



**Universidade de Brasília**

**Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

**Laboratório de Neurofarmacologia**

**Priscilla Dianne Gonçalves Silva**

**Neurovespina como Terapia Adjuvante em Cães com  
Epilepsia Idiopática Farmacorresistente**

**Brasília – DF, 2024.**



**Universidade de Brasília**  
**Faculdade de Ciências da Saúde**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde**

**Priscilla Daianne Gonçalves Silva**

**Neurovespina como Terapia Adjuvante em Cães com Epilepsia Idiopática  
Farmacorresistente**

Dissertação de Mestrado apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

**Orientadoras:**

**Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Carolina Mortari**

**Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Márcia Renata Mortari**

**Brasília – DF, 2024.**

**PRISCILLA DAIANNE GONÇALVES SILVA**

**Neurovespina como Terapia Adjuvante em Cães com Epilepsia Idiopática  
Farmacorresistente**

Dissertação de Mestrado apresentada  
como requisito parcial para a obtenção do  
título de Mestre em Ciências da Saúde pelo  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da  
Saúde da Universidade de Brasília.

**BANCA EXAMINADORA**

**Prof. Dr<sup>a</sup>. Márcia Renata Mortari (presidente)**

**Universidade de Brasília**

**Prof. Dr. Rogério Martins Amorim**

**FMVZ-Unesp-Botucatu-SP**

**Prof. Dr. Rafael Plakoudi Souto Maior**

**Universidade de Brasília**

**Dr. Gabriel Avohay Alves Campos (Suplente)**

**Universidade de Brasília**

Dedico este trabalho, a Jesus, o Cristo, cuja graça e cuidado me sustentaram até aqui. Com especial amor, dedico também aos meus pais, à minha irmã Thaís e ao meu amado filho, Samuel Boaz, o lindão da mamãe. Estendo esta dedicatória a toda a minha família, por todo o amor e apoio. Por fim, dedico aos pacientes que, futuramente, serão beneficiados pelos resultados desta apaixonante pesquisa.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu pai e Senhor da minha vida, Jesus, o Cristo, por me ajudar a fazer o meu melhor nesta dissertação, sem que eu precisasse deixar de lado o cuidado e a dedicação ao meu filho; por Sua presença constante em todos os momentos da minha vida e por me permitir experimentar diariamente o seu amor.

Agradeço aos meus pais, que sempre me amaram e acreditaram no meu potencial, mesmo sem entenderem o que significava a UnB quando mencionei essa universidade aos meus 14 anos. Obrigada por estarem comigo nos momentos mais difíceis e desafiadores, por cuidarem do meu filho quando precisei, sempre me ajudando sem jamais reclamarem ou me cobrarem por isso.

À minha irmã (Thaís Jerusa), que, mesmo em meio às diferenças inerentes à irmandade, esteve ao meu lado, me apoiando e me amando com seu jeitinho peculiar. Ao meu lindo, amado e maravilhoso filho Samuel, que, mesmo tão jovem, compreendeu este momento e esteve ao meu lado durante grande parte da edição desta dissertação, sempre perguntando: "Mamãe, está acabando?" "Mamãe, está acabando?"

A toda a minha família, Tia Gê, Tia Edna, Tia Valdo, especialmente aos meus avós, que já não estão mais entre nós, mas espero reencontrá-los na eternidade.

Às minhas maravilhosas orientadoras, Ana Carolina Mortari e Márcia Mortari, que compreenderam meu contexto familiar e a minha função de mãe, e mesmo assim decidiram me acompanhar, me motivar e seguiram comigo até o fim.

A todos os meus irmãos na fé, que são muitos para nomear aqui, mas faço questão de mencionar o Pastor Joivan e a Léo, o Pastor Luciano e a Eunice, que representam verdadeiros pais espirituais, sempre me amando e aconselhando com tamanha sabedoria.

Aos meus muitos e maravilhosos amigos, em especial Eva, Rhudiany, Leilane, Paula Dutra, Bruna Aguiar, pelo apoio, e por entenderem a importância e o desafio deste momento.

Ao Hospital Vet Help e ao Centro Integrado Veterinário CVET, que abriram suas portas para apoiar a realização desta pesquisa. À querida, amada e brilhante médica

veterinária especializada em Cardiologia, Camila Becon, que realizou todos os eletrocardiogramas e avaliações pressóricas dos cães participantes.

A toda a equipe do NeuropharmaLab e a todos os maravilhosos professores que me ajudaram a chegar até aqui. Em especial, agradeço à professora Dilcione, que, com tanto amor, escolheu lecionar em Valparaíso, uma cidade distante de sua casa, porque Deus sabia que eu precisava conhecê-la. Foi graças a ela que, aos 13 anos, ouvi falar da UnB pela primeira vez, e, naquele simples momento, entendi qual seria o caminho para realizar o meu sonho de me tornar veterinária e descobrir essa universidade tão especial.

Expresso meu agradecimento à Banca, que gentilmente aceitou o convite e se dispôs a colaborar nesta fase da dissertação. Desde já, registro minha profunda gratidão.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, à Universidade de Brasília e à agência de fomento CAPES, pelo apoio técnico e financeiro.

Aos meus inúmeros pacientes e suas famílias, que me permitiram tornar-me uma profissional em constante busca pela excelência.

E, por fim, a todos os meus mais de 40 pets que fizeram parte da minha vida, especialmente aqueles da minha infância, quando, sem condições de pagar por atendimento veterinário, eu mesma cuidava deles. Foi com eles que o amor incondicional pela veterinária nasceu e permanece até hoje.

Por fim, expresso minha profunda alegria por poder, em um futuro breve, contribuir para o bem-estar de tantos que necessitam, através dos resultados desta pesquisa. A oportunidade de ajudar é, sem dúvida, uma das maiores realizações que essa jornada me proporcionou, e por isso, agradeço imensamente a todos que direta ou indiretamente participaram e apoiaram este trabalho.

*“Porque dele, e por ele, e para ele  
são todas as coisas (Rm 11.36) ... Pois nele  
vivemos, nos movemos e existimos (Atos  
17.28)”.*

## RESUMO

A epilepsia é a doença neurológica crônica mais frequente em cães e humanos e, em ambas as espécies, a refratariedade aos fármacos antiepilépticos é um problema que afeta gravemente a qualidade de vida. Diante desse quadro, a medicina translacional tem trabalhado com novas pesquisas, incluindo o cão como modelo de epilepsia para seres humanos. O peptídeo denominado de “Neurovespina” (NV) foi desenhado a partir de um peptídeo natural extraído da peçonha de vespas sociais endêmicas do cerrado brasileiro contendo neuroativos que vem sendo testados para o tratamento de doenças neurológicas ou neurodegenerativas e seu uso obteve adequado controle das crises epiléticas em camundongos. As vantagens de seu uso terapêutico incluem alta potência, excelente seletividade, baixa toxicidade, apresentando poucos efeitos adversos. O presente estudo selecionou oito cães saudáveis e seis cães classificados com epilepsia idiopática de causa desconhecida no critério Tier II associado ao painel para diagnóstico de doenças infecciosas. Mantendo a medicação antiepiléptica convencional, a NV foi administrada na dose de 150 a 200 µg/cão, a cada 8 horas, por via subcutânea. A frequência e gravidade das crises foram acompanhadas quinzenalmente de 6 a 54 meses. Resultados revelaram ausência de efeitos adversos ( $p > 0,9999$ ), de alterações no eletrocardiograma ( $p > 0,9999$ ) e de PAS ( $p = 0,2585$ ) nos cães tratados em comparação com os oito cães do grupo saudável. A frequência média semestral (FMS) das crises sofreu redução após o uso da NV no grupo tratado com valores de  $p = 0,0312$  e  $0,044$ . As principais desvantagens do peptídeo estiveram relacionadas à via de administração subcutânea (SC) e a frequência de administração. Diante dos resultados obtidos, conclui-se que a NV representa uma alternativa promissora para o manejo da epilepsia farmacorresistente em cães. A possível influência na FMS e a ausência de efeitos adversos sugerem que a NV pode ser uma opção como terapia adjuvante para cães e, futuramente, humanos. Além disso, foi relatado que os cães tiveram melhora na qualidade de vida, atribuídos à redução de crises agrupadas, *status epilepticus*, redução do período *pós ictus* e/ou melhora cognitiva. Esses achados sublinham a necessidade de estudos futuros que aprofundem a investigação sobre o uso clínico da NV em populações mais amplas, via de administração transdérmica e a quantificação sérica na NV com objetivo de melhorar a definição das doses.

**Palavras chaves:** epilepsia, peptídeos, fármacos antiepiléptico, efeitos adversos, cães

## ABSTRACT

Epilepsy is a chronic neurological disease that is most common in dogs and humans. In both species, resistance to antiepileptic medications is a problem that seriously affects quality of life. Translational medicine has been conducting new research, using dogs as a model for studying epilepsy in humans. They have developed a peptide called "Neurovespina" (NV) from a natural peptide found in the venom of social wasps native to "cerrado" of Brazil. This peptide contains neuroactives that have been tested for treating neurological and neurodegenerative diseases, and it has proven to be effective in controlling seizures. The advantages of its therapeutic use include high potency, excellent selectivity, low toxicity, and few adverse effects. In the current study, six dogs diagnosed with idiopathic epilepsy, which is of unknown cause, were selected based on Tier II criteria associated with the panel for diagnosing infectious diseases. While continuing with their regular anti-epileptic medication, the dogs were given NV at a dosage of 150 a 200  $\mu\text{g}/\text{dog}$  (three times a day, subcutaneously). The frequency and severity of seizures were monitored every week for a period ranging from 6 to 54 months. Results showed no adverse effects ( $p > 0.9999$ ) or changes in the electrocardiogram ( $p > 0.9999$ ) and SBP ( $p = 0.2585$ ) in the treated dogs and 8 dogs in the healthy group. The mean semiannual frequency (FMS) of seizures decreased after the use of NV in the treated group ( $p = 0.0312$  and  $0.044$ ). The main downsides of the peptide were associated with its subcutaneous (SC) administration route and frequency of use. We have determined that NV shows promise as an alternative for managing drug-resistant epilepsy. It may also serve as an option for adjuvant therapies for dogs and potentially for humans in the future. All dogs experienced an improvement in their quality of life, including a reduction in clustered seizures, *status epilepticus*, the post-ictus period, and/or cognitive enhancement. However, these findings emphasize the necessity for future studies to further investigate the clinical use of NV in broader populations, the transdermal administration route, and serum quantification in NV to improve dose definition.

**Keywords:** epileptic, seizures, peptides, antiepileptic drugs, adverse effects, dogs.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Imagem ilustrativa da vespa social *Polybia occidentalis*. Disponível em: <https://www.inaturalist.org/observations/102093920>.....42
- Figura 2** - Colônia de vespa social *Polybia occidentalis*: Fonte: <https://www.inaturalist.org/observations/102093920>.....42
- Figura 3** - Representação da fórmula estrutural do peptídeo Occidentalina-1202, destacando a organização dos grupos funcionais e a sequência específica de aminoácidos. Fonte: Dos Anjos (2017).....43
- Figura 4** - **Fórmula estrutural do peptídeo Neurovespina:** com massa molecular de 1208,53, composta por nove resíduos de aminoácidos: E-Q-M-W-A-V-F-W-M (Campos, 2016).....44
- Figura 5** - Espectro de massas da neurovespina demonstrando a presença do peptídeo (M+H = 1231.58).....49
- Figura 6** - Frasco contendo o peptídeo NV, devidamente preparado para administração nos cães.....49
- Figura 7** - Representa a seleção dos 24 cães avaliados, sendo 8 alocados ao grupo sadio (GS) e 18 ao grupo tratado (GN). Após a aplicação dos critérios de inclusão, apenas 6 cães do grupo GN foram utilizados para as coletas de dados.....50
- Figura 8** - Fluxograma representando as etapas do protocolo experimental realizado nos 8 cães do grupo sadio (GS). O protocolo incluiu exame físico, aferição da pressão arterial sistólica (PAS) e eletrocardiograma (ECG), seguido da aplicação de uma dose única de NV (150 µg/cão, SC). Após 30 minutos, os procedimentos foram repetidos, e os cães permaneceram em observação por duas horas em ambiente controlado, com posterior contato via aplicativo de mensagens para monitoramento. ....52
- Figura 9** - Fluxograma do protocolo experimental conduzido para os 6 cães do grupo tratado (GN). As etapas para avaliação dos efeitos adversos agudos foram as mesmas para o Grupo sadio. Para a avaliação de efeitos adversos crônicos e características das crises,

os animais receberam NV em regime de uso contínuo (150-200 µg/cão, TID, SC) em ambiente domiciliar, com acompanhamento remoto e presencial para monitorar efeitos adversos e crises epiléticas. ....54

**Figura 10** - Divisão do grupo tratado com NV em dois subgrupos de análise: GN1 (grupo neurovespina geral), composto por todos os cães do estudo, e GN2 (grupo neurovespina modelo refinado), formado apenas pelos animais que receberam a NV após três meses de ajuste dos fármacos antiepiléticos convencionais (FAC) e mantiveram a administração a cada oito horas (TID) por, no mínimo, seis meses.....56

**Figura 11** - Representação do "Período Livre de Crises" (PLC), relacionando dados retrospectivos (média de dias sem crises no semestre anterior) e dados prospectivos (maior período entre as crises, em dias corridos). ....57

**Figura 12** - Representação da Frequência Média Semestral (FMS) considerando dados retrospectivos (somatório de crises generalizadas, crises agrupadas e **status epilepticus** do semestre anterior ao início da NV) e dados prospectivos (mesma somatória e análise semestral após o início da NV).....58

**Figura 13** - Cães participantes do projeto. No entanto a imagem do cão no canto superior esquerdo é ilustrativa (fonte: Google). ....61

**Figura 14** - Gráfico de barras apresentando dados da massa corporal (Kg) antes e durante o tratamento com NV. Os pontos individuais representam os valores de massa corporal de cada cão, enquanto as barras de erro vertical indicam o erro padrão da média. ....65

**Figura 15** - Gráfico de barras apresentando o PLC do grupo GN1 antes e durante o uso da NV. Os pontos sobre as barras representam os valores individuais de PLC para cada cão, enquanto as barras indicam a média e o erro padrão da média (SEM). A barra roxa corresponde ao período antes do uso da NV (Antes NV) e a barra azul ao período durante o uso da NV (Durante NV). O teste t pareado indicou diferença significativa entre os grupos, com  $p = 0.0196$ . ....68

