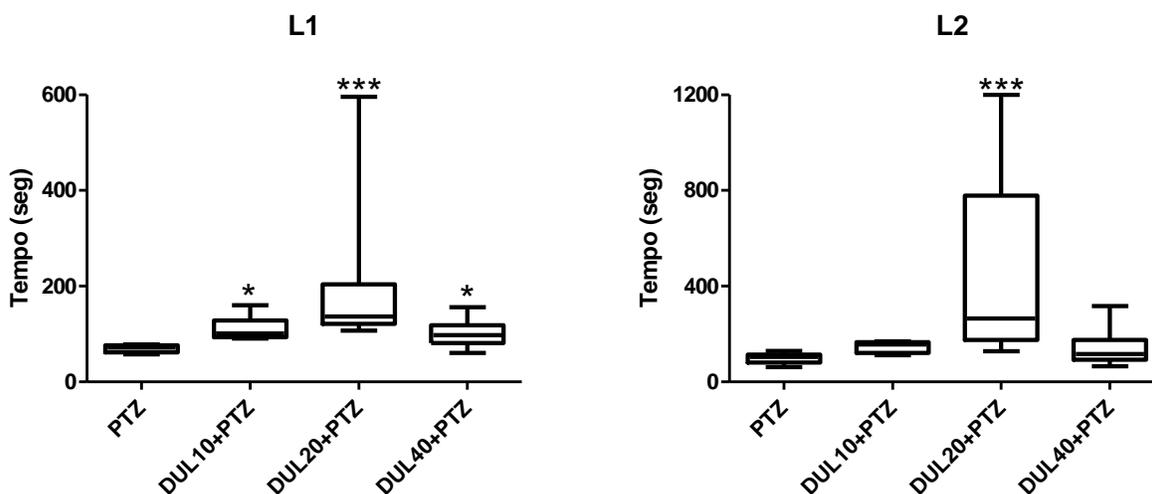


Figura 7: Efeito da duloxetina na latência para o primeiro espasmo clônico (L1) e para a primeira convulsão tônico-clônica (L2). Animais tratados com 60 mg/kg de pentilenotetrazol receberam um pré-tratamento com solução salina, 10, 20 ou 40 mg/kg de duloxetina (PTZ, DUL10+PTZ, DUL20+PTZ e DUL40+PTZ, respectivamente). Dados analisados com o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo *post hoc* de Dunn e apresentados como mediana e intervalo interquartil (n=8-12). * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ vs PTZ.

4.1.2. Dose elevada de duloxetina aumenta o tempo total em convulsão

Entretanto, unicamente a dose de 40 mg/kg prolongou de forma significativa a duração das crises apresentadas pelos animais (Figura 8).

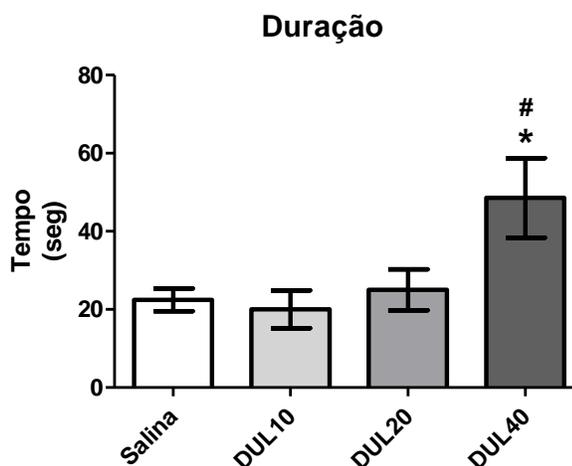


Figura 8. Efeito da duloxetina na duração das convulsões (tempo total em convulsão). Animais tratados com 60 mg/kg de pentilenotetrazol receberam um pré-tratamento com solução salina, 10, 20 ou 40 mg/kg de duloxetina (PTZ, DUL10+PTZ, DUL20+PTZ e DUL40+PTZ, respectivamente). Dados analisados com o teste de ANOVA seguido pelo *post hoc* de Bonferroni e apresentados como mediana e intervalo interquartil (n=8-12). * $p < 0,05$ vs PTZ. # $p < 0,05$ vs DUL10.

Além disso, cabe destacar que tanto o grupo PTZ como o grupo DUL40+PTZ apresentaram uma mortalidade dos animais de 25-28%. Essa mortalidade foi muito mais reduzida (10-13%) nos grupos tratados com as doses mais baixas de duloxetina (10 e 20 mg/Kg).

4.2. Efeito bifásico da duloxetina na amplitude das ondas encefalográficas decorrentes da administração do pentilenotetrazol.

O tratamento somente com solução salina (SAL) ou duloxetina (DUL10, DUL20 e DUL40) não alterou a amplitude das ondas apresentadas no registro eletroencefalográfico (Figura 9). Por outro lado, a administração do pentilenotetrazol (PTZ) aumentou significativamente a amplitude das ondas encefalográficas (Figura 9).

A dose de 20 mg/kg (DUL20) de duloxetina foi capaz de diminuir de forma significativa o aumento da amplitude das ondas consequente da administração do PTZ. Em contrapartida, a dose de 40 mg/kg (DUL40) de duloxetina potencializou a ação do PTZ, apresentando uma amplitude das ondas significativamente maior que todos os demais grupos tratados com o agente convulsivante (Figura 9).

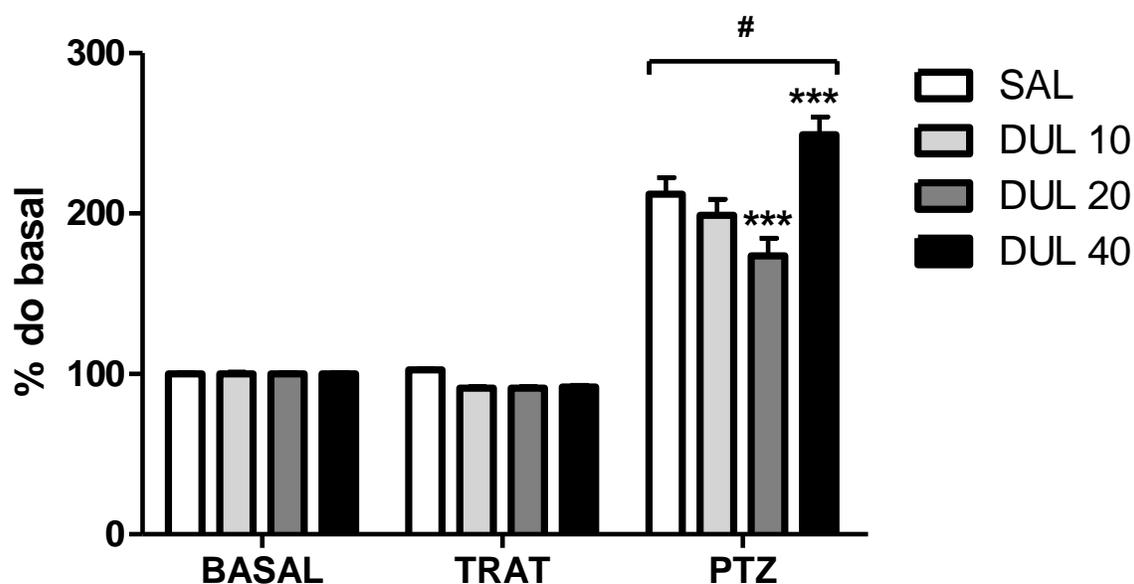


Figura 9. Influência da duloxetina no aumento da amplitude das ondas encefalográficas decorrentes da administração do pentilenotetrazol. Os animais foram tratados com solução salina (SAL) e/ou 60 mg/kg de pentilenotetrazol (PTZ), 10, 20 ou 40 mg/kg de duloxetina (DUL10, DUL20 ou DUL40, respectivamente). Dados analisados com o teste ANOVA de duas vias seguido pelo *post hoc* de Bonferroni e apresentados como % do BASAL. *** < 0,001 vs todos os grupos tratados com PTZ. # < 0,05 vs o registro basal (10 min) e registro durante o tratamento com duloxetina (30 min) de acordo com.

4.3. Influência da duloxetina no estresse oxidativo registrado no modelo de convulsões induzidas pelo pentilenotetrazol.

4.3.1. Dose terapêutica de duloxetina é capaz de prevenir totalmente a peroxidação lipídica provocada pelas convulsões

Nossos resultados demonstram que o tratamento com pentilenotetrazol (PTZ) provocou um incremento significativo dos níveis de peroxidação lipídica no córtex dos animais em relação àqueles que unicamente receberam solução salina (SAL) (Figura 10). O tratamento com duloxetina na dose terapêutica de 20 mg/kg (DUL20+PTZ) foi capaz de prevenir completamente esse aumento de peroxidação lipídica causado pelo PTZ nos camundongos (Figura 10). Entretanto, 40 mg/Kg de duloxetina foram totalmente ineficazes para demonstrar qualquer efeito protetor nos níveis de peroxidação lipídica induzidos pelo PTZ (Figura 10)

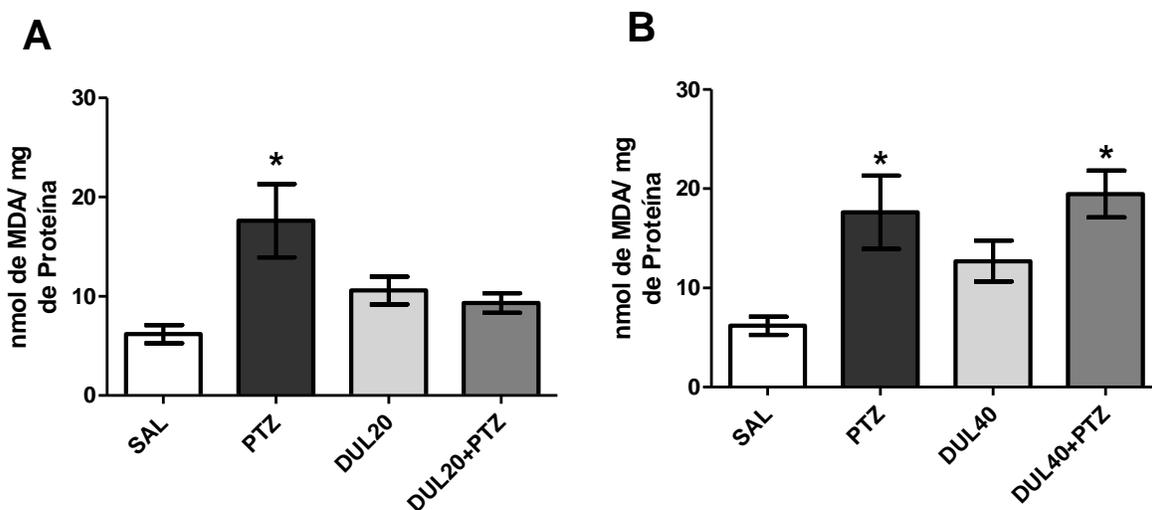


Figura 10: Efeito da duloxetina nos níveis de peroxidação lipídica do córtex cerebral de camundongos tratados com pentilenotetrazol. Os animais foram tratados com solução salina (SAL), pentilenotetrazol (60 mg/kg) e/ou duloxetina (20 mg/kg, DUL20+PTZ (gráfico A); 40 mg/Kg, DUL40+PTZ, (gráfico B). Dados analisado com o teste ANOVA de uma via seguido pelo *post hoc* de Bonferroni e apresentados como média \pm erro padrão da média (n=7-10). * $p < 0,05$ vs todos os grupos não marcados. MDA: Malonaldeído.