**Figura 16** - Gráfico de barras apresentando o PLC do grupo GN2 antes e durante o uso da NV. Os pontos sobre as barras representam os valores individuais de PLC para cada cão, enquanto as barras indicam a média e o erro padrão da média (SEM). A barra roxa corresponde ao período antes do uso da NV (Antes NV) e a barra azul ao período durante

o uso da NV (Durante NV). O teste t pareado indicou diferença significativa entre os grupos, com  $p = 0.003$ . .....69

**Figura 17** - Gráfico de caixa e bigode comparando a frequência média semanal (FMS) de crises epiléticas antes (Antes) e após o melhor semestre de resposta a NV (Melhor) para GN1. O eixo Y está representado em base 2 ( $\log_2$ ). Os valores são expressos em mediana e intervalo interquartil, com  $p = 0,0312$ . .....70

**Figura 18:** Histograma apresentando a comparação da FMS do grupo GN1 em três momentos distintos: antes, 6 meses e 12 meses após o uso da NV. Os dados são representados em mediana e intervalo interquartil, o asterisco (\*) indica um outlier no semestre “Antes”. Os valores de P sobre as barras demonstram as comparações entre os momentos, evidenciando a significância no momento “Antes” e 12 meses. ....71

**Figura 19:** Gráfico de barras representa a comparação entre o número de crises epiléticas no grupo GN2 “Antes” e “Após” o uso da NV. Considerou-se a média do número de crises com o erro padrão da média (SEM). Observa-se uma redução significativa no número de crises após o uso da NV, com um valor de P de 0,0444 ( $< 0,05$ ). O asterisco (\*) incida a diferença entre os momentos avaliados. ....72

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** - Classificação dos canais de cálcio voltagem-dependentes de acordo com o subtipo, tipo, localização e função.....19

**Tabela 2** - Dados dos FAC e tempo de tratamento (em meses) antes da introdução da NV .....63

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	15
<b>2.1</b>	<b>Epilepsia em Cães:</b> .....	15
2.1.1	Classificação: Definições, Etiologias e tipos de crises epiléticas. ....	15
2.1.2	Fisiopatologia da Epilepsia em Cães .....	17
2.1.3	Farmacorresistência: Contexto atual e Definição .....	23
2.1.4	Mecanismo de farmacorresistência.....	24
<b>2.2</b>	<b>Cães como Modelos Translacionais na Epilepsia</b> .....	27
2.2.1	Contextualização ao Modelo Translacional na Epilepsia .....	27
2.2.2	Aplicação Translacional.....	29
2.2.3	Desafios e Limitações do Modelos Translacionais Cão.....	30
<b>2.3</b>	<b>Diagnóstico da Epilepsia idiopática (EI)</b> .....	31
<b>2.4</b>	<b>Tratamento da EI</b> .....	33
2.4.1	Fármacos antiepiléticos convencionais (FAC).....	33
2.4.2	Monitoramento dos cães sob uso dos FAC .....	35
2.4.3	Limitações dos FAC.....	37
<b>2.5</b>	<b>Peptídeos</b> .....	38
2.5.1	Contexto da terapia com peptídeos .....	38
2.5.2	Aplicabilidade.....	39
2.5.3	Vantagens e desvantagens.....	39
2.5.4	Uso de peptídeos em cães .....	40
<b>2.6</b>	<b>Derivados de Peçonha e Neurovespina</b> .....	41
2.6.1	Contexto dos peptídeos derivados de peçonhas.....	41
2.6.2	Neurovespina .....	42
<b>3</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	47
<b>3.1</b>	<b>Objetivo Geral:</b> .....	47
<b>3.2</b>	<b>Objetivo Específicos:</b> .....	47
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	48
<b>4.1</b>	<b>Crítérios éticos e desenho do estudo</b> .....	48
<b>4.2</b>	<b>Síntese e avaliação do grau de pureza do peptídeo Neurovespina</b> .....	48
<b>4.3</b>	<b>Padronização de dose e frequência de administração</b> .....	50
<b>4.4</b>	<b>Seleção dos animais – Grupos amostrais</b> .....	50

4.4.1	Grupo sadio (GS).....	51
4.4.2	Grupo Neurovespina (GN).....	52
4.4.3	Acompanhamento dos pacientes: Grupo Neurovespina (GN).....	54
4.4.4	Análise Estatística.....	59
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>60</b>
<b>5.1</b>	<b>Grupos de estudo: Grupo sadio</b> .....	<b>60</b>
<b>5.2</b>	<b>Grupos de estudo: Grupo Neurovespina</b> .....	<b>60</b>
5.2.1	Descrição dos cães .....	60
5.2.2	Características das crises.....	61
5.2.3	Medicações antiepiléticas prévias.....	62
5.2.4	Avaliação de possíveis efeitos adversos do peptídeo Neurovespina.....	64
5.2.5	Adesão ao uso da Neurovespina .....	65
5.2.6	Avaliação do período livre de crise, frequência média mensal.....	66
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>73</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>83</b>
	<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>84</b>
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>92</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A epilepsia é uma condição neurológica crônica caracterizada por crises recorrentes, que afeta uma parcela significativa tanto da população canina quanto humana. Nos cães, sua prevalência varia entre 0,6% e 0,75% da população, sendo a condição neurológica mais comum nessa espécie (Berendt et al., 2015). Em humanos, a epilepsia também é prevalente, atingindo cerca de 50 milhões de pessoas, com uma incidência anual estimada entre 50,4 e 81,7 casos por 100.000 habitantes (Falco-Walter, 2020).

Devido à alta prevalência em cães, a epilepsia compromete profundamente a qualidade de vida dos indivíduos afetados, especialmente quando associada a crises agrupadas e *status epilepticus*, o que frequentemente leva à decisão de eutanásia por parte dos tutores, evidenciando o impacto severo da falta de controle adequado das crises sobre o bem-estar dos cães (Monteiro et al., 2012; Hamers et al., 2023).

Atualmente, o manejo das epilepsias, incluindo a epilepsia idiopática (EI) em cães é limitado a um número restrito de fármacos antiepilépticos licenciados (Podell et al., 2016; Potschka et al., 2023). Contudo, esses medicamentos são ineficazes para um número significativo de cães epiléticos, além de frequentemente estarem associados a eventos adversos (Muñana, 2013; Charalambous et al., 2016). A dificuldade de manejo e a ineficácia dos medicamentos atuais reforçam a necessidade de explorar novas abordagens terapêuticas e compreender melhor os mecanismos de resistência farmacológica em cães com epilepsia (Potschka et al., 2023)

Apesar dos esforços contínuos na pesquisa e desenvolvimento de novas medicações e terapias todos os anos, a epilepsia refratária permanece um desafio não resolvido, tanto na medicina veterinária (Potschka et al., 2023), quanto na medicina humana (Mesraoua et al., 2023).

Estudos recentes sobre o uso de peptídeos têm demonstrado resultados promissores para uma variedade de condições em humanos, como câncer, diabetes mellitus, Doença de Alzheimer e outras doenças neurodegenerativas (Wang, 2024). Há um interesse crescente no uso de peptídeos para o tratamento de epilepsia, especialmente na modulação de receptores e canais iônicos no encéfalo (Mortari, 2007; Campos, 2020), no entanto, a aplicação desses peptídeos na epilepsia refratária ainda é escassa e requer maior investigação (Wang, 2024).

Nesse contexto, a Neurovespina (NV), um peptídeo sintético derivado da peçonha da vespa *Polybia occidentalis*, surge como uma abordagem promissora para o manejo de condições neurológicas, incluindo a epilepsia refratária. Estudos em camundongos sugerem que a NV foi eficaz no manejo da epilepsia (Carneiro, 2017; Campos, 2020).

Com base nessas premissas foi investigada a ação antiepiléptica da NV em cães com epilepsia idiopática resistente a medicamentos, com a hipótese de que sua administração reduziria a frequência das crises em cães refratários às terapias antiepilépticas convencionais.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Epilepsia em Cães:

#### 2.1.1 Classificação: Definições, Etiologias e tipos de crises epiléticas.

A epilepsia é um dos distúrbios neurológicos mais comuns em cães, caracterizada por crises epiléticas recorrentes e espontâneas, que resultam de atividade neuronal excessiva, sincronizada e autolimitante de neurônios no cérebro (Berendt et al., 2015; De Risio et al., 2015). As crises epiléticas, por sua vez, são eventos súbitos e breves, geralmente com duração inferior a 2-3 minutos, podendo se manifestar de forma generalizada, afetando ambos os hemisférios cerebrais, ou de maneira focal, comprometendo apenas uma região específica do cérebro (Berendt et al., 2015).

As crises focais representam a principal forma de apresentação das crises epilética em cães (Hülsmeier et al., 2010; Berendt et al., 2015; Löscher, 2022). No entanto, um contraste significativo emerge ao comparar os resultados de Hamers et al. (2023), que relataram crises epiléticas tônico-clônica generalizada como sendo mais prevalentes, ocorrendo em 305 dos 402 cães avaliados. Essa divergência pode estar associada à dificuldade dos tutores em identificar crises focais, já que essas crises apresentam uma variedade de características fenotípicas, frequentemente confundidas com comportamentos normais ou mudanças de comportamento, tais como ansiedade e inquietação (Berendt et al., 2015; Löscher, 2022). Assim, embora as crises focais possam ser mais comuns, as crises generalizadas tendem a ser relatadas com maior frequência pelos tutores, devido à sua apresentação mais evidente e marcante (Potschka et. al, 2023).

As apresentações focais estão associadas a um pior prognóstico (Potschka et. al, 2023), além disso, a subnotificação dessas crises pode comprometer a eficácia do tratamento (Löscher et al., 2022). Portanto, é essencial que os veterinários treinem os tutores para identificação das crises, além de solicitar registros em “diários”, visando um monitoramento mais eficaz (Potschka et. al, 2023). Sabe-se que o controle rigoroso dessas crises pode melhorar significativamente o prognóstico a longo prazo (Löscher et al., 2022). Tecnologias de monitoramento contínuo são necessárias para detecção de crises epiléticas, incluindo as focais e poderiam contornar a necessidade de registro pelos tutores (Löscher et al., 2022).

Anteriormente, acreditava-se que as crises focais estavam predominantemente associadas a lesões estruturais no cérebro (Risio et al., 2015; Löscher et al., 2022). No entanto, estudos sugerem que as crises focais podem estar frequentemente associadas à epilepsia idiopática (EI), assim como é descrito em humanos para algumas síndromes (Hülsmeier et al., 2010). Um estudo com 49 Border Collies observou que 78% dos cães apresentaram início das crises de forma focal (Hülsmeier et al., 2010), em contraste, outros estudos não encontraram nenhuma associação significativa entre o tipo de crise e a raça (Hamers et al., 2023).

Quando as crises epilépticas ocorrem em resposta a uma perturbação temporária, como em distúrbios metabólicos ou tóxicos, são classificadas como crises reativas, sendo estas reversíveis com a resolução da causa subjacente (Berendt et al., 2015).

A epilepsia, por sua vez, é definida como uma doença do cérebro caracterizada por uma predisposição duradoura para gerar crises epilépticas e é geralmente diagnosticada após a ocorrência de pelo menos duas crises epilépticas não provocadas, separadas por mais de 24 horas (Berendt et al., 2015). Essa condição não é apenas uma série de eventos isolados, mas uma predisposição crônica que pode resultar em consequências neurobiológicas, cognitivas, psicológicas e sociais para os animais afetados (Berendt et al., 2015; Sanders, 2015).

A epilepsia pode ser subdividida em duas categorias: epilepsia estrutural e epilepsia idiopática. A epilepsia estrutural é aquela na qual há evidências de lesões cerebrais identificáveis ou anomalias estruturais que alteram a função cerebral normal, como tumores, traumas, ou malformações congênitas. Essas alterações são detectáveis por meio de exames de imagem avançados ou outros métodos diagnósticos, evidenciando a correlação entre a estrutura danificada e a atividade epiléptica (Berendt et al., 2015).

Por outro lado, a epilepsia idiopática é uma forma de epilepsia na qual não há evidência de anomalias estruturais ou lesões cerebrais detectáveis que expliquem a predisposição para crises. Essa categoria é subdividida em três subtipos principais: epilepsia genética confirmada, epilepsia com suspeita de origem genética e epilepsia de causa desconhecida (Berendt et al., 2015).

A epilepsia genética confirmada é diagnosticada quando um gene específico causador de epilepsia é identificado. A epilepsia com possível origem genética é identificada pela alta prevalência da condição em certas raças, através de análises de pedigrees ou pela ocorrência de casos familiares, mesmo sem a identificação de um gene específico. Por fim, a epilepsia de

causa desconhecida é diagnosticada quando não há uma base estrutural evidente para as crises e a causa subjacente permanece incerta (Berendt et al., 2015).

Em cães, devido às dificuldades encontradas na identificação das etiologias das crises epiléticas, a epilepsia é, na maioria das vezes, classificada como idiopática. Desde a década de 1990, o termo idiopático tem sido considerado obsoleto na medicina humana (Löscher, 2022), mas ainda é amplamente utilizado na medicina veterinária, refletindo as limitações diagnósticas vigentes (Berendt et al., 2015; De Risio et al., 2015; Löscher, 2022).

É um fato que se sabe pouco sobre as causas genéticas da epilepsia em cães. Em humanos, inovações impulsionadas por novas tecnologias e análises avançadas levaram a avanços notáveis na descoberta de genes relacionados à epilepsia. Atualmente, mais de 80 genes são considerados diretamente ligados à epilepsia, e cerca de 800 outros genes podem estar envolvidos na doença (Löscher, 2022). Löscher (2022) destaca que “a nova era genômica agora impacta diretamente o atendimento clínico, avançando em direção à medicina de precisão.”

Além disso, a ILAE (Liga Internacional Contra a Epilepsia) diferencia crises epiléticas em síndromes epiléticas com base em padrões clínicos distintos e categorizados por EEG (Scheffer et al., 2017), somando a ao conhecimento genético já conhecido (Löscher, 2022), no entanto, esse nível de diagnóstico ainda não é viável na epilepsia canina (Löscher, 2022; Potschka et al., 2023).

Ademais, a medicina humana tem aumentado considerável sua capacidade de diagnóstico etiológico com estudos de neuroimagem e estudos genéticos (Löscher 2022), enquanto a medicina veterinária ainda se baseia em uma classificação de quase uma década (Berendt et al., 2015). Assim, podemos refletir sobre a complexidade da epilepsia e a necessidade contínua de pesquisa para elucidar seus mecanismos e etiologias, com o objetivo de fundamentar diagnósticos e desenvolver estratégias terapêuticas individualizadas (Berendt et al., 2015).