4.3.2. Dose terapêutica de duloxetina e/ou PTZ (60 mg/Kg) não alteram os níveis de nitritos

Considerando que na análise da peroxidação lipídica a dose de 20 mg/kg de duloxetina foi capaz de evitar completamente o aumento no nível de peroxidação provocado pelo PTZ, fomos avaliar o possível papel do óxido nítrico nesta modulação da peroxidação lipídica através da análise dos níveis de nitritos.

Entretanto, os níveis de nitritos apresentados no córtex dos animais de todos os grupos não apresentaram nenhuma diferença significativa entre si (Figura 11).

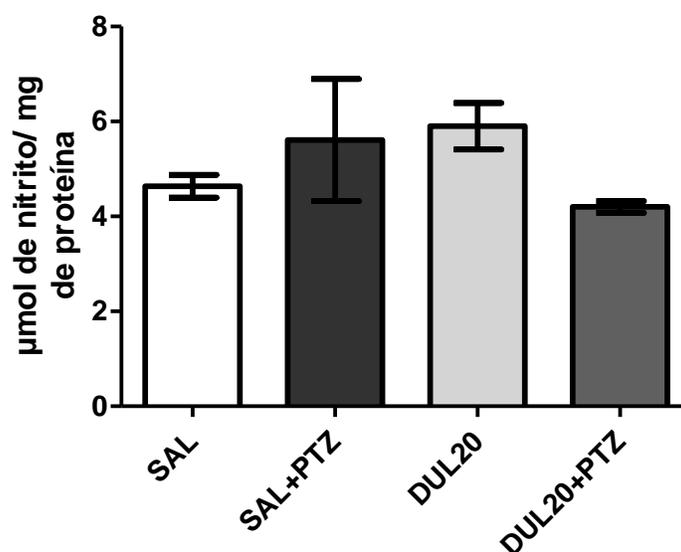


Figura 11: Efeito do pentilenotetrazol e/ou da duloxetina no nível nitritos do córtex cerebral. Os animais foram tratados com solução salina (SAL), pentilenotetrazol (60 mg/kg) e/ou duloxetina (20 mg/kg (DUL20+PTZ). Dados analisado com o teste ANOVA de uma via e apresentados como média \pm erro padrão da média (n=4-7).

4.3.3. Dose terapêutica de duloxetina é capaz de prevenir totalmente a diminuição da atividade da catalase provocada pelas convulsões

A atividade enzimática da catalase no córtex cerebral dos animais tratados com PTZ diminuiu significativamente quando comparada àquela dos tratados somente com salina (SAL) ou duloxetine (DUL20 e DUL40) (Figura 12).

Os tratamentos com duloxetine (DUL20+PTZ e DUL40+PTZ) foram capazes de impedir a diminuição da atividade da catalase provocada pela administração do PTZ (Figura 12, Gráficos A e B).

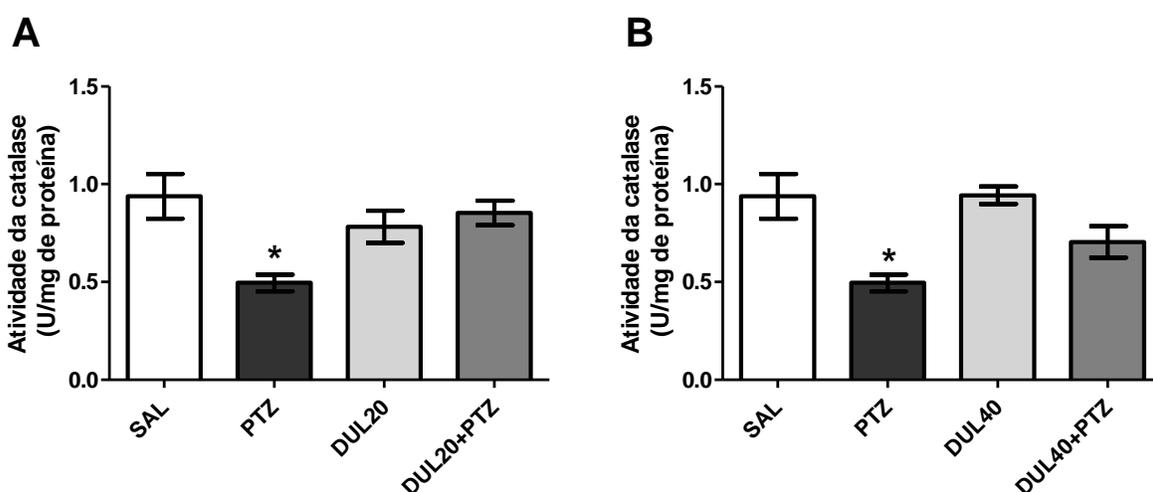


Figura 12. Efeito da duloxetine na diminuição da atividade da catalase induzida pelo pentilenotetrazol no córtex cerebral. Os animais foram tratados com solução salina (SAL), pentilenotetrazol (60 mg/kg) e/ou duloxetine (20 mg/kg, (DUL20+PTZ) (gráfico A); 40 mg/Kg, (DUL40+PTZ), (gráfico B)). Dados analisado com o teste ANOVA de uma via seguido pelo *post hoc* de Bonferroni e apresentados como média \pm erro padrão da média (n=5-8). * $p < 0,05$ vs todos os grupos.

4.3.4. Dose terapêutica de duloxetine é capaz de prevenir totalmente a diminuição da atividade da superóxido desmutase (SOD) provocada pelas convulsões

A atividade da superóxido desmutase no córtex dos animais foi reduzida significativamente pelo tratamento com o pentilenotetrazol (PTZ) quando comparada

aos grupos tratados somente com salina (SAL) ou duloxetina (DUL20 e DUL40) (Fig 13).

A dose de 20 mg/kg de duloxetina (DUL20+PTZ) evitou completamente a diminuição da atividade da superóxido desmutase consequente da administração do PTZ (Figura 13, Gráfico A), enquanto a dose de 40 mg/kg (DUL40+PTZ) não apresentou nenhum efeito protetor significativo (Figura 13, Gráfico B).

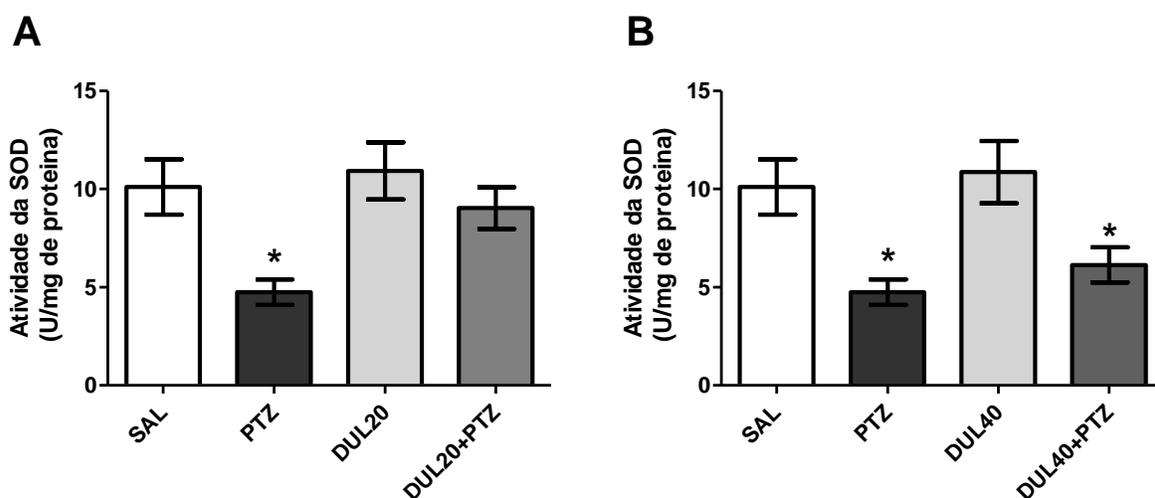


Figura 13. Efeito da duloxetina na diminuição da atividade da superóxido desmutase induzida pelo pentilenotetrazol no córtex cerebral. Os animais foram tratados com solução salina (SAL), pentilenotetrazol (60 mg/kg) e/ou duloxetina 20 mg/kg, DUL20+PTZ) (gráfico A); 40 mg/Kg, DUL40+PTZ, (gráfico B). Dados analisa com o teste ANOVA de uma via seguido pelo *post hoc* de Bonferroni e apresentados como média \pm erro padrão da média (n=4-8). * < 0,05 vs todos os grupos.

5.0. DISCUSSÃO

O nosso estudo demonstra pela primeira vez a atividade anticonvulsivante da duloxetine no modelo agudo de convulsões induzidas pelo pentilenotetrazol (PTZ).

Os resultados do nosso estudo reforçam a hipótese de que a potencialização da neurotransmissão serotoninérgica e noradrenérgica pode ter efeito anticonvulsivante, contribuindo com estudos anteriores onde outros antidepressivos e modelos de indução de convulsões diferentes foram utilizados (SITGES *et al*, 2012; KAMAL 2012; BOROWICZ *et al*, 2012; BOROWICZ *et al*, 2011; BOROWICZ *et al*, 2010; UZBAY *et al*, 2007; AHERN *et al*, 2006).

No nosso trabalho, usamos o modelo de indução de convulsões por injeção intraperitoneal com PTZ que é um antagonista competitivo do receptor GABA_A tradicionalmente utilizado para a triagem de drogas anti-convulsivantes, sendo capaz de identificar drogas efetivas tanto para o tratamento de crises generalizadas tônico-clônicas como também para o tratamento das crises de ausência (HUANG *et al*, 2001). Embora outros modelos, como o de pilocarpina, possam ser mais sensíveis que o modelo agudo do PTZ para avaliar a atividade anti-epileptogênica de substâncias (LOSCHER *et al*, 2013; SCHIMDT & ROGAWSKI, 2002), este modelo apresenta como vantagens o fato de ser um dos poucos facilmente replicáveis e amplamente utilizado para testar a atividade anti ou pró-convulsivante de diversos compostos e capaz de selecionar drogas efetivas para crises epiléticas não convulsivas (crise de ausência) (BRANCO *et al*, 2013; SITGES *et al*, 2012).

Nesse modelo, alguns autores optam por realizar o registro eletroencefalográfico, além da avaliação comportamental, como uma ferramenta útil e objetiva para a verificação de alterações provocadas pela excitabilidade neuronal (SITGES *et al*, 2012; RAMBO *et al*, 2012; SILVA *et al*, 2011). Este ensaio é suficientemente sensível para apontar alterações como potencialização da severidade (caracterizada pelo aumento da frequência e/ou amplitude das ondas) das crises que

muitas vezes não podem ser quantificadas somente com a observação do comportamento (GALANOPOULOU et al, 2013; SITGES et al, 2012), complementando assim, as análises sobre a influência de fármacos nas convulsões, como é o caso do nosso trabalho com a duloxetina.

A duloxetina é um antidepressivo inibidor da recaptação de serotonina e noradrenalina (IRSN). Pouco se sabe sobre seu mecanismo de ação além da modulação da neurotransmissão serotoninérgica e noradrenérgica. A faixa terapêutica de duloxetina usada para o tratamento da depressão em humanos é de 40-120 mg ao dia (KATZUNG, 2014). Assim, na ausência de dados disponíveis, decidimos utilizar em nosso estudo doses de duloxetina que estão dentro (10 e 20 mg/kg no camudongo) e acima (40 mg/kg) dessa faixa da faixa terapêutica, afim de verificar se a dosagem utilizada no tratamento da depressão poderia ser segura também para o tratamento de pacientes que apresentam o distúrbio epiléptico ou que sejam susceptíveis ao desenvolvimento de convulsões.

Em nosso trabalho, a ação da duloxetina nas avaliações comportamentais e eletroencefalográficas demonstrou ser dose-dependente (Figura 7, 8 e 9). Entretanto, essa relação não foi linear. A duloxetina foi capaz de aumentar significativamente o tempo de latência tanto para o primeiro espasmo mioclônico como para a primeira crise tônico-clônica na dose de 20 mg/kg (Figura 7). Contudo, as doses de 10 e 40 mg/kg apresentaram latências semelhantes entre si e significativamente menores que aquelas detectadas com a dose de 20 mg/Kg (Figura 7). De forma semelhante, 20 mg/kg de duloxetina diminuiu a amplitude das ondas durante a convulsão provocada por PTZ e registradas no EEG. Entretanto, 40 mg/kg da mesma droga teve um efeito oposto aumentando significativamente a amplitude das ondas em relação àquela registrada nos animais tratados unicamente com PTZ, demonstrando um efeito pró-convulsivante da duloxetina com essa dose (Figura 9).

Ainda, nenhuma das doses testadas de duloxetina teve efeito significativo sobre a duração total das convulsões exceto a dose de 40 mg/kg que aumentou em 2 vezes o tempo total em convulsão (Figura 8). Também a taxa de mortalidade com essa dose foi

semelhante àquela do grupo PTZ, e aproximadamente o dobro da mortalidade registrada com as doses de 10 e 20 mg/kg.

Esses dados sugerem um efeito bifásico da duloxetina, isto é, uma ação anticonvulsivante da droga com baixas doses que se torna uma ação pró-convulsivante em concentrações mais altas. Efeitos bifásicos foram recentemente descritos para antidepressivos como a mirtazapina ou o citalopram (PAYANDEMEHR *et al*, 2012; KILLIC *et al*, 2011), mas é a primeira vez que é demonstrado um efeito assim para um antidepressivo inibidor da recaptção de serotonina e noradrenalina (IRSN).

A origem desse efeito bifásico ainda não é muito bem conhecida. Receptores serotoninérgicos, por exemplo, tem demonstrado a capacidade de modular convulsões em modelos experimentais. Embora não existam dados disponíveis sobre a duloxetina, estudos recentes sobre o citalopram (inibidor seletivo da recaptção de serotonina, ISRS) demonstraram que a ação anticonvulsivante seria mediada pelo receptor 5-HT₃. No entanto, este mesmo receptor não teria nenhuma participação no efeito pró-convulsivante com doses mais altas da droga (LI *et al*, 2014; PAYANDEMEHR *et al*, 2012; BAHREMAND *et al*, 2011). A ativação do receptor 5-HT₃ é capaz de atenuar a redução do nível do GABA tanto no córtex quanto no hipocampo de animais tratados com PTZ (LI *et al*, 2014), o que poderia estar contribuindo para a atividade anticonvulsivante.

A noradrenalina (NE) também pode exercer atividade anticonvulsivante. A inativação farmacológica aguda dos transportadores de recaptura da NE é capaz de aumentar o tempo de latência e diminuir a severidade das crises em diversos modelos de convulsões (BOROWICZ *et al*, 2011; AHERN *et al*, 2006; TROADEC *et al*, 2001). A indução de uma lesão no *Locus Coeruleus*, a principal fonte de NE do sistema nervoso central, é capaz de transformar convulsões esporádicas em *status epilepticus* e também de acelerar a indução de convulsões no modelo crônico (kindling) de amígdala (GIORGI *et al*, 2006; CORCORAN, 1988). Além disso, a inervação noradrenérgica intacta é necessária para eficácia da estimulação do nervo vago no tratamento de epilepsia refratária a medicamentos (GIORGI *et al*, 2004; KHRAL *et al*, 1998). O papel

da noradrenalina nesse caso pode se dar por sua ativação da neurotransmissão gabaérgica. A ativação das projeções noradrenérgicas para o córtex pela estimulação do nervo vago estimula a neurotransmissão gabaérgica e tem como consequência o aumento da latência para convulsões (PINEDA *et al*, 2013; NAI *et al*, 2009). Assim, o aumento da noradrenalina no córtex provocado pelos IRSNs poderia estar provocando o mesmo efeito de potencialização da neurotransmissão gabaérgica que a estimulação vagal, o que teria como consequência a atividade anticonvulsivante.

A duloxetina também é capaz de inibir canais de Na^+ (WANG *et al*, 2010) e Ca^{2+} em células neuronais (AKPINAR *et al*, 2014) *in vitro*, de fato estes poderiam ser possíveis mecanismos que contribuem para sua ação anticonvulsivante perante o pentilenotetrazol. Canais de Na^+ são essenciais para a propagação do potencial de ação no neurônio, e seu bloqueio pode inibir a neurotransmissão, evitando a descargas excitatória repetitivas características das crises convulsivas (STAFSTROM, 2007). Quanto ao Ca^{2+} intracelular, seu aumento é essencial para a liberação de neurotransmissores pelo neurônio pré-sináptico. A inibição do aumento do Ca^{2+} intracelular pela duloxetina evitaria a liberação de neurotransmissores excitatórios e, conseqüentemente, o desenvolvimento e potencialização de convulsões.

Cabe ressaltar que a hipótese do efeito bifásico, da duloxetina em particular, e dos IRSN em geral, poderia explicar os dados obtidos em pacientes e recentemente publicados, onde a ingestão de grandes doses de duloxetina promoveu o estabelecimento de crises tônico-clônicas (PELLICCIARI *et al*, 2012). Entretanto, o tratamento por 5 meses com doses terapêuticas de venlafaxina (fármaco antidepressivo do mesmo grupo que a duloxetina) diminuiu significativamente o número de crises convulsivas de origem psicogênico (PINTOR *et al*, 2010)

Um aspecto importante a considerar é que, no nosso estudo, a ação anticonvulsivante da duloxetina foi demonstrada com a dose de 20 mg/kg, dose esta que corresponde a cerca de 113,51 mg ao dia no humano adulto (REAGAN-SHAW *et al*, 2007), encontrando-se na faixa terapêutica para o tratamento da depressão (40-120 mg) (KATZUNG, 2014). Assim, nossos dados sugerem que o uso de duloxetina para o

tratamento da depressão em pacientes epiléticos teria o valor adicional de proporcionar uma ação anticonvulsivante extra que ajudaria a reduzir as doses de anticonvulsivantes usados, provocando assim menos efeitos colaterais e possivelmente diminuindo a morbidade e mortalidade por interações medicamentosas da politerapia nessas situações. Estudos adicionais sobre o possível efeito adjuvante da duloxetina na terapia anticonvulsivante estão sendo realizados no nosso laboratório para confirmar essa hipótese, com resultados preliminares promissores (dados não mostrados).

Um dos poucos eventos moleculares que já foi relacionado com o possível efeito anticonvulsivante dos fármacos antidepressivos é a influência no estresse oxidativo (AKPINAR *et al.*, 2014; PAYANDEMEHR *et al.*, 2012). Ainda, nos últimos anos tem sido bastante discutido na comunidade científica o papel do estresse oxidativo tanto no desenvolvimento da epilepsia quanto no quadro de refratariedade ao tratamento medicamentoso (CARDENAS-RODRIGUES *et al.*, 2013; ROWLEY & PATEL, 2013; NAZIROGLU & YUREKLI, 2013; AGUIAR *et al.*, 2012; SHIN *et al.*, 2011;). Diversos modelos experimentais de indução de convulsões têm demonstrado um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, dos danos causados por estas espécies (entre eles, peroxidação lipídica) e diminuição da defesa antioxidante do organismo como consequência das convulsões (AGUIAR *et al.*, 2013; SHIN *et al.*, 2011; HSIEH *et al.*, 2011; JUNIOR *et al.*, 2009). Entretanto, a discussão sobre se o estresse oxidativo seria uma causa ou uma consequência das convulsões permanece, no mínimo, controversa.

No nosso estudo, o PTZ aumentou significativamente o nível de peroxidação lipídica no córtex cerebral (Figura 10). Esses dados vêm confirmar os efeitos descritos recentemente para o cérebro completo no modelo de convulsões induzidas pelo PTZ (PASTORE *et al.*, 2014; CHOWDHURY *et al.*, 2013). Convulsões induzidas pelo pentilenotetrazol são capazes de exacerbar o estresse oxidativo através da produção acentuada de espécies reativas de oxigênio e da diminuição da atividade de enzimas antioxidantes (BRANCO *et al.*, 2013; KUMAR *et al.* 2013; RODRIGUES *et al.*, 2012).