### **2.1.2 Fisiopatologia da Epilepsia em Cães**

Em um cérebro normal, a atividade neuronal é regulada por processos bioquímicos e eletrofisiológicos que mantêm o equilíbrio entre excitação e inibição, essencial para a função cerebral adequada. Este equilíbrio é essencial para controlar a predisposição intrínseca dos neurônios a dispararem evitando a hiperexcitabilidade e assegurando que a ativação neuronal ocorra de maneira ordenada. Para compreender como esse equilíbrio é mantido, é importante

considerar alguns conceitos básicos e fundamentais, como o potencial de membrana, o potencial de ação, os canais iônicos, receptores, neurotransmissores e circuitos neurológicos (Sanders, 2015; Patterson, 2013).

O potencial de membrana representa a diferença de carga elétrica entre o interior e o exterior da célula neuronal, sustentado pela distribuição desigual de íons como sódio ( $\text{Na}^+$ ), potássio ( $\text{K}^+$ ), cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e cloro ( $\text{Cl}^-$ ) através da membrana celular. Em repouso, o potencial de membrana de um neurônio é tipicamente cerca de  $-65$  mV, o que indica um estado em que o interior da célula é mais negativo em relação ao exterior. Esta polaridade é mantida, principalmente, pela ação da bomba de sódio-potássio e pela maior permeabilidade dos canais de potássio em repouso. Quando ocorre movimento de íons temporariamente há mudança na diferença de carga elétrica entre o interior e o exterior da célula, levando à despolarização da membrana (Sanders, 2015; Wehrwein et. al., 2016).

O potencial de ação ocorre em resposta à despolarização, uma mudança rápida e breve no potencial de membrana. Durante este processo, a abertura rápida dos canais de sódio voltagem-dependentes permite a entrada maciça de  $\text{Na}^+$  na célula, causando uma inversão temporária do potencial de membrana. Logo após, os canais de potássio voltagem-dependentes abrem, resultando na saída de  $\text{K}^+$  e na repolarização da membrana. Este ciclo de despolarização e repolarização propaga o sinal elétrico ao longo do axônio, permitindo a comunicação eficiente entre os neurônios (Sanders, 2015).

Os canais iônicos são proteínas transmembrana que facilitam o transporte seletivo de íons através da bicamada lipídica, desempenham papel importante na manutenção do potencial de membrana e na geração dos potenciais de ação. Esses canais são categorizados em dois principais tipos: canais voltagem-dependentes e canais ativados por ligantes (Sanders, 2015; Wehrwein et. al., 2016).

Os canais iônicos voltagem-dependentes abrem ou fecham em resposta a variações no potencial de membrana, e os tipos mais relevantes incluem os canais de sódio ( $\text{Na}^+$ ), potássio ( $\text{K}^+$ ), cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e cloro ( $\text{Cl}^-$ ). Quando um estímulo atinge a membrana de um neurônio, ocorre uma despolarização inicial que modifica o potencial de membrana, sinalizando para que os canais de sódio se abram rapidamente. Este processo resulta em um influxo de  $\text{Na}^+$ , que inverte temporariamente o potencial de membrana, tornando-o positivo em relação ao exterior da célula e gerando o potencial de ação. Subsequentemente, os canais de potássio voltagem-

dependentes promovem a repolarização, permitindo a saída de  $K^+$  da célula e restaurando o potencial de repouso (Sanders, 2015; Wehrwein et. al., 2016).

Os canais de cloreto são fundamentais para a estabilização do potencial de membrana; a entrada de  $Cl^-$  através desses canais hiperpolariza a célula, reduzindo sua excitabilidade e prevenindo uma atividade neuronal excessiva (Sanders, 2015; Wehrwein et. al., 2016). Os canais de cálcio voltagem-dependentes são responsáveis pela liberação de neurotransmissores nas sinapses. Quando ativados por um potencial de ação, permitem a entrada de  $Ca^{2+}$  na célula, o que promove a fusão das vesículas sinápticas com a membrana e consequente liberação de neurotransmissores (Sanders, 2015; Wehrwein et. al., 2016).

Os principais tipos de canais de cálcio são L, T, N, P/Q e R. Esses canais desempenham diversas funções celulares, desde ativação da contração muscular a liberação de neurotransmissores e regulação da transcrição gênica (Pallone et al., 2018) (Tabela 1). No coração, predominam os canais de cálcio dos tipos L e T, com os canais do tipo L exercendo um papel fundamental na contração do músculo cardíaco e na fase de platô do potencial de ação, enquanto os canais do tipo T, presentes nas células marca-passo, contribuem para a regulação do ritmo cardíaco (Pallone et al., 2018; Shah et al., 2022). No sistema nervoso, os canais dos tipos N e P/Q são cruciais para a liberação de neurotransmissores nas sinapses, enquanto os canais do tipo L participam tanto da liberação de neurotransmissores quanto da plasticidade sináptica. Já os canais do tipo T regulam a excitabilidade neuronal, especialmente nas células marca-passo neuronais e em certos ritmos cerebrais, e os canais do tipo R, embora menos frequentes, também desempenham um papel na liberação de neurotransmissores (Pallone et al., 2018). A compreensão da funcionalidade dos canais de cálcio tornou-se essencial para o avanço dos estudos sobre epilepsia, uma vez que pesquisas demonstram uma relação direta entre esses canais e a fisiopatologia da doença (Lerche et al., 2013).

**Tabela 1** - Classificação dos canais de cálcio voltagem-dependentes de acordo com o subtipo, tipo, localização e função

Subtipo	Tipo	Localização	Função
Cav1.1	L	Músculo esquelético	Liberação de cálcio para contração muscular
Cav1.2	L	Coração, cérebro, músculo liso	Contração muscular cardíaca, liso, secreção endócrina e sinalização neural
Cav1.3	L	Cérebro, coração, retina	Marca-passo cardíaco e audição
Cav1.4	L	Retina	Envolvido na neurotransmissão visual

Cav2.1	P/Q	Sistema nervoso central	Liberação de neurotransmissores
Cav2.2	N	Sistema nervoso central	Liberação de neurotransmissores, modulação da resposta à dor
Cav2.3	R	Cérebro, células endócrinas	Liberação de neurotransmissores e hormônios, envolvido na plasticidade sináptica
Cav3.1	T	Neurônio, músculo cardíaco	Ritmo cardíaco
Cav3.2	T	Neurônio, músculo cardíaco	Ritmo cardíaco
Cav3.3	T	Cérebro, medula espinhal	Papel na sinalização neural e disparos rítmicos

**Fonte:** Elaborada pela autora com base em Pallone et al. (2018) e Shah et al. (2022).

Os canais iônicos dependentes de ligantes são receptores do tipo ionotrópico que funcionam simultaneamente como receptores e canais iônicos. Eles incluem os subtipos AMPA, NMDA, cainato, GABA<sub>A</sub> e receptores de glicina. Estes canais são ativados quando um ligante, como o neurotransmissor glutamato, se une ao receptor, desencadeando a abertura do canal e permitindo o fluxo rápido de íons através da membrana celular em resposta ao estímulo (Sanders, 2015; Wehrwein et. al., 2016).

Em contraste, os receptores metabotrópicos, como os receptores GABA<sub>B</sub> e os receptores de glutamato metabotrópicos, são acoplados a proteínas G e não possuem um canal iônico integrado; em vez disso, ativam uma cascata de sinalização intracelular que pode resultar na abertura ou fechamento de canais iônicos situados em outras regiões da membrana. A ativação dos receptores metabotrópicos é mais lenta, pois depende de múltiplos eventos de sinalização antes de modificar a atividade iônica. Assim, os receptores ionotrópicos e metabotrópicos modulam o fluxo iônico de maneiras diferentes: diretamente pelos ionotrópicos, que atuam como canais iônicos, e indiretamente pelos metabotrópicos, que utilizam vias de sinalização intracelular (Sanders, 2015; Wehrwein et. al., 2016).

Os neurotransmissores são classicamente definidos como substâncias químicas liberadas na membrana pré-sináptica, geralmente no final de um terminal axônico, que ativam receptores na membrana pós-sináptica. Entre os principais neurotransmissores estão o GABA, o glutamato, a acetilcolina (ACh), a serotonina, a epinefrina, a dopamina, a histamina e a glicina, todos desempenhando papéis essenciais na regulação da excitabilidade neuronal (Patterson, 2013; Sanders, 2015).

No cérebro, o glutamato é o principal neurotransmissor excitatório, ativando receptores ionotrópicos como NMDA e AMPA, que permitem a entrada de íons positivos e promovem a

excitação neuronal (Patterson, 2013; Sanders, 2015). Em contraste, o GABA e a glicina são neurotransmissores inibitórios; o GABA, em especial, age ativando receptores que facilitam a entrada de íons cloro, resultando em hiperpolarização e inibição da atividade neuronal, enquanto a glicina atua principalmente como um neurotransmissor inibitório na medula espinhal (Patterson, 2013; Sanders, 2015; Wehrwein et. al., 2016).

O equilíbrio entre neurotransmissores, canais iônicos, receptores e vias neurais é essencial para o funcionamento cerebral adequado. Quando uma lesão ou insulto atinge os neurônios de um cérebro saudável, podem ocorrer alterações que desencadeiam o processo de epileptogênese (Patterson, 2013; Sanders, 2015), que, por sua vez, é o processo pelo qual um cérebro normal se torna predisposto a desenvolver crises epiléticas espontâneas e recorrentes (Patterson, 2013).

Embora o conhecimento direto sobre a epileptogênese em cães seja limitado, pesquisas em modelos de roedores e humanos fornecem informações valiosas aplicáveis a todos os mamíferos, incluindo cães (Patterson, 2013; Löscher, 2022), demonstrando que a epileptogênese pode ser dividida em três fases principais: período latente, crises recorrentes e desenvolvimento de epilepsia refratária (Patterson, 2013).

O período latente ou fase latente refere-se ao tempo desde o início do insulto (trauma, *status epilepticus*, isquemia, infecções, dentre outras causas, incluindo predisposição genética) e o surgimento das crises epiléticas espontâneas, recorrentes e clinicamente óbvias (Patterson, 2013; Löscher, 2022). Secundariamente ao insulto inicial ou ao processo de recuperação pós insulto, pode ocorrer neurodegeneração, neurogênese anômala, neuroinflamação, brotamento axonal e dendrítico, gliose, alterações na expressão e função de canais iônicos e receptores, hiperexcitabilidade de circuitos neuronais, dentre outros processos (Patterson, 2013; Löscher, 2022). Nesse período, que pode durar de dias, meses ou até anos, crises epiléticas subclínicas (atividades epileptiformes em pequena escala) podem ocorrer sem evoluir para crises aparentes, mas ainda assim contribuem para o reforço de circuitos excitatórios, aumentando a hiperexcitabilidade (Löscher, 2022). Até o momento, não há tratamentos capazes de interromper ou modificar essa fase da epileptogênese e prevenir a ocorrência da epilepsia (Löscher, 2022; Jiang e Yu, 2023). No entanto, um estudo realizado com camundongos como modelos crônicos de epilepsia induzidos com agentes químicos demonstrou possível efeito do peptídeo NV na fase latente da epilepsia (Dos Anjos et. al. 2017).

Após o período latente, o cérebro entra na fase conhecida como ictogênese, caracterizada pela ocorrência de crises epiléticas espontâneas e recorrentes (Patterson, 2013; Löscher, 2022). Durante essa fase, nos focos epiléticos, pode ser observado um fenômeno eletrofisiológico chamado deslocamento paroxístico de despolarização (PDS). Em condições normais, os potenciais pós-sinápticos excitatórios produzem potenciais de ação muito breves, que duram apenas alguns milissegundos (Patterson, 2013; Sanders, 2015). Entretanto, durante esse fenômeno, há a geração de uma série rápida de potenciais de ação nos axônios, resultante da entrada maciça de íons positivos, o que desencadeia disparos rápidos e sucessivos de potenciais de ação, seguidos por uma fase de hiperpolarização prolongada, mediada por correntes de potássio dependentes de cálcio (Patterson, 2013; Sanders, 2015; Meyer et al., 2021), resultando assim na geração de PDS sustentados (Sanders, 2015).

A presença de PDS pode ser detectada em eletroencefalogramas (EEG) como descargas epileptiformes, que indicam as regiões cerebrais responsáveis pela geração de crises (Meyer et al., 2021). Assim o PDS é parte de um conjunto de mecanismos que contribuem para a propagação das crises epiléticas, e está potencialmente envolvido na epileptogênese (Meyer et al., 2021). O PDS tem sido extensivamente estudada em modelos animais e pesquisas sobre epilepsia humana para entender seu papel na geração e propagação de crises epiléticas. Estudos têm investigado os canais de cálcio tipo L (Cav1.x), uma vez que esses canais, em neurônios hipocâmpais de ratos, desempenham um papel crucial no desencadeamento de mudanças associadas à despolarização paroxística (PDS) e estão potencialmente envolvidos na epileptogênese (Meyer et al., 2021).

Além da influência dos PDS, durante o período de crises recorrentes, o cérebro passa por modificações adicionais nos circuitos neurais, como a perda de neurônios gabaérgicos inibitórios e o aumento da sensibilidade dos receptores de glutamato (Patterson, 2013; Meyer et al., 2021), além de outros mecanismos, como a interrupção da homeostase intracelular de  $Ca^{2+}$ , a formação de espécies reativas de oxigênio e a elevação do cloreto intracelular (Meyer et al., 2021). Essas mudanças contribuem para a persistência das crises e para a formação de redes neurais hiperexcitáveis que facilitam a propagação da atividade epilética (Patterson, 2013). A combinação de PDS, perda de influências inibitórias normais e mecanismos de retroalimentação cria um ambiente em que neurônios vizinhos são recrutados para um padrão de disparo sincrônico, promovendo a generalização das crises epiléticas (Patterson, 2013).

A terceira fase é marcada pelo desenvolvimento de crises refratárias em cerca de 30% dos pacientes (Patterson, 2013). Nessa fase, ocorre uma liberação exagerada de glutamato, desencadeando uma cascata de eventos intracelulares que aumentam a neurodegeneração, a atividade de células inflamatórias e alterações nos canais iônicos e sensibilidade dos receptores (Patterson, 2013). Assim compreender o processo de epileptogênese é, portanto, essencial para o desenvolvimento de novas intervenções terapêuticas (Patterson, 2013). Vale ressaltar que nem todos os pacientes que sofrem insultos cerebrais desenvolverão epilepsia de imediato; em alguns casos, a condição pode se manifestar anos após a lesão inicial. Portanto, é fundamental monitorar continuamente esses indivíduos, pois eles podem estar em risco de desenvolver epilepsia no futuro. A identificação de biomarcadores específicos ajudaria a rastrear esses pacientes de alto risco, permitindo intervenções precoces para prevenir o surgimento da epilepsia (Löscher, 2022).

### **2.1.3 Farmacorresistência: Contexto atual e Definição**

Atualmente, o manejo da epilepsia idiopática (EI) em cães é restrito a um número limitado de fármacos antiepilépticos licenciados, cujos mecanismos de ação se concentram principalmente no aumento da sinalização GABAérgica e na indução de hiperpolarização, além disso é comum o desenvolvimento de tolerância ou resistência aos FAC (Potschka et. al, 2023; Löscher, 2022). Dessa forma, os fármacos falham em controlar as crises em uma proporção significativa de cães e frequentemente provocam efeitos adversos consideráveis (Muñana, 2013; Charalambous et al., 2016; Löscher, 2022; Potschka et. al, 2023). Assim estima-se que a resistência aos fármacos antiepilépticos (FAC) em cães seja mais elevada do que em humanos, podendo afetar mais de 50% dos cães epiléticos (Löscher, 2022).

Na medicina humana, a resistência aos fármacos antiepilépticos é definida como a incapacidade de uma pessoa permanecer livre de crises epiléticas após o uso adequado de dois medicamentos antiepilépticos (Löscher, 2022). Embora a definição de farmacorresistência seja bem estabelecida na medicina humana, na medicina veterinária essa definição ainda carece de padronização e consenso (Hülsmeyer et al., 2010; Löscher, 2022), além da classificação quanto as síndromes epiléticas (Potschka et. al, 2023). Berendt e colaboradores (2015) descrevem a farmacorresistência como a incapacidade de controlar adequadamente as crises epiléticas, mesmo com o uso apropriado de doses terapêuticas de dois ou mais fármacos antiepilépticos. Outros autores descrevem a farmacorresistência como a falha de um regime medicamentoso,

criteriosamente selecionado e administrado em doses terapêuticas ou máximas toleráveis, em controlar a atividade epiléptica (Potschka et. al, 2023).

Assim, definir e manejar cães com epilepsia idiopática farmacorresistente é um desafio, visto que a resposta ao tratamento abrange múltiplos fatores, incluindo características genéticas, ambientais e individuais. Dentre os principais fatores de risco estão a idade de início das crises, com manifestações precoces associadas a um pior prognóstico, e o sexo masculino, que frequentemente demonstra menor responsividade aos FAC (Potschka et al., 2023). Outro fator importante está relacionado a predisposição genética, estudos sugerem que Pastores Australianos, Border Collies e Cane Corso apresentam um risco aumentado de desenvolver crises agrupadas e resistência a medicamentos (Potschka et al., 2023).

Embora a resistência aos FAC seja uma das causas mais prováveis para o controle inadequado das crises epiléticas, é fundamental considerar também o conceito de pseudorresistência (Charalambous et al., 2023; Potschka et al., 2023) que abrange desde escolhas inadequadas de medicações e dosagens a diagnósticos incorretos (Potschka et al., 2023; Löscher, 2022). Antes de definir uma epilepsia como resistente a medicamentos, a pseudo-resistência deve ser excluída (Löscher, 2022). A principal causa da pseudorresistência em cães epiléticos é a baixa adesão dos tutores ao tratamento prescrito (Löscher, 2022). Um estudo do Reino Unido destacou que apenas 20% dos proprietários seguem completamente as recomendações terapêuticas indicadas pelos médicos veterinários (Booth et al., 2021).

#### **2.1.4 Mecanismo de farmacorresistência**

Os mecanismos envolvidos na resistência aos fármacos antiepiléticos convencionais (FAC) na epilepsia canina podem incluir alterações farmacocinéticas e farmacodinâmicas, severidade intrínseca da doença, mudanças estruturais nas redes neuronais, e variações genéticas e epigenéticas, além de fatores adicionais como inflamação, desequilíbrios no microbioma intestinal e alterações metabólicas que também influenciam a resposta ao tratamento (Potschka et al., 2023), entretanto, os dados disponíveis na literatura veterinária ainda são insuficientes para apoiar hipóteses bem estabelecidas de resistência a medicamentos na epilepsia humana, como as hipóteses do transportador, do alvo e da rede (Löscher, 2022).

As alterações farmacocinéticas referem-se a modificações nos processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção dos medicamentos pelo organismo (Sanders, 2015;

Löscher, 2022). Na epilepsia canina, um dos mecanismos mais críticos de resistência farmacocinética envolve a superexpressão de transportadores de efluxo, como a glicoproteína-P (P-gp), presente na barreira hematoencefálica. A P-gp atua como um mecanismo de defesa cerebral, expulsando ativamente os FAC do sistema nervoso central, impedindo-os de alcançar concentrações terapêuticas adequadas nas regiões-alvo do cérebro, o que compromete sua eficácia no controle das crises epiléticas (Löscher, 2022; Potschka et al., 2023).

O metabolismo de novos fármacos em cães já tratados com outros FAC, como o fenobarbital, pode ser acelerado devido à indução da atividade enzimática, especialmente das enzimas do sistema citocromo P450 no fígado (Tang et al., 2017; Potschka et al., 2023). Essa indução enzimática, junto com diferenças individuais no metabolismo hepático, influencia a taxa de metabolização e eliminação dos medicamentos, levando a níveis séricos subterapêuticos, o que contribui significativamente para a resistência farmacológica (Potschka et al., 2023). Além disso, os níveis de FAC no cérebro são influenciados tanto pelo metabolismo hepático quanto pela excreção renal (Sanders, 2015; Löscher, 2022; Potschka et al., 2023). As alterações nas propriedades farmacodinâmicas também desempenham um papel fundamental na resistência, influenciando diretamente os alvos moleculares no cérebro envolvidos na ação dos FAC (Sanders, 2015).

A farmacodinâmica refere-se à interação dos fármacos com seus alvos biológicos (Sanders, 2015). No contexto dos FAC, esses alvos incluem canais iônicos dependentes de voltagem, receptores GABA<sub>A</sub> e de glutamato, proteínas de vesículas pré-sinápticas e transportadores que regulam as concentrações sinápticas de neurotransmissores. Alterações nas propriedades desses alvos, como mutações genéticas, podem reduzir a eficácia dos medicamentos, caracterizando a chamada resistência ao substrato, na qual a capacidade de ligação das drogas é prejudicada (Potschka et al., 2023).

Outro fenômeno relevante é a severidade intrínseca da epilepsia, definida como a gravidade inerente à condição, que não é modulada por fatores externos, mas sim determinada por características biológicas próprias, como predisposições genéticas ou anomalias neurobiológicas (Potschka et al., 2023). Pacientes com maior severidade intrínseca apresentam uma propensão elevada a crises mais frequentes e intensas, o que frequentemente resulta em uma resposta insuficiente aos medicamentos antiepiléticos, mesmo quando administrados de maneira adequada (Potschka et al., 2023).

Variações genéticas, como os polimorfismos, representam diferenças naturais no DNA entre indivíduos. Paralelamente, as modificações epigenéticas, embora não alterem a sequência de DNA, podem regular a expressão gênica de forma significativa (Potschka et al., 2023). Na epilepsia canina, essas modificações podem influenciar a expressão de genes que codificam alvos terapêuticos ou transportadores de efluxo, comprometendo a eficácia dos FAC (Löscher, 2022; Potschka et al., 2023). Tais mudanças epigenéticas são especialmente relevantes por serem reversíveis, abrindo possibilidades para novas abordagens terapêuticas (Potschka et al., 2023).

A ocorrência de crises epiléticas sequenciais nesses pacientes pode resultar em alterações estruturais, como perda de neurônios, reorganização das conexões sinápticas, neurogênese anômala, neuroinflamação e modificações na plasticidade sináptica, que, a longo prazo, levam à formação de circuitos neuronais com maior propensão à atividade epilética, conhecidos como redes hiperexcitáveis. Como consequência, essas redes promovem a transmissão exacerbada de sinais elétricos, aumentando tanto a frequência quanto a intensidade das crises, o que dificulta ainda mais o controle com terapias medicamentosas tradicionais (Löscher, 2022; Potschka et al., 2023).

A inflamação crônica e exacerbada no encéfalo epilético pode intensificar a gravidade da epilepsia e contribuir para a resistência aos FAC, ao comprometer alvos terapêuticos e alterar a permeabilidade da barreira hematoencefálica (Potschka, 2010; Potschka et al., 2023). Pesquisas têm explorado o papel da ciclooxigenase-2 (COX-2) na hiperexcitabilidade neuronal, na ictogênese e na indução da glicoproteína-P (Fischer et al., 2022; Potschka et al., 2023). Um estudo não controlado investigou o efeito do firocoxibe na inibição da COX-2, com a hipótese de que sua ação anti-inflamatória poderia reduzir a excitabilidade neuronal e aumentar a eficácia dos FAC em cães com epilepsia idiopática resistente ao fenobarbital. Apenas dois cães (18%), ambos com alta densidade de crises, responderam positivamente ao tratamento, levando os autores a sugerirem que o firocoxibe pode ser eficaz em casos graves de epilepsia, onde a inflamação é mais pronunciada (Fischer et al., 2022).

Em conclusão, apesar da ampla discussão sobre os potenciais mecanismos de farmacoresistência, Potschka e colaboradores (2023) destacam a existência de lacunas significativas no entendimento da epilepsia canina resistente a medicamentos. Autores enfatizam a necessidade urgente de aprofundar a pesquisa clínica e experimental para esclarecer os mecanismos subjacentes à resistência, suas associações com diferentes etiologias, tipos de

epilepsia e progressões clínicas, visando a implementação de abordagens terapêuticas mais abrangentes (Potschka et al., 2023; Charalambous et al., 2023).

## **2.2 Cães como Modelos Translacionais na Epilepsia**

### **2.2.1 Contextualização ao Modelo Translacional na Epilepsia**

O conceito de modelo translacional aplicado a epilepsia refere-se a um sistema experimental, geralmente animal, que simula de maneira precisa as características biológicas e clínicas da epilepsia humana. Esses modelos são utilizados para estudar os mecanismos da doença, testar intervenções terapêuticas e diagnósticas que possam ser aplicáveis a tratamentos clínicos em humanos (Löscher, 2022). O objetivo é trazer as descobertas científicas feitas em laboratório para a prática clínica, possibilitando o desenvolvimento de terapias mais eficazes e seguras (Charalambous et al., 2023).

Atualmente, os roedores representam a espécie mais utilizada nas pesquisas sobre epilepsia humana (Patterson, 2014; Löscher, 2022; Charalambous et al., 2023). Entretanto, esses sujeitos apresentam limitações, tais como a anatomia lissencéflica do cérebro, o tamanho reduzido do crânio e a ocorrência não natural da epilepsia. Essas características restringe o modelo de simular com precisão as formas mais complexas e farmacorresistentes da epilepsia humana (Löscher, 2022; Charalambous et al., 2023). Por outro lado, os cães desenvolvem a doença de forma natural, possuem cérebro girencéflico e um crânio de maior tamanho, o que facilita o uso de técnicas avançadas de neuroimagem e monitoramento (Löscher, 2022; Charalambous et al., 2023). Muñana e colaboradores (2017) referem que a ocorrência natural da epilepsia proporciona uma base valiosa para o desenvolvimento de novas terapias com potencial aplicação tanto na medicina veterinária quanto na humana.

Dessa forma, no contexto da neurociência translacional, os cães têm sido amplamente reconhecidos como um modelo relevante para o estudo da epilepsia humana, principalmente devido às semelhanças clínicas, eletrográficas e farmacológicas que compartilham com os humanos (Patterson, 2014; Löscher, 2022; Charalambous et al., 2023). Entre essas, destacam-se a ocorrência espontânea da doença, a diversidade fenotípica, a anatomia cerebral complexa e a presença de epilepsia farmacorresistente, características que os tornam ideais para investigar a fisiopatologia e testar novas terapias (Löscher, 2022; Charalambous et al., 2023).

Além dessas características, os cães compartilham outras semelhanças importantes com os humanos no que diz respeito à manifestação da epilepsia. Em ambas as espécies, a epilepsia é uma condição neurológica multifacetada, caracterizada pela ocorrência recorrente de crises epiléticas (Löscher, 2022) e por uma base etiológica complexa (Charalambous et al., 2023). Não se trata de uma doença única, mas de um grupo de distúrbios que se apresentam com uma ampla variedade de sinais clínicos.

Estudos em cães, utilizando dispositivos de neuroestimulação e EEG intracraniano revelaram padrões eletrofisiológicos de eventos ictais e interictais semelhantes aos observados em humanos (Patterson, 2014; Löscher, 2022). Registros de EEG mostram que cães com epilepsia de ocorrência natural podem ter crises epiléticas de início focal com generalização secundária que são indistinguíveis dos EEGs de pacientes humanos (Patterson, 2014), reforçando o valor do modelo canino para pesquisas translacionais (Löscher, 2022).

A predisposição genética para o desenvolvimento da epilepsia também pode ser um aspecto compartilhado entre cães e humanos, pois certas raças, como o Pastor Belga, Border Collie e Labrador Retriever, apresentam uma maior prevalência da doença (Löscher, 2022). A análise de pedigree de algumas raças de cães indica fortemente uma influência genética na epilepsia idiopática, embora a identificação dos genes envolvidos tenha se mostrado desafiador. Estudos mostram que há semelhanças genéticas marcantes entre humanos e cães, particularmente no que diz respeito a certas formas hereditárias de epilepsia (Charalambous et al., 2023). Em relação às epilepsias progressivas caninas, a maioria das mutações identificadas em cães está presente nos mesmos genes que causam distúrbios equivalentes em humanos (Patterson, 2014). Ademais estudo das variações genéticas em cães tem contribuído para a compreensão das bases genéticas da epilepsia em humanos, destacando o valor do modelo canino para a exploração de novas abordagens terapêuticas (Löscher, 2022; Charalambous et al., 2023).

Outra característica comum entre as espécies é a alta incidência de problemas comportamentais associados à epilepsia. Em humanos a prevalência de transtornos psiquiátricos é maior na epilepsia do que em outras doenças crônicas, em cães alterações comportamentais, como ansiedade, déficits cognitivos e sintomas semelhantes ao transtorno de déficit de atenção / hiperatividade (TDAH) são relatados. Estudos referem que alguns mecanismos comuns, como alterações estruturais e funcionais no sistema límbico, podem estar relacionados à epilepsia e às comorbidades em cães e humanos (Löscher, 2022).