Curiosamente, a proporção de peroxidação lipídica induzida pelo PTZ em relação ao grupo salina no nosso trabalho (285%) foi maior que aquelas recentemente encontradas para a mesma dose dessa droga (198% e 144%) (CHOWDHURY *et al.*, 2013; NAZIROĞLU *et al.*, 2013). Essas diferenças poderiam ser devidas, entre outras possibilidades, a que foi avaliado o cérebro completo dos animais, enquanto no nosso trabalho, isolamos o córtex. Nossos dados sugerem que, embora a peroxidação lipídica possa ser um evento mais ou menos generalizado no SNC após as convulsões (tornando-se assim detectável com técnicas espectrofotométricas simples), o córtex cerebral seria especialmente sensível a esse tipo de dano. Essa hipótese parece ser apoiada por estudo prévio demonstrando que doses repetidas de 60 mg/Kg de PTZ produzem um incremento proporcionalmente maior de peroxidação lipídica no córtex, em comparação com outras áreas do SNC como o hipocampo (RAMOS *et al.*, 2012).

Apesar do elevado aumento de peroxidação lipídica, uma única dose de duloxetina de 20 mg/kg foi capaz de proteger o córtex cerebral dos camundongos, evitando completamente o incremento provocado pelo PTZ (Figura 10). Pelo outro lado, a dose de 40 mg/kg de duloxetina não alterou os níveis de peroxidação lipídica em relação àqueles apresentados pelo grupo PTZ. Estudos adicionais serão necessários para esclarecer se a peroxidação lipídica apresentada por esses dois últimos grupos é um “teto” alcançado ou se doses maiores de duloxetina podem provocar um efeito sinérgico com o PTZ demonstrando-se um efeito bifásico também na peroxidação lipídica.

Embora já existam bastantes trabalhos *in vitro*, com modelos animais e com dados epidemiológicos que descrevem a influência de diferentes antidepressivos no estresse oxidativo (revisado por LEE *et al.*, 2013 e BEHR *et al.*, 2012), a duloxetina é uma grande desconhecida nesse sentido. De fato, só agora no mês de Maio deste ano foi publicado o primeiro trabalho que descreve a influência da duloxetina na peroxidação lipídica (AKPINAR *et al.*, 2014). Os autores demonstraram que a incubação de células PC-12 (linhagem derivada de feocromocitoma de rato) com 10 μ M de duloxetina por 24 horas foi capaz de diminuir os níveis basais de peroxidação

lipídica. O tempo reduzido de exposição no nosso trabalho (50 min) em comparação com aquele, poderia explicar por que não foram detectadas essas diferenças nos nossos resultados.

Entretanto, as conclusões de Akpinar e colaboradores (2014) se vêm relativamente limitadas pelo fato de ser um estudo *in vitro* realizado em linhagem secundária. Assim, nosso estudo é o primeiro a demonstrar *in vivo* a influência da duloxetina na peroxidação lipídica provocada pelas convulsões induzidas pelo PTZ.

Da mesma forma que acontece com a peroxidação lipídica, vários trabalhos descrevem o papel do sistema nitrérgico nas ações de antidepressivos e já foram propostos novos alvos terapêuticos, que atuam neste sistema, para o desenvolvimento de futuros fármacos antidepressivos (revisado por LEE *et al.*, 2013). Interessantemente, o sistema nitrérgico também foi implicado no efeito bifásico do citalopram (um ISRS) nas convulsões induzidas por PTZ, onde o precursor nitrérgico L-arginina exacerbou o efeito pró-convulsivante de doses elevadas do antidepressivo e inibidores da óxido nítrico sintase apresentaram um efeito sinérgico no efeito anticonvulsivante de doses baixas de citalopram (PAYANDEMEHR *et al.*, 2012). Entretanto, no nosso estudo nenhuma alteração nos níveis de nitritos foi detectada com os tratamentos de PTZ e/ou duloxetina em relação aos níveis basais (Figura 11).

Apesar dos dados sobre duloxetina serem extremamente escassos, vários trabalhos com outro antidepressivo do mesmo grupo que a duloxetina, a venlafaxina, apoiam a idéia de que o óxido nítrico possui um papel importante (ABDEL-WAHAB AND SALAMA, 2011; KRASS *et al.*, 2011; GAUR & KUMAR, 2010; KUMAR *et al.*, 2010; KUMAR *et al.*, 2009; KUMAR & GARG, 2008; DHIR & KULKARNI, 2008). Já foi descrito que a venlafaxina sozinha é capaz de diminuir os níveis de nitritos no cérebro de animais (KRASS *et al.*, 2011), entretanto, isso aconteceu com uma dose (6 mg/kg) correspondente a cerca de 34 mg no humano, muito abaixo da faixa terapêutica da droga (75-375 mg). De forma semelhante, o único trabalho que demonstrou que a duloxetina sozinha é capaz de diminuir significativamente os níveis de nitritos, também usou uma dose relativamente baixa (10 mg/kg) via oral administrada 60 minutos antes

da morte dos animais (ZOMKOWSKI *et al.*, 2012), o que determinaria concentrações plasmáticas da droga menores que as que podem ser encontradas no presente trabalho. Assim, os resultados que nós encontramos com a duloxetina estariam mais alinhados com os trabalhos que demonstraram que doses terapêuticas de venlafaxina não afetam os níveis basais de nitritos (ABDEL-WAHAB & SALAMA, 2011; DHIR & KULKARNI, 2008) e que unicamente previnem o aumento de nitritos em resposta a estímulos deletérios como isquemia, depressão, privação do sono, etc. (ABDEL-WAHAB & SALAMA, 2011; GAUR & KUMAR, 2010; KUMAR *et al.*, 2010; KUMAR *et al.*, 2009; KUMAR & GARG, 2008; DHIR & KULKARNI, 2008).

Infelizmente, no nosso trabalho o tratamento com 60 mg/kg de PTZ não foi suficiente para aumentar significativamente os níveis de nitritos (Figure 11). Embora no modelo *kidling* de PTZ (modelo de epileptogênese com administração crônica de PTZ) foi demonstrado o aumento dos níveis de nitritos com essa droga (KUMAR *et al.*, 2013; AKULA *et al.*, 2007; ITOH *et al.*, 2004), é relativamente incomum que nos trabalhos que usam o modelo agudo de PTZ seja verificado se os níveis de nitritos (ou outros marcadores de estresse oxidativo) aumentam em relação ao basal, apresentando-se unicamente a comparação entre o grupo PTZ e os grupos tratados com PTZ e outros fármacos (AGUIAR *et al.*, 2013). Ainda, os poucos estudos, onde foi incluído um grupo basal para comparação, usaram doses de PTZ maiores (80-100 mg/kg) (LOPES *et al.*, 2013; STOJANOVIĆ *et al.*, 2010; BIKJDAOUENE *et al.*, 2004) que a que foi usada no presente trabalho (60 mg/kg), o que poderia explicar a ausência de indução nitrérgica. Esta hipótese é apoiada pelos dados de GUZMÁN e colaboradores (2007) que demonstraram que a inoculação aguda de 40 mg/kg de PTZ não altera os níveis de nitritos no cérebro dos animais.

Considerando que essa hipótese esteja correta, este trabalho seria o primeiro a demonstrar uma ação protetora de um antidepressivo, independente do sistema nitrérgico, no estresse oxidativo.

Se as alterações no sistema nitrérgico não são o principal fator responsável pela proteção antioxidante apresentada pela duloxetina, quais outros fatores poderiam estar

atuando? Um dos principais sistemas de defesa que a célula possui perante o estresse oxidativo é o conjunto de enzimas antioxidantes responsáveis pela detoxificação e processamento dos radicais livres. Dentro desse conjunto, destacam-se a superóxido dismutase (SOD), responsável pela dismutação do radical superóxido (O_2^-), e a catalase, que transforma o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água (H_2O) e oxigênio (O_2). O funcionamento adequado de ambas as enzimas é essencial para manter o equilíbrio entre os eventos pró-oxidantes e os processos antioxidantes dentro da célula. Já foi demonstrado que antidepressivos tricíclicos (como a imipramina) ou ISRS (como a fluoxetina) podem influenciar as atividades enzimáticas da SOD e da CAT, tanto em modelos animais como em pacientes (REUS *et al.*, 2010; HERKEN *et al.*, 2007; KHANZODE *et al.*, 2003; BILICI *et al.*, 2001). Assim, decidimos estudar se esse não poderia ser um possível evento alternativo para explicar a proteção antioxidante da duloxetina.

O PTZ reduziu significativamente as atividades enzimáticas da SOD e da CAT (Figuras 12 e 13). Essa ação do PTZ sobre as atividades enzimáticas é um fato bem conhecido e os estudos mais recentes (CHOWDHURY *et al.*, 2013; BRANCO *et al.*, 2013; RODRIGUES *et al.*, 2012) que usaram a mesma dose (60 mg/Kg) que utilizamos em nosso trabalho, apresentam diminuições dessas atividades enzimáticas com magnitudes semelhantes (aproximadamente de 50% em relação ao grupo salina) àquelas que foram encontradas aqui, validando nosso modelo.

Não existe nenhum dado publicado até hoje sobre a possível alteração das atividades da SOD e/ou da CAT pela duloxetina. Entretanto, olhando para a literatura, pudemos hipotetizar que a duloxetina poderia exercer certa influência sobre essas enzimas, desde que a venlafaxina (também um IRSN) é capaz de prevenir a diminuição das atividades da SOD e da CAT em modelos de isquemia e de comportamentos tipo ansiedade (GAUR & KUMAR, 2010; KUMAR *et al.*, 2010; ZAFIR *et al.*, 2009).

Assim, o presente estudo demonstra pela primeira vez que uma dose terapêutica de duloxetina (20 mg/kg) é capaz de prevenir totalmente a diminuição das atividades enzimáticas da SOD e da CAT no modelo agudo de convulsões induzidas

pelo PTZ. Esse efeito da duloxetina sobre a SOD e a CAT seria um fator importante, responsável pela proteção antioxidante exercida pelo fármaco e demonstrada pelos níveis de peroxidação lipídica (Figura 10).

A conclusão acima é apoiada pelos resultados obtidos com 40 mg/Kg de duloxetina, uma dose que começa a ser pró-convulsivante (Figuras 7, 8 e 9) e que foi ineficaz em prevenir a queda da atividade da SOD pelo PTZ (Figura 11 e 13). Estudos adicionais com doses maiores de duloxetina estão sendo realizados para confirmar um possível efeito bifásico da droga no estresse oxidativo gerado pelo modelo de convulsões.