Um estudo que envolveu 81 cães com suspeita de epilepsia idiopática (EI) realizou avaliações por meio de ressonância magnética (RM), identificando como regiões cerebrais mais afetadas o hipocampo, o giro cingulado e os lobos piriformes. Esses achados sugerem que o sistema límbico, particularmente o lobo temporal mesial, pode estar envolvido na EI canina, uma semelhança notável com a epilepsia do lobo temporal mesial em humanos. Entretanto, apesar de dados de RM e tecido cerebral indicarem a forte relação do hipocampo e regiões do lobo temporal ainda não está provada a existência de ELT em cães. Outros trabalhos também têm sugerido essa relação, no entanto há falta de anormalidades ictais ou interictais convincentes no EEG para confirmar tal afirmação (Löscher, 2022).

Além das semelhanças no desenvolvimento da doença, humanos e cães enfrentam desafios similares no tratamento, particularmente com relação à resistência aos medicamentos. Em ambos os casos, a resistência a fármacos antiepilépticos representa um grande obstáculo no controle das crises, sendo os cães usados como modelos para o estudo desses mecanismos e o desenvolvimento de novas terapias (Löscher, 2022; Charalambous et al., 2023). Patterson (2014) sugeriu que o modelo translacional canino de epilepsia pode muito bem ser um excelente passo intermediário para confirmar dados pré-clínicos em modelos de roedores pouco antes de iniciar estudos em humanos.

### **2.2.2 Aplicação Translacional**

Os cães têm sido utilizados extensivamente em ensaios clínicos para testar a eficácia e a segurança de novas terapias antiepilépticas, contribuindo significativamente para o desenvolvimento de terapias medicamentosas e não medicamentosas que, eventualmente, são aplicados em humanos (Löscher, 2022; Charalambous et al., 2023)

O modelo canino apresenta vantagens como sobre outros modelos, inclusive humanos, visto que: (1) o cuidado com a saúde dos cães só é superado pelo cuidado com a saúde dos humanos; (2) a endogamia em raças puras facilita estudos para identificação de fatores genéticos; (3) os estudos de medicamentos novos podem ser realizados com custos menores e sem as exigências regulatórias aplicadas aos humanos; (4) dispositivos de monitoramento de epilepsia em tamanho real podem ser testados diretamente em cães (Patterson, 2014; Löscher, 2022; Charalambous et al., 2023) e (5) quando a eutanásia é considerada, os proprietários de

cães podem demonstrar maior disposição em aprovar tratamentos que envolvam riscos elevados ou cuja eficácia e segurança ainda não foram confirmadas (Patterson, 2014; Löscher, 2022;).

Estudos com cães epiléticos foram essenciais no desenvolvimento de intervenções não farmacológicas, como a estimulação do nervo vago e dispositivos de neuroestimulação responsiva, que foram validados em modelos caninos antes de serem aplicados clinicamente em humanos (Löscher, 2022; Charalambous et al., 2023).

Ensaio farmacológico realizados em cães incluíram o levetiracetam (LEV), inicialmente testado em modelos caninos para compreender sua farmacocinética no tratamento de *status epilepticus* em humanos. Os estudos demonstraram que a administração intravenosa de LEV era segura e potencialmente eficaz para o SE, com resultados obtidos em cães com epilepsia espontânea semelhantes aos encontrados em estudos clínicos abertos em humanos (Patterson, 2014).

De forma geral os ensaios clínicos com cães têm sido realizados para avaliar novos medicamentos antiepiléticos, terapia dietética, dispositivos terapêuticos, dispositivos implantáveis de EEG e modelos de epilepsia resistentes a medicamentos, entre outros (Löscher, 2022). Ensaio pré-clínicos com biomarcadores eletrofisiológicos em cães identificaram padrões de EEG capazes de prever a eficácia terapêutica de medicamentos, auxiliando no avanço de terapias personalizadas (Charalambous et al., 2023).

É importante destacar que os resultados das pesquisas comparativas sobre epilepsia em cães não apenas oferecem oportunidades para aplicação em tratamentos humanos, mas também podem melhorar o prognóstico e a qualidade de vida dos cães afetados pela doença (Patterson, 2014; Löscher, 2022).

### **2.2.3 Desafios e Limitações do Modelos Translacionais Cão**

Embora os cães sejam excelentes modelos para estudos de epilepsia, os estudos enfrentam alguns desafios metodológicos e tecnológicos, como o uso limitado de EEG e outras técnicas de neuroimagem em ambientes veterinários, o que restringe o monitoramento detalhado da atividade cerebral e a validação dos resultados (Löscher, 2022; Charalambous et al., 2023). Além disso, outras dificuldades incluem a dependência dos relatos dos tutores nos ensaios clínicos, a controvérsia quanto à terminologia utilizada, e as diferenças na

metabolização de fármacos, já que os cães metabolizam muitos medicamentos mais rapidamente que os humanos, gerando divergências farmacocinéticas entre as espécies (Löscher, 2022; Charalambous et al., 2023).

Apesar das limitações encontradas ainda sim os cães representam um excelente e emergente modelo para estudo da epilepsia translacional, as perspectivas futuras para o uso de cães como modelos translacionais na epilepsia são promissoras, especialmente no que diz respeito ao desenvolvimento de terapias de precisão e o uso de tecnologias emergentes (Löscher, 2022). A aplicação de terapias gênicas em cães, combinada com o desenvolvimento de biomarcadores eficazes em prever a resposta terapêutica em cães oferece a possibilidade de tratamentos mais eficazes e personalizados, tanto para humanos quanto para animais. Nesse contexto o cão pode representar a ponte entre o conhecimento adquirido em roedores e humanos (Charalambous et al., 2023). Assim esforços combinados de conhecimento entre neurologistas médicos e veterinários humanos são importantes para melhorar os resultados do tratamento ou até mesmo curar a epilepsia (Löscher, 2022).

### **2.3 Diagnóstico da Epilepsia idiopática (EI)**

A estratégia diagnóstica para cães com histórico de crises epiléticas, conforme recomendações da Força-Tarefa Internacional de Epilepsia Veterinária (De Risio et al., 2015) baseia-se em uma abordagem que integra dois passos fundamentais: exclusão dos principais diagnósticos diferenciais que gerem fenômenos semelhantes a crise epilética; e identificação da possível causa das crises (De Risio et al., 2015).

A distinção entre crises epiléticas e outros eventos episódicos não epiléticos é complexa, exigindo uma análise cuidadosa. Um histórico detalhado do animal, idealmente acompanhado de registros em vídeo dos eventos, é essencial para auxiliar na diferenciação entre crises epiléticas e distúrbios paroxísticos não epiléticos, como distúrbios do movimento ou síncope. Outro critério a ser considerado inclui o nível de consciência durante os episódios. Cães com distúrbios do movimento paroxístico geralmente mantêm a tentativa de realizar a atividade prévia (como brincar), e a intervenção do dono pode modificar o episódio, o que contrasta com o período ictal, especialmente em crises generalizadas. Além disso, exames físicos e neurológicos detalhados podem auxiliar a exclusão de outras alterações, tais como anormalidades do sistema cardiovascular, síncope, doenças neuromusculares, doença

vestibular e prosencefálica (De Risio et al., 2015). Cabe ainda ressaltar que a confirmação entre crises e diagnósticos diferenciais requer a observação simultânea das alterações no EEG e das crises epiléticas físicas, mas isso é pouco prático na medicina veterinária (De Risio et al., 2015), e ainda não há um protocolo padrão confiável para registros de EEG em cães (De Risio et al., 2015; Löscher, 2022).

Após a confirmação de que os eventos observados são, de fato, crises epiléticas, o passo subsequente e a identificação da etiologia e classificação das crises em crises reativas, epilepsia estrutural e idiopática (De Risio et al., 2015).

As crises reativas estão associadas a distúrbios metabólicos sistêmicos, como hipoglicemia, desequilíbrios eletrolíticos e exposição a toxinas. O histórico clínico e a apresentação do paciente podem sugerir uma etiologia específica, e ainda que o diagnóstico de algumas intoxicações possa ser desafiador estudos sugerem que a intoxicação foi responsável por 39% dos casos de crises reativas, além disso, as intoxicações estão altamente relacionadas ao desenvolvimento de *status epilepticus*. As alterações metabólicas podem apresentar-se de forma aguda, subaguda ou crônica, com um curso clínico que pode ser progressivo ou caracterizado por episódios de recorrência e remissão. Em muitos casos, anormalidades sistêmicas podem ser identificadas durante o exame físico geral, enquanto o exame neurológico pode ser compatível com comprometimento difuso, bilateral e simétrico do prosencéfalo (De Risio et al., 2015).

A epilepsia estrutural está associada a lesões no prosencéfalo, incluindo condições vasculares, inflamatórias, infecciosas, traumáticas, neoplásicas ou degenerativas. O exame neurológico dos cães frequentemente revela déficits, que são mais comumente assimétricos, embora alterações simétricas também possam ocorrer em casos de lesões cerebrais estruturais simétricas. Além disso, um exame neurológico normal não exclui a possibilidade de epilepsia estrutural, já que lesões focais em regiões do prosencéfalo, como o lobo piriforme, o lobo frontal ou o bulbo olfatório, podem estar presentes (De Risio et al., 2015).

Quando não são encontradas alterações que justifiquem as crises epiléticas, estas podem ser atribuídas à epilepsia idiopática (EI), cujo diagnóstico é realizado por exclusão, considerando a idade de início das crises, exames físicos, laboratoriais e de imagem. Dessa forma para o diagnóstico da EI a Força-Tarefa Internacional de Epilepsia Veterinária estabeleceu hierarquia de confiança dividida em três níveis de confiança (tiers) (De Risio et al., 2015).

O Tier I representa o nível inicial de confiança diagnóstica e inclui critérios mínimos que fundamentam o diagnóstico de epilepsia idiopática. Esses critérios incluem um histórico de pelo menos duas crises epiléticas não provocadas, ocorrendo com intervalo mínimo de 24 horas entre elas, a idade de início das crises entre 6 meses e 6 anos, um exame físico e neurológico interictal sem alterações significativas (exceto déficits neurológicos induzidos por FAC ou déficits pós-ictais), histórico familiar de EI, e ausência de anormalidades relevantes em testes laboratoriais, como hemograma completo, sódio, potássio, cloreto, cálcio, fósforo, alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), bilirrubina total, uréia, creatinina, proteína total e frações, glicose, colesterol, triglicerídeos, ácidos biliares em jejum e/ou amônia e urinálise (De Risio et al., 2015). Outros testes laboratoriais opcionais são indicados pelo consenso tais como sorologias, reação em cadeia da polimerase (PCR), teste de antígeno para doenças infecciosas regionais e PAS (De Risio et al., 2015).

O Tier II, ou nível de confiança intermediário, além dos critérios do Tier I inclui as avaliações de ácidos biliares em jejum e pós-prandial, ressonância magnética (RM) do cérebro e análise do líquido cefalorraquidiano (LCR). Caso haja alterações no LCR é indicado a pesquisa de doenças infecciosas locais a partir do licor. (De Risio et al., 2015). Por fim, o Tier III, o nível mais elevado de confiança diagnóstica, abrange os critérios dos níveis I e II, além da identificação de anormalidades ictais ou interictais no eletroencefalograma (EEG) (De Risio et al., 2015).

## **2.4 Tratamento da EI**

### **2.4.1 Fármacos antiepiléticos convencionais (FAC)**

O manejo da epilepsia idiopática em cães se baseia no uso de fármacos antiepiléticos convencionais (FAC), e visa reduzir a frequência, a gravidade e a duração das crises, tendo como objetivo central a qualidade de vida dos pacientes e suas famílias (Bhatti et al., 2015; Podell et al., 2016; Löscher, 2022).

Determinar o momento ideal para iniciar o tratamento com fármacos antiepiléticos (FAC) em cães com epilepsia idiopática (EI) é um desafio, devido à falta de dados conclusivos baseados em evidências (Bhatti et al., 2015). Não há diretrizes rígidas para o início da terapia, que deve ser adaptada às necessidades individuais do cão e ao estilo de vida da família (Bhatti

et al., 2015). Estudos recomendam o início do tratamento a longo prazo nas seguintes situações: quando o intervalo entre crises for igual ou inferior a seis meses; na ocorrência de crises agrupadas ou *status epilepticus*; quando os sinais pós-ictais forem severos, como agressividade ou cegueira, ou durarem mais de 24 horas; quando houver aumento na frequência, duração ou gravidade das crises ao longo de três períodos interictais (Bhatti et al., 2015; Podell et al., 2016).

Quanto a escolha do FAC a ser utilizado também não há diretrizes baseadas em evidências, o consenso recomenda que a escolha seja feita caso a caso (Bhatti et al., 2015; Podell et al., 2016), e fortemente deve levar em consideração a tolerabilidade dos cães (Podell et al., 2016). Tradicional o fenobarbital e brometo de potássio são considerados FAC de primeira linha (Bhatti et al., 2015), entretanto isso pode variar a depender da legislação de cada país (Löscher, 2022), no Reino Unido, por exemplo, o brometo de potássio só é aprovado como tratamento complementar em cães resistentes ao fenobarbital e a imepitoína (Bhatti et al., 2015; Löscher, 2022). Nos EUA, apenas a primidona é aprovado (Löscher, 2022). Nesse cenário, o fenobarbital continua sendo amplamente recomendado como primeira linha de tratamento na maioria das regiões, devido à sua eficácia no controle das crises e ao seu custo acessível (Löscher, 2022).

O fenobarbital é considerado seguro, sendo utilizado de maneira eficaz em até 93% dos casos, desde que suas concentrações plasmáticas sejam mantidas dentro da faixa terapêutica de 25 a 35 mg/L (Bhatti et al., 2015). Estudos comparativos demonstram sua superioridade em relação ao brometo de potássio como monoterapia, resultando em melhor controle das crises e menos efeitos adversos. Apresenta uma meia-vida longa, permitindo a administração em duas doses diárias, com dose inicial de 2,5 (Bhatti et al., 2015; Podell et al., 2016) a 3 mg/kg (Podell et al., 2016). Os efeitos adversos, dose-dependentes, manifestam-se principalmente no início da terapia ou após ajustes de dosagem e incluem, sedação, ataxia, polifagia, polidipsia e poliúria, que tendem a diminuir conforme o desenvolvimento de tolerância (Bhatti et al., 2015).

O brometo de potássio (KBr) é principalmente utilizado como terapia adjuvante ao fenobarbital (Bhatti et al., 2015; Podell et al., 2016). Embora seja menos eficaz e menos tolerável que o fenobarbital em monoterapia, pode ser uma alternativa eficaz para cães com contraindicações ao fenobarbital. A dose inicial de brometo de potássio (KBr) é de 15 mg/kg duas vezes ao dia quando usado como adjuvante, enquanto em monoterapia recomenda-se 20 mg/kg duas vezes ao dia (Bhatti et al., 2015; Podell et al., 2016) ou 40 mg / kg / dia Podell et al., 2016). Os efeitos adversos incluem sedação, ataxia, paraparesia, polifagia, poliúria e

olidipsia, ganho de peso, as reações mais graves que podem ocorrer inclui pancreatite e distúrbios gastrointestinais (Bhatti et al., 2015).

O levetiracetam é outro fármaco que pode ser utilizado como tratamento adjuvante (Bhatti et al., 2015), embora seja frequentemente empregado como terapia de primeira linha nos EUA (Löscher, 2022). Com metabolismo hepático mínimo, torna-se uma opção adequada para cães com disfunção hepática, além de ser bem tolerado e apresentar poucos efeitos adversos, como sedação leve, ataxia, perda de apetite e vômitos, que são raramente observados (Bhatti et al., 2015). Contudo, sua curta meia-vida de eliminação, de 3 a 6 horas, exige uma administração frequente, com a dose de manutenção oral recomendada de 20 mg/kg, administrada de três a quatro vezes ao dia (TID-QID) (Bhatti et al., 2015; Podell et al., 2016).

Além do fenobarbital, brometo de potássio, levetiracetam e imepitoína, outros fármacos, como zonisamida, felbamato, gabapentina e pregabalina, podem ser utilizados. No entanto, os estudos disponíveis não apresentam um nível de evidência suficiente para garantir sua recomendação como fármacos adjuvantes em cães (Bhatti et al., 2015).

#### **2.4.2 Monitoramento dos cães sob uso dos FAC**

O sucesso no manejo de cães epiléticos está diretamente ligado ao monitoramento adequado das concentrações séricas dos FAC, combinado com ajustes individualizados nas doses (Bhatti et al., 2015), com o objetivo de identificar falhas terapêuticas e prevenir toxicidade (Podell et al., 2016). De modo geral, recomenda-se realizar exames laboratoriais a cada seis meses, e anualmente para cães que estejam livres de crises (Bhatti et al., 2015).

Especificamente os cães que fazem o uso do fenobarbital devem ser monitorados quanto às concentrações séricas 14 dias após o início da terapia e, se estiverem dentro da faixa terapêutica, normalmente entre 25-30 mg/L, uma nova dosagem deve ser realizada após 6 semanas. Além disso, é recomendado realizar hemograma, perfil bioquímico, colesterol, triglicerídeos e ácidos biliares aos 3 e 6 meses de tratamento, e, posteriormente, a cada 12 meses para cães que apresentarem remissão das crises (Bhatti et al., 2015).

Quanto ao uso do brometo de potássio os cães devem ser monitorados quanto às concentrações séricas 90 dias após o início da terapia e, se estiverem dentro da faixa terapêutica, uma nova dosagem deve ser realizada a cada 6 meses durante o tratamento. Além disso é

recomendado realizar hemograma, perfil bioquímico, colesterol, triglicerídeos, e dosagem a cada 6 meses de tratamento, e a cada 12 meses para cães que sem crises epiléticas (Bhatti et al., 2015).

Avaliações frequentes dos efeitos adversos também devem ser consideradas, utilizando questionários padronizados e avaliações laboratoriais que possibilitem a comparação ao longo do tratamento com os FAC (Potschka et al., 2015). Estudos em humanos indicam que, mesmo com a introdução de FAC de terceira geração, os efeitos adversos continuam a impactar negativamente a qualidade de vida de cerca de 40% dos indivíduos com epilepsia. De forma semelhante, Hamers e colaboradores (2023) relataram que os FAC também acarretam efeitos adverso significativos, prejudicando a qualidade de vida dos cães e de seus tutores.

A avaliação da função tireoidiana também deve ser considerada, pois tanto a epilepsia quanto os fármacos antiepiléticos (FAC) podem causar alterações na glândula, o que, por sua vez, pode afetar a condição geral dos cães, impactando seu comportamento e massa corporal (Potschka et al., 2015).

Sabe-se também que pacientes epiléticos podem desenvolver anormalidades cardiovasculares secundárias a epilepsia (Liu et al., 2023; Trevisan, 2024) e aos FAC, particularmente os indutores de enzimas e moduladores de canais de sódio (Liu et al., 2023). Em humanos a epilepsia está associada a um risco aumentado de problemas cardiovasculares, incluindo hipertensão, alterações cardíacas estruturais e funcionais, que contribuem para a mortalidade precoce (Liu et al., 2023). Crises epiléticas recorrentes, especialmente as tônico-clônica causam estresse cardiovascular e isquemia, o que pode resultar em danos miocárdicos agudos ou crônicos, especialmente decorrente da liberação excessiva de catecolaminas e da hipoxemia durante as crises, levando a disfunções elétricas e mecânicas no coração (Liu et al., 2023; Trevisan, 2024).

Está bem estabelecido que pacientes humanos com epilepsia apresentam um risco elevado de alterações no ritmo cardíaco (Elnawasany, 2023; Liu et al., 2023; Asadollahi, 2019), no entanto, há poucas informações disponíveis sobre a relação entre a epilepsia idiopática em cães e a ocorrência de hipertensão ou distúrbios no ritmo cardíaco (Trevisan, 2024). Musteata e colaboradores (2017) observaram aumentos significativos na dispersão da onda P e no intervalo QT corrigido em cães com epilepsia idiopática. Um estudo recente com 21 cães, dos quais 10 foram diagnosticados com epilepsia idiopática (EI) e 11 eram saudáveis, revelou diferenças significativas nos valores do complexo QRS e do intervalo S-T entre o grupo

epiléptico e o não epiléptico. Além disso, os valores de pressão arterial diastólica, pressão arterial sistólica (PAS) e pressão arterial média foram maiores no grupo epiléptico, embora não tenham alcançado significância estatística. Com base nesses resultados, o estudo sugere a necessidade de monitoramento cardíaco contínuo em cães epilépticos (Trevisan et al., 2024). Apesar de haver muitos estudos em humanos quanto ao assunto, ainda permanece uma lacuna na caracterização das alterações específicas que ocorrem na estrutura e função cardíaca em indivíduos com epilepsia (Liu et al., 2023).

### 2.4.3 Limitações dos FAC

As opções de FAC disponíveis na medicina veterinária são limitadas (Podell et al., 2016; Chen et al., 2018), em contraste com a ampla quantidade de medicamentos na medicina humana (Podell et al., 2016; Chen et al., 2018; Löscher, 2022). Nesse contexto, alguns autores sugerem que, diante da refratariedade aos poucos FAC disponíveis, o uso de fármacos destinados a humanos pode ser uma alternativa viável. No entanto, algumas considerações precisam ser tomadas, visto que essa prática ainda carece de evidências para ser amplamente adotada (Bhatti et al., 2015; Potschka et al., 2015; Löscher, 2022). Muitos FAC utilizados na medicina humana apresentam uma meia-vida muito curta quando administrados em cães (Löscher, 2022; Potschka et al., 2015), além disso, nem todos são seguros, e alguns podem ser tóxicos para essa espécie (Löscher, 2022).

A terapia combinada em cães apresenta desafios, uma vez que os fármacos atualmente licenciados, como fenobarbital, brometo de potássio e imepitoína, agem predominantemente sobre a modulação da neurotransmissão via ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA). Em humanos, no entanto, o manejo da epilepsia frequentemente emprega uma associação de medicamentos com mecanismos de ação distintos, ampliando as abordagens terapêuticas (Löscher, 2022).

Embora existam diretrizes baseadas em evidências que abordam o início, a modificação ou a combinação de medicamentos antiepilépticos em cães com epilepsia idiopática (Bhatti et al., 2015; Podell et al., 2016), essas orientações não são voltadas especificamente para o manejo de epilepsias farmacorresistentes e de difícil controle (Potschka et al., 2023).

Dada a restrição no número de fármacos licenciados para o manejo da epilepsia em cães, é imperativo que esforços sejam sustentados e intensificados no sentido de identificar e validar

novas abordagens terapêuticas, tanto farmacológicas quanto não farmacológicas, visando expandir o leque de opções terapêuticas disponíveis para esses pacientes (Potschka et al., 2023).

## 2.5 Peptídeos

### 2.5.1 Contexto da terapia com peptídeos

Os peptídeos são cadeias de 2 a 50 aminoácidos unidos por ligações peptídicas, que desempenham funções biológicas fundamentais para praticamente todos os processos bioquímicos e biológicos, atuando como hormônios, neurotransmissores, fatores de crescimento, ligantes de canais iônicos, dentre outras funções (Collina et al., 2023; Forbes e Krishnamurthy, 2023). Conforme os aminoácidos ou a sequência dos aminoácidos são manipulados em laboratório, peptídeos bioativos ou bionspirados específicos podem ser desenvolvidos, com potencial significativo para a indústria farmacêutica e para o desenvolvimento de produtos biológicos com finalidades terapêuticas (Forbes e Krishnamurthy, 2023).

A natureza das ligações peptídicas, referida por alguns autores como “blocos de construção”, fornecem aos peptídeos versatilidade para imitação sintética (Forbes e Krishnamurthy, 2023) e manipulação dos aminoácidos com a finalidade de que possam exercer funções celulares específicas (Wang et al., 2022).

Historicamente a pesquisa sobre peptídeos terapêuticos teve início com estudos em hormônios humanos naturais, como insulina, ocitocina, vasopressina e hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) (Wang et al., 2022). A insulina, desenvolvida em 1921, foi o primeiro peptídeo terapêutico (Wang et al., 2022; Collina et al., 2023), e já em 1923 se tornou disponível comercialmente, proporcionando benefícios duradouros para inúmeros pacientes diabéticos até os dias de hoje (Wang et al., 2022).

No século 20, importantes descobertas de peptídeos bioativos ocorreram, e no século 21 o desenvolvimento de medicamentos a partir de peptídeos foi impulsionado pelos avanços na biologia estrutural, biológicos recombinantes e inovações tecnológicas nos campos da síntese e da análise, o que acelerou substancialmente o processo de desenvolvimento de fármacos baseados em peptídeos (Wang et al., 2022).

Desde 2000, 33 medicamentos peptídicos não insulínicos foram aprovados mundialmente, e atualmente (Wang et al., 2022), mais de 80 medicamentos à base de peptídeos

já receberam aprovação global (Wang et al., 2022; Collina et al., 2023), com mais de 170 em desenvolvimento. Comercialmente, os peptídeos terapêuticos exercem um impacto significativo no mercado farmacêutico, com vendas que ultrapassaram US\$ 70 bilhões em 2019 (Wang et al., 2022). Em 2022, eles corresponderam a 5% do mercado farmacêutico mundial, com um valor estimado de US\$ 42,05 bilhões (Collina et al., 2023).

Os estudos sobre peptídeos terapêuticos tiveram início com o desenvolvimento de "imitadores" de hormônios e outros compostos de aminoácidos naturais. No entanto, com o avanço das pesquisas, especialmente no campo do design racional de peptídeos, tornou-se possível otimizar suas estruturas para desempenharem atividades bioquímicas e fisiológicas específicas e desejáveis (Wang et al., 2022; Collina et al., 2023).

### **2.5.2 Aplicabilidade**

Pesquisas indicam que os peptídeos bioativos ou bioinspirados desempenham múltiplos papéis, demonstrando eficácia devido à sua alta especificidade e afinidade pelos seus alvos biológicos, podendo desencadear efeitos terapêuticos potentes e específicos, desde a redução da pressão arterial a propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias (Wang et al., 2022; Collina et al., 2023). Os peptídeos podem atuar como hormônios, fatores de crescimento, neurotransmissores, ligantes de canais iônicos ou agentes anti-infecciosos, sendo aplicados no tratamento de diversas doenças, como diabetes mellitus, doenças cardiovasculares, gastrointestinais, câncer, infecções, além de serem utilizados no desenvolvimento de vacinas e no tratamento da dor (Wang et al., 2022; Forbes e Krishnamurthy, 2023).

### **2.5.3 Vantagens e desvantagens**

Entre as principais vantagens dos peptídeos terapêuticos está a capacidade de se ligarem a receptores na superfície celular, desencadeando efeitos intracelulares com elevada afinidade e especificidade, de maneira similar aos biológicos (Wang et al., 2022). Devido a esta elevada especificidade aos seus alvos, os peptídeos em geral apresentam poucos efeitos adversos, além disso seus metabólitos em geral não são tóxicos e as interações metabólicas, como a inibição do citocromo P450, ocorrem com menor frequência (Collina et al., 2023). Assim apresentam

menor imunogenicidade em relação aos biológicos e possuem custos de produção significativamente mais baixos (Wang et al., 2022).

Os peptídeos enfrentam duas grandes desvantagens: baixa permeabilidade à membrana celular e limitada estabilidade *in vivo*. De maneira geral, não conseguem transpor a membrana plasmática para atingir alvos intracelulares, o que restringe seu espectro de aplicação terapêutica. Como consequência, mais de 90% dos peptídeos em desenvolvimento são direcionados exclusivamente a alvos extracelulares (Wang et al., 2022). A baixa estabilidade *in vivo* é consequência da ausência de estruturas secundárias ou terciárias, já que são formados por cadeias de aminoácidos unidas por ligações amida, facilmente hidrolisadas por enzimas. Isso os torna instáveis, com curta meia-vida e rápida eliminação (Wang et al., 2022; Collina et al., 2023). Ryan e colaboradores (2013) referiram que a meia vida do peptídeo exenatide em humanos é de 2,4 horas, necessitando da administração por via SC, duas vezes ao dia. Outro estudo referiu a meia vida do exenatide de até 4 h em camundongos, após a administração subcutânea (Parkes et. al., 2001). Ademais, devido à rápida eliminação, o uso oral dos peptídeos é um desafio, o que leva à sua administração predominantemente por via parenteral; no entanto, inovações nas formas de administração estão sendo desenvolvidas, incluindo as vias nasais e transdérmicas (Collina et al., 2023). Além disso esforços em pesquisa têm focado na otimização desses compostos, com avanços na biologia molecular, química e em tecnologias de entrega, visando superar essas limitações.

#### **2.5.4 Uso de peptídeos em cães**

Em cães, informações sobre o uso, metabolismo, doses e intervalos de administração de peptídeos, bem como outras informações são escassos (Parkes et. al., 2001; Ionut et. al., 2008; Ryan et. al., 2013; Ionut et. al., 2016).