Diversos estudos relatam o importante papel do estresse oxidativo na epileptogênese (ROWLEY & PATEL, 2013; NAZIROGLU & YUREKLI, 2013). O achado de que a duloxetina pode ter ação anticonvulsivante e antioxidante torna esta droga uma opção importante para auxiliar no tratamento da epilepsia. Tendo em vista a alta incidência da comorbidade epilepsia e depressão, estudos como o nosso fazem-se necessários para estabelecer a segurança da administração dessas drogas em pacientes epiléticos que fazem o uso de drogas anticonvulsivantes.

Considerando que, na maioria dos casos, a morte por ingestão de duloxetina é devida não à duloxetina sozinha e sim pela associação com outras drogas e comorbidades (PILGRIM *et al.*, 2014) e que a duloxetina é o antidepressivo com menos casos de mortalidade reportados por overdose (TAYLOR *et al.*, 2013), o nosso estudo é o primeiro passo importante na avaliação da duloxetina como um potencial adjuvante no tratamento de pacientes epiléticos depressivos.

5.0. REFERÊNCIAS

ABDEL-WAHAB, B.A.; SALAMA, R.H. **Venlafaxine protects against stress-induced oxidative DNA damage in hippocampus during antidepressant testing in mice.** Pharmacology Biochemistry and Behavior, vol. 100, no. 1, pp. 59–65, 2011

AEBI, H. **Catalase *in vitro*.** Methods in Enzymology. 105. 1984

AGUIAR, C.C, ALMEIDA, A.B, ARAÚJO, P.V, VASCONCELOS, G.S, CHAVES, E.M, DO VALE, O.C, MACÊDO, D.S., LEAL, L.K, DE BARROS VIANA, G.S, VASCONCELOS, S.M. Effects of agomelatine on oxidative stress in the brain of mice after chemically induced seizures. Cell Mol Neurobiol.33(6):825-35. 2013.

AHERN, T.H.; JAVORS, M.A.; EAGLES, D.A.; MARTILLOTTI, J.; MITCHELL, H.A.; LILES, L.C.; WEINSHENKER, D. **The effects of chronic norepinephrine transporter inactivation on seizure susceptibility in mice.** Neuropsychopharmacology. 31: 730-8. 2006.

AKULA, K.K; DHIR, A.; KULKARNI, S.K. **Systemic administration of adenosine ameliorates pentylentetrazole-induced chemical kindling and secondary behavioral and biochemical changes in mice.** Fundam Clin Pharmacol. 21: 583-94. 2007.

AKPINAR, A.; UGUZ, A.C.; NAZIROGLU, M. **Agomelatine and Duloxetine synergistically modulates apoptotic pathway by inhibiting oxidative stress triggered intracellular calcium entry in neuronal PC12 cells: Role of TRPM2 and voltage-gated calcium channels.** J Membrane Biol. 247: 451-459. 2014.

ALBANO, C.; CUPELLO, A.; MAINARDI, P.; SCARRONE, S.; FAVALE, E. **Successful treatment of epilepsy with serotonin reuptake inhibitors: proposed mechanism.** Neurochem Res. 31: 509-514. 2006.

ALDARMMA, J.; LIU, Z.; LONG, J.; MO, X.; MA, J.; LIU, J. **Anti-convulsant effect and mechanism of Astragalus mongholicus extract in vitro and in vivo: Protection against oxidative damage and mitochondrial dysfunction.** Neurochem Research. 35 (1): 33-41. 2010.

APRIOKU, J.S. **Pharmacology of Free Radicals and the Impact of Reactive Oxygen Species on the Testis.** J Reprod Infertil. 14(4):158-172. 2013.

ARHAN, E.; SERGARROGLU, A.; OZTUK, B.; OZTURK, H.S.; KURT, N.; KUTSAL, E.; SEVINC, N. **Effects of epilepsy and antiepileptic drugs on nitric oxide, lipid peroxidation and xanthine oxidase system in children with idiopathic epilepsy.** Seizure. 20 (2): 138-42. 2011.

AN, Y.; INOUE, T.; KITAICHI, Y.; IZUMI, T.; NAKAGAWA, S.; SONG, N.; CHEN, C.; LI, X.; KOYAMA, T.; KUSUMI, I. **Anxiolytic-like effect of mirtazapine mediates its effect in the median raphe nucleus.** Eur J Pharmacol. 720: 192-197. 2013.

AZAM, F.; PRASAD, M.V.V.; THANGEVAL, N. **Targeting oxidative stress component in the therapeutics of epilepsy.** *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 12: 994-1007. 2012.

BAHREMAND, A.; PAYANDEMEHR, B.; RAHIMIAN, R.; ZIAI, P.; POURMAND, N.; LOLOEE, S.; EBRAHIMI, A.; GHASEMI, A.; FAKHFOURI, G.; GHASEMI, M.; DEHPOUR, A.R. **The role of 5-HT(3) receptors in the additive anticonvulsant effects of citalopram and morphine on pentylenetetrazole-induced clonic seizures in mice.** *Epilepsy Behav.* 21(2):122-7. 2011.

BAGDY, G.; KECSKEMETI, V.; RIBA, P.; JAKUS, R. **Serotonin and epilepsy.** *J Neurochem.* 100: 857-873. 2007.

BALL, S.; MARANGELL, L.B.; LIPSIU, S.; RUSSEL, J.M. **Brain-derived neurotrophic factor in generalized anxiety disorder: Results from a duloxetine clinical trial.** *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. 43: 217–221. 2013.

BERG, A.T.; SCHEFFER, I.E. **New concepts in classification of the epilepsies: Entering the 21st century.** *Epilepsia*, 52(6):1058–1062, 2011.

BETHMANN, K.; FRITSCHY, J.M.; BRANDT, C.; LÖSCHER, W. **Antiepileptic drug resistant rats differ from drug responsive rats in GABA(A) receptor subunit expression in a model of temporal lobe epilepsy.** *Neurobiology of Disease*. 31: 169-187. 2008.

BIKJDAOUENE, L.; ESCAMES, G.; LEÓN, J.; FERRER, J.M.; KHALDY, H.; VIVES, F.; ACUÑA-CASTROVIEJO, D. **Changes in brain amino acids and nitric oxide after melatonin administration in rats with pentylenetetrazole-induced seizures.** *J Pineal Res.* 35(1):54-60. 2004.

BLANCHET, P. ; FROMMER, G.P. **Mood change preceding epileptic seizures.** *J Nerv Ment Dis.* 174(8): 471-476. 1986.

BONNYCASTLE, D.D.; GIARMAN, N.J.; PAASONEN, M.K. **Anticonvulsant compounds and 5-hydroxytryptamine in rat brain.** *Brit. J. Pharmas.* 12: 228, 1957.

BOROWICZ, K.K.; KLEINROK, Z.; CZUCZWAR, S.L. **Influence of 7-nitroindazole on the anticonvulsive action of conventional antiepileptic drugs.** *European Journal of Pharmacology*. 331: 127-132. 1997.

BOROWICZ, K.K.; FURMANEK-KARWOWSKA, K.; MORAWSKA, M.; LUSZCZKI, J.J.; CZUCZWAR, S.J. **Effect of acute and chronic treatment with milnacipran potentiates the anticonvulsant activity of conventional antiepileptic drugs in maxima electroconvulsive-induced seizures in mice.** *Psychopharmacology*. 207: 661-669. 2010.

BOROWICZ, K.K.; GOLYSKA, D.; LUSZKI, J.; CZUCZWAR, S.J. **Effect of acutely and chronically administered venlafaxine on the anticonvulsant action of classical**

antiepileptic drugs in the mouse maximal electroshock model. European Journal of Pharmacology. 670: 114-120. 2011.

BOROWICZ, K.K.; PISKORSKA, B.; STEPNIAK, B.; CZUCZWAR, S.J. **Effects of fluoxetine on anticonvulsant action of valproate and ethosuximide in mouse model of myoclonic convulsions.** Annals of Agricultural and Environmental Medicine. 19: 487-490. 2012.

BRANCO, C.S.; SCOLA, G.; RODRIGUES, A.D.; CESIO, V.; LAPROVITERA, M.; HEINZEN, H.; DOS SANTOS, M.T.; FANK, B.; DE FREITAS, S.C.V.; COITINHO, A.S.; SALVADOR, M. **Anticonvulsant, neuroprotective and behavioral effects of organic and conventional yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) on pentylenetetrazol-induced seizures in Wistar rats.** Brain Research Bulletin 92. 60–68. 2013.

CARDENAS-RODRIGUEZ, N.; HUERTA-GERTRUDIS, B.; RIVERA-ESPINOSA, L.; MONTESINOS-CORREA, H.; BANDALA, C.; CARMONA-APARICIO, L.; COBALLASE-URRUTIA, E. **Role of Oxidative Stress in Refractory Epilepsy: Evidence in Patients and Experimental Models** Int. J. Mol. Sci. 14: 1455-1476. 2013.

CHOI, J.; HAHN, S.J. **Duloxetine blocks cloned Kv4.3 potassium channels.** Brain Research . 1466: 15–23. 2012.

CHOWDHURY, B.; BHATTAMISRA, S.K.; DAS, M.C. **Anti-convulsant action and amelioration of oxidative stress by *Glycyrrhiza glabra* root extract in pentylenetetrazole-induced seizure in albino rats.** Indian J Pharmacol. Jan-Feb; 45: 40-43. 2013.

CORCORAN, M.E. **Characteristics of accelerated kindling after depletion of noradrenaline in adult rats.** Neuropharmacology. 27:1081–4. 1988.

CUENCA, P.J.; HOLT, R.K.; HOEFLE, J.D. **Seizures secondary to citalopram overdose.** The Journal of Emergency Medicine. 26: 177-181. 2004.

DEL-BEL, E.A.; OLIVEIRA, P.R.; OLIVEIRA, J.A.C.; MISHRA, P.K.; JOBE, P.C.; GARCIA-CAIRASCO, N. **Anticonvulsant and proconvulsant roles of nitric oxide in experimental epilepsy models.** Braz. J. Med. Biol. Res. 30: 971-979. 1997.

DENG, Y.; WANG, W.; YU, P.; XI, Z.; XU, L.; LI, X.; HE, N. **Comparison of taurine, GABA, Glu, and Asp as scavengers of malondialdehyde in vitro and in vivo.** Nanoscale Research Letters. 8:190. 2013.

DHIR, A.; KULKARNI, S.K. **Venlafaxine reverses chronic fatigue-induced behavioral, biochemical and neurochemical alterations in mice.** Pharmacol Biochem Behav. 89(4):563-71. 2008.