Dentre os peptídeos descritos está o exenatide, um agonista do receptor do peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1) usado principalmente no tratamento do diabetes mellitus tipo 2 (Wang et. al., 2022; Ionut et. al., 2016). Ionut e colaboradores (2016) avaliou os efeitos do peptídeo exenatide no metabolismo da glicose e na sensibilidade à insulina em modelos caninos, utilizando a dose de 10 µg/cão, por via subcutânea, duas vezes ao dia durante os dias da semana, e a dose de 10 µg/cão, por via subcutânea, uma vez ao dia durante os fins de semana por 12 Semanas, e não foram descritos efeitos adversos para a dose utilizada. Em outro com oito cães, tratados com o peptídeo exenatide, na dose de 20 µg/dose (dose máxima para humanos),

por via subcutânea, os autores referiram que o peptídeo foi bem tolerado pelos cães, sem apresentar efeitos adversos (Ionut et. al., 2008).

Outro estudo avaliou os efeitos do peptídeo natriurético cerebral recombinante em seis cães da raça Foxhound, com o objetivo de examinar sua ação na oxigenação seletiva da microvasculatura gástrica. Os resultados indicaram um aumento significativo na oxigenação da hemoglobina microvascular da mucosa gástrica de forma seletiva, ou seja, sem provocar alterações hemodinâmicas sistêmicas concomitantes (Schwarte et. al., 2012).

## **2.6 Derivados de Peçonha e Neurovespina**

### **2.6.1 Contexto dos peptídeos derivados de peçonhas**

Toxinas derivadas da peçonha tem sido explorada desde os tempos antigos como fonte terapêutica em diversas culturas ao redor do mundo (Yang et al., 2019). Essas moléculas possuem uma diversidade de aplicações, desde o uso como agentes terapêuticos até sua aplicação na agricultura (Smallwood e Clark, 2022). As peçonhas ou venenos de animais, através da evolução e da seleção natural, desenvolveram uma variedade de atividades farmacológicas (Yang et al., 2019; Smallwood e Clark, 2022), fornecendo alta especificidade (eficácia em subtipos de receptores e canais iônicos localizados nas membranas celulares) e considerável diversidade molecular (Yang et al., 2019). Além disso, a potência e alta especificidade dessas toxinas as tornaram uma fonte importante de produtos naturais para o uso terapêutico em várias doenças (Yang et al., 2019).

Conceitualmente, a peçonha é um composto de substâncias, que inclui sais inorgânicos, pequenas moléculas, proteínas e em sua maior fração peptídeos (Smallwood e Clark, 2022). Entre as peçonhas mais estudadas estão os de caracóis, escorpiões, aranhas e serpentes (Smallwood e Clark, 2022). Em 1981, o fármaco captopril foi desenvolvido a partir de um peptídeo isolado da peçonha da serpente brasileira *Bothrops jararaca* (Yang et al., 2019; Smallwood e Clark, 2022) e aprovado nos EUA para uso humano, marcando uma descoberta importante para o avanço das pesquisas em medicamentos derivados de toxinas (Yang et al., 2019). Atualmente, há muitos peptídeos derivados de peçonha em desenvolvimento clínico e pré-clínico, abrangendo desde anti-hipertensivos até analgésicos potentes (Yang et al., 2019; Smallwood e Clark, 2022), alguns dos quais possuem a capacidade de atravessar a barreira

hematoencefálica e atingir tecidos profundos, como tumores, a exemplo da clorotoxina (Smallwood e Clark, 2022).

### 2.6.2 Neurovespina

Em 2005, iniciou-se uma investigação em Ribeirão Preto, SP, com o objetivo de explorar novas opções farmacológicas utilizando a peçonha bruta e desnaturado da vespa social *Polybia occidentalis* (Figura 1 e 2). O estudo visou identificar e caracterizar compostos com potencial atividade antiepiléptica e antinociceptiva. Para isso, crises epiléticas foram induzidas em ratos por meio de agentes químicos, e observou-se proteção significativa contra essas crises após a administração intracerebroventricular (i.c.v.) da peçonha desnaturada (Mortari et al., 2005).

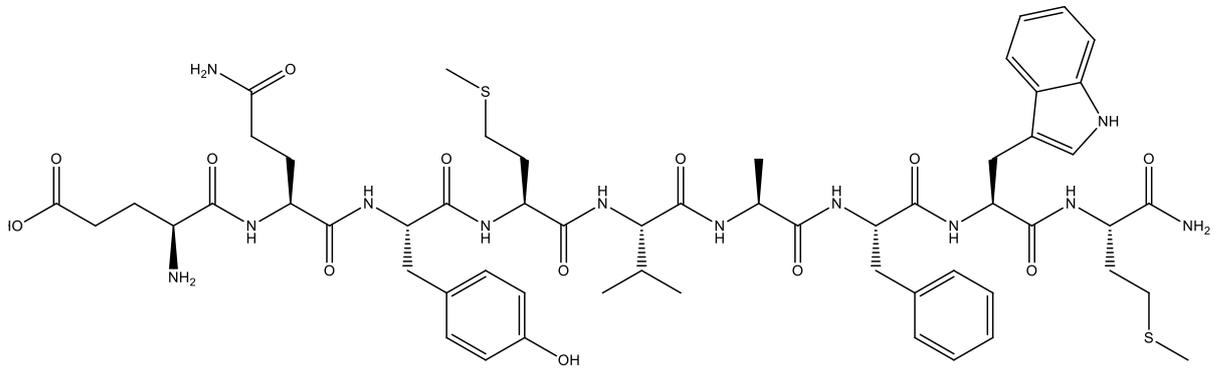


**Figura 1** - Imagem ilustrativa da vespa social *Polybia occidentalis*. Disponível em: <https://www.inaturalist.org/observations/102093920>.



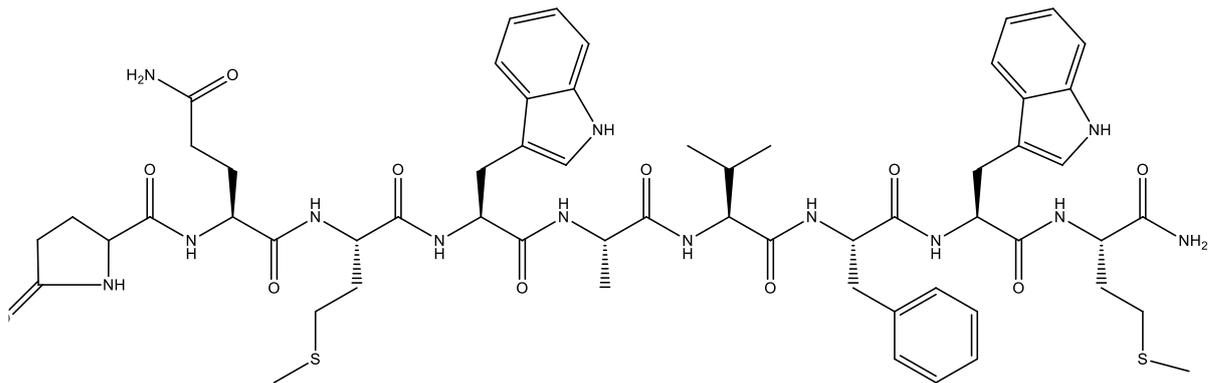
**Figura 2** - Colônia de vespa social *Polybia occidentalis*: Fonte: <https://www.inaturalist.org/observations/102093920>.

Com base nos resultados de Mortari e colaboradores (2005), outro estudo subsequente caracterizou estruturalmente um novo peptídeo neuroativo derivado da peçonha, denominado occidentalina-1202 (OcTx-1202) (Mortari et al., 2007). O estudo que identificou a OcTx-1202 inclui o isolamento e purificação do peptídeo e avaliação em modelos agudos e crônicos de epilepsia, juntamente com análise histopatológica, investigação de efeitos adversos e estudos sobre o mecanismo de ação em receptores cainatos. Os resultados demonstraram um potencial promissor da OcTx-1202 no tratamento da epilepsia, evidenciando sua capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE), além de exibir efeitos antiepilépticos potentes em modelos agudos e crônicos, efeito neuroprotetor significativo e uma interação com receptores glutamatérgicos tipo cainato (Mortari et al., 2023).



**Figura 3** - Representação da fórmula estrutural do peptídeo Occidentalina-1202, destacando a organização dos grupos funcionais e a sequência específica de aminoácidos. Fonte: Dos Anjos (2017).

Visando aprimorar a eficiência, a biodisponibilidade e a estabilidade do peptídeo Occidentalina-1202, bem como potencializar seu efeito antiepiléptico, foi desenvolvido um novo peptídeo denominado Neurovespina (Dos Anjos, 2013). Enquanto a Occidentalina-1202 possui a sequência Glu-Gln-Tyr-Met-Val-Ala-Phe-Trp-Met-NH<sub>2</sub> (Figura 3), o peptídeo Neurovespina foi estruturado com a seguinte sequência: PyrGlu-Gln-Met-Trp-Ala-Val-Phe-Trp-Met-NH<sub>2</sub> (Figura 4) (Dos Anjos, 2013). Em 2014, o composto foi patenteado sob o título: “Peptídeo modificado da peçonha de vespa social e seu uso como antiepiléptico e neuroprotetor”, registrado com o número BR1020140047280.



**Figura 4 - Fórmula estrutural do peptídeo Neurovespina:** com massa molecular de 1208,53, composta por nove resíduos de aminoácidos: E-Q-M-W-A-V-F-W-M (Campos, 2016).

A NV foi inicialmente avaliada em um modelo agudo de crises epilépticas induzidas pelo ácido caínico, um agente epiléptico padrão. No estudo, a NV demonstrou efeito protetor significativo quando administrada por via intraperitoneal (i.p.), alcançando cerca de 100% de proteção contra crises máximas na dose de 4 mg/kg, e a administração intracerebroventricular (i.c.v) exibiu um efeito neuroprotetor aproximadamente seis vezes mais potente do que o efeito observado por Mortari (2007) ao utilizar a o composto original. Além disso, o tratamento com Neurovespina promoveu uma redução acentuada na expressão da proteína c-Fos no hipocampo, um marcador relacionado à excitabilidade mediada pelo glutamato, sugerindo um possível efeito neuroprotetor do peptídeo (Dos Anjos, 2013).

Com o objetivo de ampliar o conhecimento sobre a Neurovespina, utilizou-se um modelo crônico de epilepsia do lobo temporal por indução de *status epilepticus* após insulto por pilocarpina com o objetivo de avaliar seu potencial antiepiléptico, neuroprotetor e a toxicidade aguda em camundongos *Swiss*. No estudo, a NV reduziu a frequência, duração e gravidade das crises espontâneas e recorrentes em todas as doses testadas. A ação do peptídeo foi avaliada tanto durante o período latente quanto na fase de crises recorrentes, evidenciando um efeito protetor em ambas as etapas do modelo experimental. Além disso para quantificar a presença de neurônios na formação hipocampal após o tratamento, foi realizada análise de densidade neuronal, a qual revelou diferenças significativas em todas as regiões analisadas na dose de 8 mg/kg, em comparação com os animais epilépticos tratados com solução salina (grupo sadio). Esses resultados indicam que a NV pode ter atenuado a neurodegeneração nas regiões

hipocampais avaliadas, que ocorrem predominantemente da fase latente da epileptogênese (Dos Anjos, 2017).

O efeito neuroprotetor da NV também foi investigado em um modelo murino de parkinsonismo, onde camundongos receberam uma infusão unilateral da neurotoxina 6-OHDA no estriado, região dos núcleos da base associada ao controle motor, induzindo a degeneração dos neurônios dopaminérgicos da substância negra; os animais foram tratados com três doses de NV nas 24, 48 e 72 horas subsequentes ao insulto, mostrando melhora significativa no desempenho motor em todas as doses, com destaque para a dose de 4 mg/kg, que se mostrou eficaz na proteção dos neurônios dopaminérgicos da substância negra (Campos, 2016).

Com base nos efeitos observados em ambos os modelos de degeneração, Campos (2016) destacou a necessidade de aprofundar a investigação sobre o mecanismo de ação e os alvos moleculares da NV. Assim em 2020, Campos (2020) explorou o mecanismo de ação da NV e demonstrou que a NV atua nos canais de cálcio tipo 1.2, reduzindo o influxo de cálcio e, conseqüentemente, a excitabilidade neuronal. Além disso, outras possibilidades incluem a afinidade da NV por receptores glutamatérgicos do tipo cainato e a diminuição dos potenciais excitatórios pós-sinápticos, especialmente pela modulação do glutamato (Campos, 2020).

Os efeitos adversos e a segurança farmacológica da NV foram avaliados em ensaios com doses agudas e crônicas, seguindo as diretrizes da ANVISA, em camundongos Swiss (Dos Anjos, 2017) e primatas não-humanos (dados não publicados). Em camundongos, uma dose única de até 12 mg/kg, equivalente a três vezes a dose efetiva, não demonstrou danos à linhagem eritrocitária, nem alterações cromossômicas nos eritrócitos, e todos os parâmetros hematológicos avaliados permaneceram sem alterações estatisticamente significativas, confirmando a ausência de toxicidade e a segurança do peptídeo. Para avaliar possíveis alterações comportamentais, as doses de 4 mg/kg, 8 mg/kg e 12 mg/kg foram administradas por via intraperitoneal, e os resultados, obtidos por meio do teste de campo aberto, não indicaram diferenças significativas em relação ao grupo sadio que recebeu apenas o veículo (Dos Anjos, 2017).

Até o momento, a NV foi testada em modelos agudos e crônicos de epilepsia (Dos Anjos, 2013; Dos Anjos, 2017) e parkinsonismo (Campos, 2016). Estudos estão sendo conduzidas para investigar a atividade anti-inflamatória e antiapoptótica da NV em modelos de epilepsia do lobo temporal (dados não publicados). Além disso, sabe-se que muitos FAC interagem com canais iônicos fundamentais para a excitabilidade neuronal e cardíaca, o que

pode resultar em efeitos adversos no sistema cardiovascular, incluindo arritmias e alterações no ECG (Shah, 2010; Liu et al., 2023; Trevisan, 2024). Por essa razão, algumas pesquisas estão sendo conduzidas para avaliar o potencial da NV em modular o sistema cardiovascular, incluindo cardiotoxicidade (dados não publicados), uma vez que Campos (2020) sugere que o peptídeo atue nos canais de cálcio voltagem-dependentes, o que em teoria poderia influenciar a fisiologia cardíaca.