DUDEK, F. E.; STALEY, K. J. **The time course of acquired epilepsy: implications for therapeutic intervention to suppress epileptogenesis.** Neurosci Lett. 497: 240-6. 2011.

DUGAN, S.E.; FULLER, M.A. **Duloxetine: a dual reuptake inhibitor.** Ann Pharmacother. 38: 2078 – 85. 2004.

ENGEL, D.; ZOMKOWSKI, A.D.E.; LIEBERKNECHT, V.; RODRIGUES, A.L.; GABILAN, N.H. **Chronic administration of duloxetine and mirtazapine downregulates proapoptotic proteins and upregulates neurotrophin gene expression in the hippocampus and cerebral cortex of mice.** Journal of Psychiatric Research. 47: 802-808. 2013.

ESTERBAUER, H .; CHEESEMAN, K.H. **Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal.** Methos Enzymol. 186: 407-21. 1990.

FERRARO, T.; GOLDEN, G.; SMITH, G.; ST JEAN, P.; SCHORK, N.; MULHOLLAND, N.; BALLAS, C.; SCHILL, J.; BUONO, R.; BERRETTINI, W. **Mapping loci for pentylene-tetrazol-induced seizure susceptibility in mice.** J Neurosci. 19:6733–6739. 1999.

FIGHERA, M.R.; ROYES, L.F.; FURIAN, A.F.; OLIVEIRA, M.S.; FIORENZA, N.G.; FRUSSA-FILHO, R.; PETRY, J.C.; COELHO, R.C.; MELLO, C.F. **GM1 ganglioside prevents seizures, Na⁺,K⁺-ATPase activity inhibition and oxidative stress induced by glutaric acid and pentylenetetrazole.** Neurobiol Dis. 22:611-23. 2006.

FISKE, CH; SUBBAROW, Y. **The colorimetric determination of phosphorus.** J. Biol. Chem. 66:375-400. 1925.

GALANOPOULOU, A.S.; KOKAIA, M.; LOEB, J.A.; NEHLIG, A.; PITKANEN, A.; ROGAWSKI, M.A.; STALEY, K.J.; WHITTEMORE, V.H.; DUDEK, F.E. **Epilepsy therapy development: technical and methodologic issues in studies with animal models.** Epilepsia. 54:13-23. 2013.

GAUR, V.; KUMAR, A. Protective effect of desipramine, **venlafaxine** and trazodone against experimental animal model of transient global ischemia: possible involvement of NO-cGMP pathway. Brain Res.1353:204-12. 2010.

GEGELASHVILI, G.; SCHOUSBOA, A. **High affinity glutamate transporters: regulation of expression and activity.** Molecular Pharmacology. 52:6-15. 1997.

GIANNI, P.; JAN, K.J.; DOUGLAS, M.J.; STUART, P.M.; TARNOPOLSKY, M.A. **Oxidative stress and the mitochondrial theory of aging in human skeletal muscle.** Experimental Gerontology. 39: 1391-1400. 2004.

GIORGI, F.S.; MAUCELI, G.; BLANDINI, F.; RUGGIERI, S.; PAPARELLI, A.; MURRI, L.; FORNAI, F. **Locus Coeruleus and neuronal plasticity in a modelo of focal limbic epilepsy.** Epilepsia. 47: 21-25. 2006.

GIORGI, F.S.; PIZZANELLI, C.; BIAGIONI, F.; MURRI, L.; FORNAI, F. **The role of norepinephrine in epilepsy: from the bench to the bedside.** *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 28:507–524. 2004.

GOEL, R.; GOEL A.; KUMAR, Y. **Influence of carvedilol on anticonvulsant effect of gabapentin.** *Acte Neurol Belg.* 111 (4): 296-305. 2011.

GILLIAM, F.; HECIMOVIC, H.; SHELINE, Y. **Psychiatric comorbidity, health, and function in epilepsy.** *Epilepsy and Behavior.* 4: S26 – S30. 2003.

GILLIAM, F. **Depression and epilepsy: Epidemiologic and neurobiologic perspectives that may explain their high comorbid occurrence.** *Epilepsy & Behavior.* 24: 156–168. 2012.

GREEN, L.C.; DE LUZURIAGA, K.R.; WAGNER, D.A. **Nitrate biosynthesis in man.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 7764-7768. 1981.

GUPTA, R.K.; REDDY, P.S. **Antinoceptive and anticonvulsant activities of hydroalcoholic extract of *Jasminum grandiflorum* (jasmine) leaves in experimental animals.** *Pharmacognosy Res.* 5 (4): 286-290. 2013.

GUPTA, Y.K.; VEERENDRA, KUMAR M,H.; SRIVASTAVA, A.K. **Effect of Centella asiatica on pentylenetetrazole-induced kindling, cognition and oxidative stress in rats.** *Pharmacol Biochem Behav.* 74(3):579–585. 2003.

GUZMÁN, D.C.; VÁZQUEZ, I.E.; MEJÍA, G.B.; GARCÍA, E.H.; DEL ANGEL, D.S; OLGUÍN, H.J. **Effect of pentylenetetrazole and carbodiimide on oxidation stress markers in rat brain.** *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 96(6):512-3. 2005.

HAMID, H.; KANNER, A.M. **Should antidepressant drugs of the selective serotonin reuptake inhibitor family be tested as an antiepileptic drug?** *Epilepsy & Behavior.* 26: 261-265. 2013.

HARMONY, T.; URBA-HOLMGREN, R.; URBAY, C.M.; SZAVA, S. **(Na-K)-ATPase activity in experimental epileptogenic foci.** *Brain Res.* 11: 672-80. 1968.

HASHIOKA, S.; KLEGERIS, A.; MONJI, A. **Antidepressants inhibit interferon- γ -induced microglial production of IL-6 and nitric oxide,** *Experimental Neurology*, vol. 206, no. 1, pp. 33–42, 2007.

HASSANZADEH, P.; ARBABI, E.; ROSTAMI, F. **The ameliorative effects of sesamol against seizures, cognitive impairment and oxidative stress in the experimental model of epilepsy.** *Iran J Basic Med Sci.* 17: 100-7. 2014.

HENSLER, G. **Pathophysiology of depression: do we have any solid evidence of interest to clinicians?** *World Psychiatry.* 9: 155-161. 2010.

HIRSCHFELD, R.M. **History and evolution of the monoamine hypothesis of depression.** *J Clin Psychiatry.* 6:4-6. 2000.

HITIRIS, N.; MOHANRAJ, R.; NORRIE, J.; SILLS, G.J.; BRODIE, M.J. **Predictors of pharmaco-resistant epilepsy.** *Epilepsy Research.* 75: 192-196. 2007.

HIGDON, A.; DIERS, A.R.; OH, J.Y.; LANDAR, A.; DARLEY-USMAR, V.M. **Cell signaling by reactive lipid species: new concepts and molecular mechanism.** *Biochem. J.* 442: 453-464. 2012.

HOSSEINI, A.; MIRAZI, N. **Acute administration of ginger (*Zingiber officinale* rhizomes) extract on timed intravenous pentylenetetrazole infusion seizure in mice.** *Epilepsy Res.* 108 (3): 411-9. 2014.

HOU, C. **Pu-Erh tea and GABA attenuates oxidative stress in kainic acid-induced status epilepticus.** *Journal of Biomedical Science.* 18:75. 2011.

HUANG, H.L.; LIN, C.C.; JENG, K.C.; YAO, P.W.; CHUANG, L.T.; KUO, S.L.; HOU, C.W. **Fresh green tea and gallic acid ameliorate oxidative stress in kainic-induced status epilepticus.** *J Agric Food Chem.* 60: 2328-39. 2012.

HUANG, R.Q.; BELL-HORNER, C.L.; DIBAS, M.I.; COVEY, D.F.; DREWE, J.A.; DILLON, G.H. **Pentylenetetrazole-induced inhibition of recombinant gamma – aminobutyric acid type A (GABA(A)) receptors: mechanism and site of action.** *J Pharmacol Exp Ther.* 298:986-95. 2001.

HSIEH, P.F.; HOU, C.; YAO, P.; WU, S.; PENG, Y.; SHEN, M.; LIN, C.; CHAO, Y.; CHANG, M.; JENG, K. **Sesamin ameliorates oxidative stress and mortality in kainic acid-induced status epilepticus by inhibition of MARPK and COX-2 activation.** *Journal of Neuroinflammation.* 8:57. 2011.

ILHAN, A., ALADAG, M.A., KOCER, A., BOLUK, A., GUREL, A., ARMUTCU, F. **Erdosteine ameliorates PTZ-induced oxidative stress in mice seizure model.** *Brain Research Bulletin.* 65: 495–499. 2005.

IMLAY, J.A.; LINN, S. **DNA damage and oxygen radical toxicity.** *Science.* 240: 1302-1309. 1988.

INGVAR, M. SIESJO, B.K. **Local blood flow and glucose consumption in the rat brain during sustained bicuculline-induced seizures.** *Acta Neurol Scand.* 68: 129 – 144. 1983.

ITOH, K.; WATANABE, M.; YOSHIKAWA, K.; KANAHO, Y.; BERLINER, L.J.; FUGII, A.H. **Magnetic resonance and biochemical studies during pentylenetetrazole-kindling development: the relationship between nitric oxide, neuronal nitric oxide synthase and seizures.** *Neuroscience.* 129: 757-766. 2004.

JOSEPHY, P.D. **Molecular Toxicology.** New York: Oxford University Press, 1997.

JELENKOVIC, A.; JOVANOVI, M.; NINKOVI, M.; MAKSIMOVI, M.; BOKONJI, D.; BOSKOVI B. **Nitric oxide (NO) and convulsions induced by pentylenetetrazol.** Ann. NY Acad. Sci.962: 296-305. 2002.

JUNIOR, H.V.N.; FONTELES, M.M. DE FRANÇA.; FREITAS, R. M. **Acute seizure activity promotes lipid peroxidation, increased nitrite levels and adaptative pathways against oxidative stress in the frontal córtex and striatum.** Oxidative medicine and cellular longevity. 2:3, 130-137. 2009.

KANN, O.; KOVACS, R. **Mitochondria and neuronal activity.** Am J Physiol Cell Physiol. 292: C641–C657. 2007.

KANNER, A.M. **Depression in Epilepsy: Prevalence, Clinical Semiology, Pathogenic Mechanism, and Treatment.** Biol Psychiatry. 54:388-98. 2003.

KANNER, A. M.; SOTO, A. **Prevalence and clinical characteristics of postictal psychiatric symptoms in partial epilepsy.** Neurology. 62: 708-713. 2004.

KANNER, A.M.; BALABANOV, A. **Depression and epilepsy: how closely related are they?** Neurology 58: S27–S39. 2002.

KANNER, A.M.; SCHACHTER, S.C.; BARRY, J.J.; HERSDORFFER, D.C.; MULA, M.; TRIMBLE,M.; HERMANN, B.; ETTINGER, A.E.; DUNN, D.; CAPLAN, R.; RYVLIN, P.;

KAGAYA, A.; KATAGIRI, H.; TAWARA, Y.; KUGAYA, A.; INAGAKI, M.; MIYOSHI, I. JITSUIKI, H.; KOZURU, T. KOUHATA, S.; UCHITOMI, Y.; MORINOBU, S.; YAMAWAKI, S. **Effect of sub-chronic treatment with duloxetine on serotonin-2A receptor function in vivo and in vitro.** Biogenic Amines. 16: 541-554. 2001.

KAMAL, S.M. **Combination of valproate and paroxetine in mice exposed to picrotoxin.** International Journal of Nanomedicine. 7: 2583–2589. 2012.

KANEKO, K.; ITOH, K.; BERLINER, L.J.; MIYASAKA, K.; FUJII, H. **Consequences of nitric oxide generation in epileptic-seizure rodent models as studied by in vivo EPR.** Magn. Redon. Med. 48: 1051-1056. 2002.

KAPUTLU, I.; UZBAY, T. **L-NAME inhibits pentylenetetrazole and strychnine-induced seizures in mice.** Brain Res. 753: 98-101. 1997.

KARPA, K.D.; CAVANAUGH, J.E.; LAKOSKI, J.M. **Duloxetine pharmacology: profile of a dual monoamine modulator.** CNS Drug Rev. 8: 361-76. 2002.

KATZUNG, B. **Farmacologia Básica e Clínica.** 12^o Edição. AMGH. 2014.1171.

KECSKEMETI, V.; RUSZNAK, Z. ; PÁL, B.; WAGNER, R.; HARASZTOSI, C.; NÁNÁSI, P.P.; SZÛCS, G. **Norfluoxetine and fluoxetine have similar anticonvulsant and Ca²⁺ channel blocking potencies.** Brain Res Bull. 67: 126-132. 2005.

KIASALARI, Z.; KHALILI, M.; ROGHANI, M.; SADEGHIAN, A. **Antiepileptic and antioxidant effect of *Brassica nigra* on pentylenetetrazole-induced kindling in mice.** Iranian Journal of Pharmaceutical Research. 11 (4): 1209–1217. 2012.

KILIC, F.S.; DOGAN, A.E.; BAYDEMIR, C.; EROL, K. **The acute effects of mirtazapine on pain related behavior in healthy animals.** Neurosciences (Riyadh). 16(3):217-23. 2011.

KOLLA,N.; WEI, Z.; RICHARDSON, J.S.; LI, X.M. **Amitriptyline and fluoxetine protect PC12 cells from cell death induced by hydrogen peroxide,”**Journal of Psychiatry and Neuroscience. (3) 196–201, 2005.

KRAHL, S.E.; CLARK, K.B.; SMITH, D.C.; BROWNING, R.A. **Locus coeruleus lesions suppress the seizure-attenuating effects of vagus nerve stimulation.** Epilepsia. 39:709–14. 1988.

KRAHL, S.E.; CLARK, K.B. **Vagus nerve stimulation for epilepsy: A review of central mechanisms.** Surg Neurol Int. 3: S255–S259. 2012.

KRASS, M.; WEGENER, G.; VASAR, E.; VOLKE V. **The antidepressant action of imipramine and venlafaxine involves suppression of nitric oxide synthesis.** Behav Brain Res. 218(1):57-63. 2011.

KUMAR, A.; GARG, R.; GAUR, V.; KUMAR, P. **Venlafaxine involves nitric oxide modulatory mechanism in experimental model of chronic behavior despair in mice.** Brain Res. 1311:73-80. 2010

KUMAR, A.; GARG, R.; GAUR, V.; KUMAR, P. **Nitric oxide mechanism in protective effect of imipramine and venlafaxine against acute immobilization stress-induced behavioral and biochemical alteration in mice.** Neurosci Lett. 467(2):72-5. 2009

KUMAR, A.; GARG, R. **A role of nitric oxide mechanism involved in the protective effects of venlafaxine in sleep deprivation.** Behav Brain Res. 194(2):169-73. 2008.

KUMAR, A.; LALITHA, S.; MISHRA, J. **Possible nitric oxide mechanism in the protective effect of hesperidin against pentylenetetrazole (PTZ)-induced kindling and associated cognitive dysfunction in mice.** Epilepsy & Behavior. 29: 103-111. 2013.

LANTZ, R.J.; GILLESPIE, T.A.; RASH, T.J.; KUO, F.; SKINNER, M.; KUAN, H-Y.; KNADLER, M.P. **Metabolism, excretion, and pharmacokinetics of duloxetine in healthy human subjects.** Drug metabolism and disposition. 31:1142–1150. 2003.

LEE, S.Y.; LEE, S.J.; HAN, C.; PATKAR, A.A.; MASAND, P.S.; PAE, C.U. **Oxidative/nitrosative stress and antidepressants: targets for novel antidepressants.** Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 1:46:224-35. 2013.

LI, B.; WANG, L.; SUN, Z.; YANG, Z.; SHAO, D.; ZHAO, J.; SONG, Y.; LV, J.; DONG, X.; LIU, C.; WANG, P.; ZHANG, X.; CUI, R. **The anticonvulsant effects of SR57227 on pentylenetetrazole-induced seizure in mice.** Plos one. 9: e93158. 2014.

LIANG, L.P.; PATEL, M. **Mitochondrial oxidative stress and increased seizure susceptibility in Sod2^{+/+} mice.** Free Radic Biol Med. 36: 542–554. 2004.

LOPES, K.S.; RIOS, E.R.; LIMA, C.N.; LINHARES, M.I.; TORRES, A.F.; HAVT, A.; QUINET, Y.P.; FONTELES, M.M.; MARTINS, A.M. **The effects of the Brazilian ant *Dinoponera quadriceps* venom on chemically induced seizure models.** Neurochem Int. 63(3):141-5. 2013.

LOSCHER, W.; KLITGAARD, H.; TWYMAN, R.E.; SCHMIDT, D. **New avenues for anti-epileptic drug discovery and developmente.** Nature Reviews.12: 757-776. 2013.

LUSZCKI, J.; ZADROZNIAK, A. BARCICKA-KLOSOWSKA, B.; BEDNARSKI, J.; MISIUTA-KRZESINSKA, M.; FILIP, D.; ZWOLINSKI, J.; CZERNECKI, R. **Influence of 7-nitroindazole and N-nitro-L-arginine on the anticonvulsant activity of loreclezole in maximal electroshock-induced seizures in mice.** Journal o pre-clinical and clinical researcj. 11 (2): 146-149. 2007.

MAGYAR, J.; RUSZNAK, Z.; HARASZTOSI, C.; KÖRTVÉLY, A.; PACHER, P.; BÁNYÁSZ, T.; PANKUCSI, C.; KOVÁCS, L.; SZÛCS, G.; NÁNÁSI, P.P.; KECSKEMÉTI, V. **Differential effects of fluoxetine enantiomers in mammalian neural and cardiac tissues.** Int J Mol Med. 11: 535-542. 2013.

MARCHETTI, R. L.; CASTRO, A.P.W.; KURGANT, D.; CREMONESE, E.; NETO, J.G. **Transtornos Mentais Associados à Epilepsia.** Rev. Psiq. Clín. 32: 170-182. 2005.

MAZARATI, A.; SHIN, D.; KWON, Y.S.; BRAGIN, A.; PINEDA, E.; TIO, D.; TAYLOR, A.N.; SANKAR, R. **Elevated plasma corticosterone level and depressive behavior in experimental temporal lobe epilepsy.** Neurobiol Dis. 34:457–461. 2009.

MCINTYRE, D.C. **Amygdala kindling in rats: facilitation after local amygdala norepinephrine depletion with 6-hydroxydopamine.** Exp Neurol. 69:395–407. 1980.

MCNAMARA, J. O. **Emerging insights into the genesis of epilepsy.** Nature. 399 (6738 Suppl): 15-22. 1999.

MELDRUM, B.S.; NILSSON, B. **Cerebral blood flow and metabolic rate early and late in prolonged epileptic seizures induced in rats by bicuculline.** Brain. 99: 523–542. 1976.

MISRA, H.P.; FRIDOVICH, I. **The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase.** The journal of biological Chemistry. 247: 3170-3175. 1972.

MIKA, J.; ZYCHOWSKA, M.; MAKUCH, W.; ROJEWSKA, E.; PRZEWLOCKA, B. **Neuronal and immunologic basis of action of antidepressants in chronic pain – clinical and experimental studies.** Pharmacological Reports. 65: 1611-1621. 2013.

MUNOZ-CASTANEDA, J.R.; MONTILLA, P.; PADILLO, F.J.; BUJALANCE, I.; MUNOZ, M.C.; MUNTANE, J.; TUNEZ, I. **Role of serotonin in cerebral oxidative stress in rats.** Acta Neurobiol Exp. 66: 1-6. 2006.

NAI, Q.; DONG, H. W.; HAYAR, A.; LINSTER, C.; ENNIS, M. **Noradrenergic regulation of GABAergic inhibition of main olfactory bulb mitral cells varies as a function of concentration and receptor subtype.** J. Neurophysiol. 101, 2472-2484. 2009.

NAZIGLU, M. **Molecular role of catalase on oxidative stress-induced Ca(2+) signaling and TRP cation channel activation in nervous system.** J Recept Signal Transduct Res. 32(3):134-41. 2012.

NAZIROGLU, M.; YUREKLI, V.A. **Effects of antiepileptic drugs on antioxidant and oxidant molecular pathways.** Cell Mol Neurobiol. 33: 589-599. 2013.

NAZIROĞLU M, AKAY MB, ÇELİK Ö, YILDIRIM Mİ, BALCI E, YÜREKLI VA. **Capparis ovata modulates brain oxidative toxicity and epileptic seizures in pentylentetrazol-induced epileptic rats.** Neurochem Res. 38:780-8. 2013.

OLIVEIRA, M.S.; FURIAN, A.F.; ROYES, L.F.F.; FIGHERA, M.R.; MYSKIW, J.C.; FIORENZA, N.G.; MELLO, C.A. **Ascorbate modulate pentylentetrazole-induced convulsion biphasically.** Neuroscience. 128: 721-728. 2004.

PATEL, D. S.; DESHPANDE, S. S.; PATEL, C. G.; SINGH, S. **Duloxetine : A Dual Action Antidepressant.** Indo-Global Journal of Pharmaceutical Sciences. 1: 63-76. 2011.

PAYANDEMEHR, B.; BAHREMAND, A.; RAHIMIAN, R.; ZIAI, P.; AMOUZEGAR, A.; SHARIFZADEH, M.; DEHPOUR, A.R. **5-HT₃ receptor mediates the dose-dependent effects of citalopram on pentylentetrazole-induced clonic seizure in mice: Involvement of nitric oxide.** Epilepsy Research. 101: 217-227. 2012.

PELLICCIARI, A.; BALZARRO, B.; SCARAMELLI, A.; PORCELLI, S.; SERRETTI, A.; DE RONCHI, D. **Generalized tonic-clonic seizure secondary to duloxetine poisoning: a short report with favorable outcome.** Neurotoxicology. 33(2):189-90. 2012.

PINTOR, L.; BAILLÉS, E.; MATRAI, S.; CARREÑO, M.; DONAIRE, A.; BOGET, T.; SETOAIN, X.; RUMIA, J.; BARGALLÓ, N. **Efficiency of venlafaxine in patients with psychogenic nonepileptic seizures and anxiety and/or depressive disorders.** J Neuropsychiatry Clin Neurosci. 22(4):401-8. 2010.

PILGRIM, J.L.; GEROSTAMOULOS, D.; DRUMMER, O.H. **The prevalence of duloxetine in medico-legal death investigations in Victoria, Australia (2009-2012)**. *Forensic Sci Int.* 234:165-73. 2014.

PINEDA, R.; BEATTIE, C.E.; HALL, C.W. **Closed-loop neural stimulation for pentylenetetrazole-induced seizures in zebrafish**. *Dis Model Mech.* (1):64-71. 2013.

PINEDA, E.A.; HENSLER, J.G.; SANKAR, R.; SHIN, D.; BURKE, T.F.; MAZARATI, A.M. **Interleukin-1beta Causes Fluoxetine Resistance in an Animal Model of Epilepsy-Associated Depression**. *Neurotherapeutics.* 9:477–485. 2012.

RAHMATI, B.; KHALILI, M.; ROGHANI, M.; AHGHARI, P. **Anti-epileptogenic and antioxidant effect of *Lavandula officinalis* aerial part extract against pentylenetetrazole-induced kindling in male mice**. *J Ethnopharmacol.* 148 (1): 152-7. 2013.

RAMOS, S.F.; MENDONÇA, B.P.; LEFFA, D.D.; PACHECO, R.; DAMIANI, A.P.; HAINZENREDER, G.; PETRONILHO, F.; DAL-PIZZOL, F.; GUERRINI, R.; CALO, G.; GAVIOLI, E.C.; BOECK, C.R.; DE ANDRADE, V.M. **Effects of neuropeptide S on seizures and oxidative damage induced by pentylenetetrazole in mice**. *Pharmacol Biochem Behav.*103(2):197-203. 2012.

RASGADO, L.A.V.; REYES, G.M.C.; VEGA-DIAZ, M.F. **Anticonvulsant drugs, oxidative stress and nitric oxide**. *Proc. West. Pharmacol.* 54: 40-47. 2011.

REAGAN-SHAW, S.; NIHAL, M.; AHMAD, N. **Dose translation to animal from human studies revised**. *The FASEB Journal.* 22: 659-661. 2007.

REUS, G.Z.; STRINGARI, R.B.; DE SOUZA, B. **Harmine and imipramine promote antioxidant activities in prefrontal cortex and hippocampus**. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 3: 325–331. 2010.

RODRIGUES, A.D.; SCHEFFEL, T.B.; SCOLAA, G.; DOS SANTOS, M.T.; FANK, B.; DE FREITAS, S.C.V.; DANI, C.; VANDERLINDEA, R.; HENRIQUES, J.A.P.; COITINHO, A.S.; SALVADOR, M. **Neuroprotective and anticonvulsant effects of organic and conventional purple grape juices on seizures in Wistar rats induced by pentylenetetrazole**. *Neurochemistry International.* 60: 799–805. 2012.

ROWLEY, S.; PATEL, M. **Mitochondrial involvement and oxidative stress in temporal lobe epilepsy**. *Free Radic Biol Med.* 2013.

RUDZINSKI, L.A.; MEADOR, K.J. **Epilepsy and neuropsychological comorbidities**. *Continuum (Minneapolis Minn).* 19(3): 682-696. 2013.

SARDO, P.; FERRARO, G. **Modulatory effects of nitric oxide-active drugs on the anticonvulsant activity of tamotrigine in an experimental model of partial complex epilepsy in the rat.** BMC Neuroscience. 8:47. 2007.

SCHMIDT, D.; ROGAWSKI, M.A. **New strategies for the identification of drugs to prevent the development or progression of epilepsy.** Epilepsy Research. 50: 71-78. 2002.

SITGES, M.; ALDANA, B.I.; GOMEZ, C.D.; NEKRASSOV, V. **The antidepressant sertraline prevents the behavioral and EEG changes induced in two animal models of seizures.** Epilepsy and Behavior. 25: 511-6. 2012.

SHIN, E.; JEONG, J.H.; CHUNG, Y.H.; KIM, W.; KO, K.; BACH, J.; HONG, J.; YONEDA, Y.; KIM, H. **Role of oxidative stress in epileptic seizures.** Neurochem Int. 59(2): 122–137. 2011.

SMITH, M.; WILCOX, K.S.; WHITE, H.S. **Discovery of Antiepileptic Drugs.** Neurotherapeutics, 4: 12-17. 2007.

SOUZA, M.A.; OLIVEIRA, M.S.; FURIAN, A.F.; RAMBO, L.M.; RIBEIRO, L.R.; LIMA, F.D.; DALLA CORTE, L.C.; SILVA, L.F.; RETAMOSO, L.T.; DALLA CORTE, C.L.; PUNTEL, G.O.; DE AVILA, D.S.; SOARES, F.A.; FIGHERA, M.R.; DE MELLO, C.F.; ROYES, L.F. **Swimming training prevents pentylenetetrazol-induced inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase activity, seizures, and oxidative stress.** Epilepsia.50: 811-23. 2009.

SHAFAROODI,H. MOEZI, L.; FAKHRZAD, A.'HASSANIPOUR, M.REZAYAT, M.; DEHPOUR,A.R. **The involvement of nitric oxide in the anti-seizure effect of acute atorvastatin treatment in mice.** Neurol Res. 34(9): 847-53. 2012.

STOCKER, R.; KEANEY, J.F. **Role of oxidative modifications in atherosclerosis.** Physiol. 84 (4): 1381-1478. 2004.

STAFSTROM, C.E. **Persistent sodium current and its role in epilepsy. Epilepsy currents.** 7: 15-22. 2007.

STOJANOVIĆ, I.; JELENKOVIĆ, A.; STEVANOVIĆ, I.; PAVLOVIĆ, D.; BJELAKOVIĆ, G.; JEVTOVIĆ-STOIMENOV, T. **Spermidine influence on the nitric oxide synthase and arginase activity relationship during experimentally induced seizures.** J Basic Clin Physiol Pharmacol. 21(2):169-85. 2010.

SWAMY, M.; YUSOF, W.R.W.; SIRAJUDEEN, K.N.S.; MUSTAPHA, Z.; GOVINDASAMY, C. **Decreased glutamine synthetase, increased citrulline-nitric**

oxide cycle activities, and oxidative stress in different regions of brain in epilepsy rat model. J Physiol Biochem. 67:105-113. 2011.

TAVAKOLI, S.A.; GLEASON, O.C. **Seizures associated with venlafaxine, methylphenidate and zolpidem.** Psychomatics. 44: 262-264. 2003.

TAYLOR, D.; LENOX-SMITH, A.; BRADLEY, A. **A review of the suitability of duloxetine and venlafaxine for use in patients with depression in primary care with a focus on cardiovascular safety, suicide and mortality due to antidepressant overdose.** Ther Adv Psychopharmacol. (3):151-61. 2013.

TROADEC, J.; MARIEN, M.; DARIOS, F.; HARTMANN, A.; RUBERG, M.; COLPAERT, F.; MICHEL, P.P. **Noradrenaline provides long-term protection to dopaminergic neurons by reducing oxidative stress.** Journal of Neurochemistry. 79: 200-210. 2001.

UZBAY, T. I.; KAYIR, H.; CEYHAN, M. **Effects of tianeptine on onset time of pentylenetetrazole-induced seizures in mice: Possible role of adenosine A1 receptor.** Neuropsychopharmacology. 32: 412-416. 2007.

VERMOESEN, K.; MASSIE, A.; SMOLDERS, I.; CLINCKERS, R. **The antidepressants citalopram and reboxetine reduce seizure frequency in rats with chronic epilepsy.** Epilepsia. 53: 870-878. 2012.

WAITEKUS, A.B.; KIRKPATRICK, P. **Duloxetine hydrochloride.** Nature Reviews. 3:907-908. 2004.

WANG, S.; CALDERON, J.; WANG, G.K. **Block of Neuronal Na⁺ Channels by Antidepressant Duloxetine in a State-dependent Manner.** Anesthesiology. 113:655–65. 2010.

WYSE, A.T.S.; STRECK, E.L.; BARROS, S.V.T.; BRUSQUE, A.M.; ZUGNO, A.I.; WAJNER, M. **Methylmalonate administration decreases Na⁺K⁺-ATPase activity in cerebral cortex of rats.** NeuroReport. 11: 2331-2334. 2000.

WHO. **Epilepsy.** World Health Organization. 2012. Disponível em: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/en/. Acesso em 9 abril 2014.

YACUBIAN, E.M.T. **Tratamento da epilepsia na infância.** Jornal de Pediatria. 0021-7557/02/78-Supl.1/S19. 2002.

ZAFIR, A.; ARAR, A.; BANU, N. **In vivo antioxidant status: A putative target of antidepressant action.** Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry. 33: 220-228. 2009.

ZOMKOWSKI, A.D.E.; ENGEL, D.; CUNHA, M.P.; GIBILAN, N.H.; RORIGUES, A.L.S. **The role of the NMDA receptors and L-arginine-nitric oxid-cyclic guanosine monophosphate pathway in the antidepressant-like effect of duloxetine in forced swimming test.** Pharmacology, Biochemistry and Behavior. 103: 408-417. 2012.