As principais limitações da NV, comuns à maioria dos peptídeos, incluem a curta meia-vida e a necessidade de administração parenteral. Com o intuito de aprimorar a entrega e a disponibilidade do fármaco, sabe-se que a nanotecnologia pode ser uma ferramenta essencial para adaptar as vias de administração e otimizar sua eficácia, aumentando, assim, a biodisponibilidade do composto (Saatkamp, 2019; Porto, 2020; Marques, 2024). Diferentes tipos de nanocarreadores têm mostrado a capacidade de melhorar o perfil de liberação dos medicamentos, possibilitando seu direcionamento ao local específico para garantir a máxima segurança e eficácia terapêutica (Marques, 2024). Nesse contexto, com o objetivo de otimizar a biodisponibilidade e o perfil farmacocinético da NV, um estudo investigou a atividade antiepiléptica e o mecanismo de ação do peptídeo associado à nanotecnologia, em um modelo crônico de epilepsia do lobo temporal, sugerindo um possível aumento da eficácia terapêutica do peptídeo, preservando a segurança farmacológica e conclui que a NV associada à nanotecnologia pode tornar o tratamento mais eficaz e confortável para a epilepsia farmacorresistente (Marques, 2024). Além disso, sabe-se que a técnica de glicosilação pode melhorar a biodisponibilidade e o perfil farmacocinético de peptídeos. Assim, estudos têm investigado o efeito antiepiléptico da NV glicosilada em modelos agudos de crises epilépticas (dados não publicados).

### **3 OBJETIVO**

#### **3.1 Objetivo Geral:**

- Avaliar o efeito antiepiléptico da NV associada a fármacos antiepilépticos convencionais (FAC) em cães com epilepsia idiopática farmacorresistente, em um período mínimo de seis meses.

#### **3.2 Objetivo Específicos:**

- Avaliar o efeito antiepiléptico do peptídeo administrado por via subcutânea, por meio de relatórios quinzenais sobre a frequência e características das crises epiléticas apresentadas pelos cães do estudo.
- Avaliar a adesão dos tutores ao regime de administração subcutânea, realizado a cada 8 horas.
- Verificar possíveis efeitos adversos do peptídeo e interações medicamentosas por meio de avaliações clínicas e neurológicas, complementadas por relatórios quinzenais fornecidos pelos tutores.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

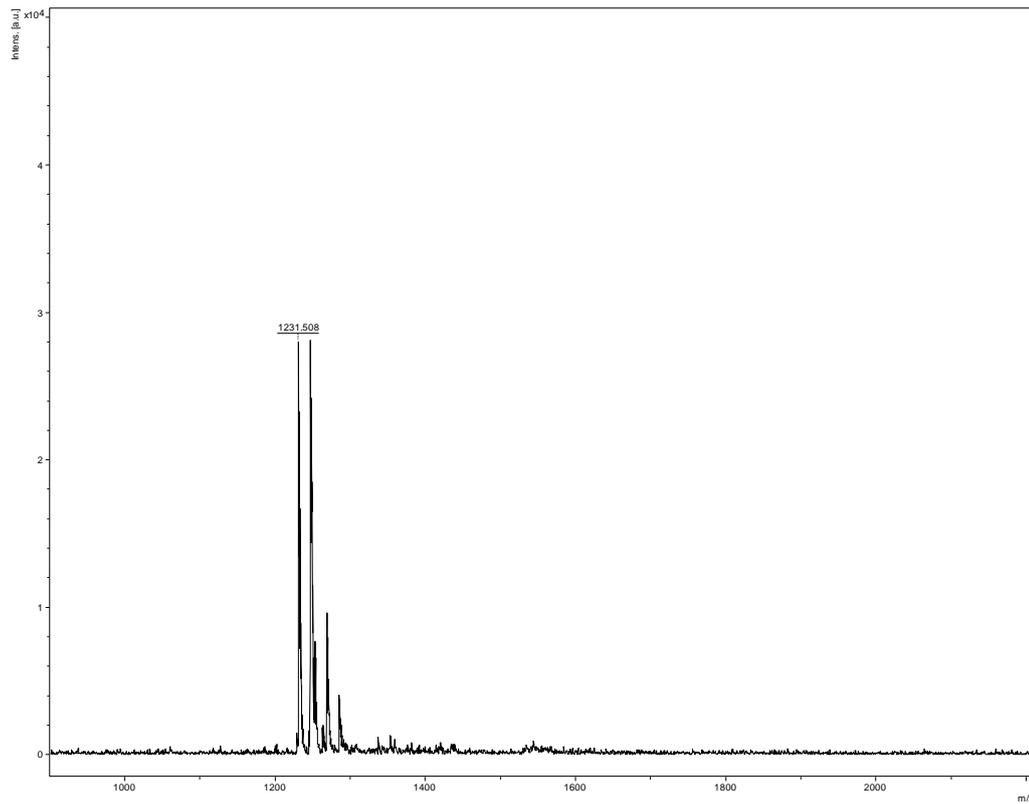
### 4.1 Critérios éticos e desenho do estudo

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA UnB, protocolo nº. 010/2020, Anexo I), e todas as condutas clínicas foram realizadas com a autorização prévia dos responsáveis legais e obtida através da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo II). A pesquisa foi delineada como estudo epidemiológico de ensaio clínico controlado, e ocorreu em Brasília, Brasil, durante o período de janeiro de 2020 a novembro de 2024.

### 4.2 Síntese e avaliação do grau de pureza do peptídeo Neurovespina

O peptídeo denominado neurovespina (NV) utilizado no estudo foi sintetizado pela empresa Biointech Biotecnologia LTDA<sup>®</sup>, utilizando a técnica de síntese em fase sólida – Fmoc. A confirmação do grau de pureza, a inspeção da massa monoisotópica e a confirmação da sequência do peptídeo foram realizadas antes do início dos experimentos, pela empresa responsável (dados não publicados). Além disso, alíquotas do peptídeo foram submetidas às análises citadas a cada seis meses a fim de monitorar e garantir a estabilidade do composto em estudo.

As análises de estabilidade foram realizadas por espectrometria de massa MALDI TOF/TOF UltraFlex II (Bruker Daltonics<sup>®</sup>, Alemanha) após uma alíquota do peptídeo ser ressuspendida em água deionizada e misturada a uma matriz pronta de ácido  $\alpha$ -cyano-4-hidroxi-cinâmico em acetonitrila e água deionizada com 3% de ácido trifluoracético, 5/4/1, v/v/v. Essa mistura foi aplicada em triplicata em uma placa Bruker MTP Massive 384, seca à temperatura ambiente e analisada. O espectrômetro de massa estava equipado com laser SmartBeam e foram empregados dois modos de operação: o refletido positivo, para a obtenção de espectros de MS, e o LIFT, para a obtenção de espectros de MS/MS (Figura 5). A faixa de detecção da razão massa/carga ( $m/z$ ) foi de 600 a 3000 e a calibração foi realizada com a mistura Peptide Calibration Standard I (Bruker Daltonics<sup>®</sup>, Alemanha). Para análise, utilizamos o software FlexControl 3.0 (Bruker Daltonics, Leipzig, Germany). O frasco contendo o peptídeo NV, devidamente preparado para administração nos cães, está ilustrado na Figura 6.



**Figura 5** - Espectro de massas da neurospina demonstrando a presença do peptídeo ( $M+H = 1231.58$ ).



**Figura 6** - Frasco contendo o peptídeo NV, devidamente preparado para administração nos cães.

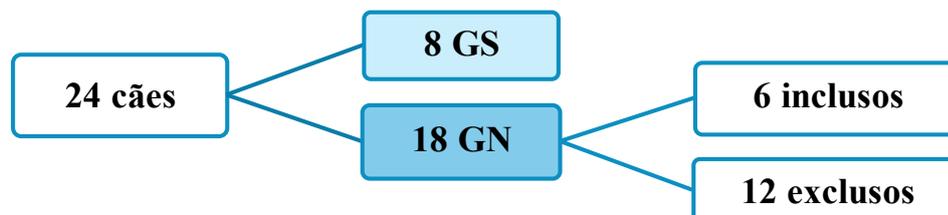
### 4.3 Padronização de dose e frequência de administração

Para estabelecer a dose e frequência terapêutica da NV em cães, foi realizada uma análise de dados pré-existentes sobre segurança farmacológica, efeitos adversos, doses e metabolismo da NV e outros peptídeos em diversas espécies. Ensaio em primatas não-humanos (*Callithrix penicillata*) e camundongos *Swiss* foram conduzidos de acordo com as normas da ANVISA, utilizando doses de 120 e 240 µg/animal para primatas e de 1 a 12 mg/kg (30 a 360 µg/animal) para camundongos, administradas por via intraperitoneal.

Baseado na meia-vida do peptídeo observada em camundongos, e em extrapolações alométricas de dados de estudos com outros peptídeos, como o exenatide (Parkes et al., 2001; Ionut et. al., 2008; Ryan et. al., 2013; Ionut et. al., 2016), uma dose inicial para cães foi sugerida em 150 a 200 µg/cão, administrada por via subcutânea a cada 8 horas. Esta dose foi testada inicialmente em um cão piloto durante 71 semanas sem efeitos adversos, e posteriormente aplicada a outros cães no estudo.

### 4.4 Seleção dos animais – Grupos amostrais

Durante o período de janeiro de 2020 a agosto de 2024, foram selecionados 24 cães procedentes de clínicas veterinárias particulares (Hospital veterinário Vet Help e Centro integrado de medicina veterinária CVET) e do Hospital Veterinário da Universidade de Brasília. Dos 24 cães, oito foram incluídos no grupo sadio destinado à avaliação de efeitos adversos agudos (GS), enquanto 18 foram alocados no grupo de cães epiléticos tratados com Neurovespina (GN). Entretanto, apenas seis desses 18 cães atenderam aos critérios mínimos exigidos para inclusão na pesquisa (Figura 7).



**Figura 7** - Representa a seleção dos 24 cães avaliados, sendo 8 alocados ao grupo sadio (GS) e 18 ao grupo tratado (GN). Após a aplicação dos critérios de inclusão, apenas 6 cães do grupo GN foram utilizados para as coletas de dados.

#### 4.4.1 Grupo sadio (GS)

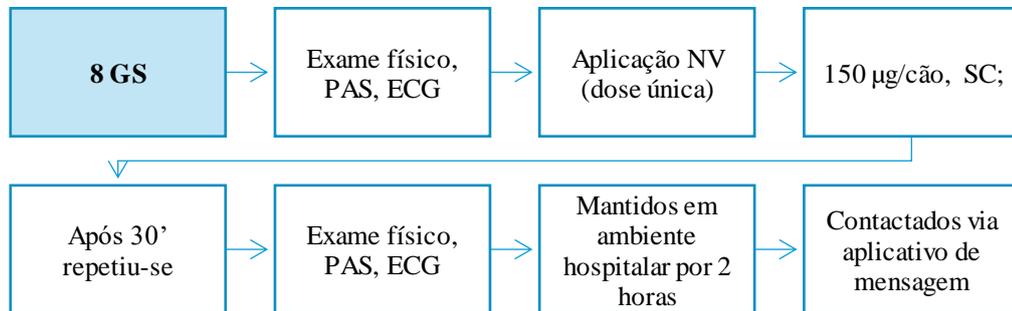
O grupo sadio foi composto por oito cães clinicamente saudáveis, sem histórico de crises epiléticas ou outras comorbidades, exame neurológico sem alterações, com idade variando entre seis meses a oito anos, sem critérios para escolha de raças e massa corporal. O grupo foi definido com o objetivo de avaliar possíveis reações antigênicas e efeitos adversos agudos pós uso da NV. Para tanto, o termo de consentimento foi assinado pelos tutores, e os cães foram submetidos ao exame físico geral, mensuração da pressão arterial sistólica (PAS) e realização de eletrocardiograma antes e 30 minutos após a aplicação da NV (Figura 8).

A aferição da pressão arterial sistólica (PAS) foi conduzida utilizando o método Doppler (Acierno et al., 2018). Os animais foram colocados em decúbito lateral ou esternal, utilizando-se um manguito de largura equivalente a 40-50% da circunferência do membro ou cauda, posicionado ao nível do coração. Foram realizadas cinco medições em cada cão, utilizando o dispositivo Medmega® Doppler Vascular Veterinário Portátil Dv 610v, descartando a primeira leitura e calculando-se a média das subsequentes. O teste não paramétrico Kruskal-Wallis com o nível de significância  $p < 0,05$  foi utilizado para avaliar os valores de PAS antes e após a aplicação da NV.

Para a realização dos eletrocardiogramas (ECG), seguiram-se as recomendações de Santilli e colaboradores (2018), posicionando os cães em decúbito lateral direito, com o eletrodo vermelho no membro torácico direito, o amarelo no membro torácico esquerdo, o verde no membro pélvico esquerdo e o preto no membro pélvico direito. O eletrocardiógrafo veterinário Incardio® foi calibrado para registrar  $1 \text{ mV} = 1 \text{ cm}$ . As gravações foram feitas em um ambiente tranquilo para minimizar interferências e garantir precisão e reprodutibilidade dos resultados. Para avaliar as alterações eletrocardiográficas (ECG) foi utilizado o teste exato de Fisher. Os dados foram organizados em uma tabela 2x2, categorizando os resultados em alteração e sem alterações. A análise foi bicaudal, com um nível de significância de  $p < 0,05$ , para determinar se havia uma associação significativa entre o uso agudo de NV e as alterações no ECG.

Nesses cães a NV foi aplicada em dose única, de  $150 \mu\text{g}/\text{cão}$  (0,3ml), por via subcutânea. O tempo total de observação intra-hospitalar foi de duas horas, e todos os tutores foram contactados via aplicativos de mensagens por um período de 12, 24 e 48 horas após a aplicação (Figura 8). Nesse período os tutores foram questionados quanto à presença de alterações adversas, fisiológicas (polidipsia, polifagia e poliúria), comportamentais (atenção dos cães, interação com o meio ambiente, letargia) e motoras (alteração de marcha, paresias,

“fraquezas”). Para os efeitos adversos foi utilizada análise de contingência, por meio do teste exato de Fisher em análise bicaudal, com um nível de significância de  $p < 0,05$ , no qual foi atribuído um sim para cada cão que tivesse apresentado alguma alteração ou efeito adverso, e um não se nenhuma alteração fosse observada ou relatada.



**Figura 8** - Fluxograma representando as etapas do protocolo experimental realizado nos 8 cães do grupo sadio (GS). O protocolo incluiu exame físico, aferição da pressão arterial sistólica (PAS) e eletrocardiograma (ECG), seguido da aplicação de uma dose única de NV (150 µg/cão, SC). Após 30 minutos, os procedimentos foram repetidos, e os cães permaneceram em observação por duas horas em ambiente controlado, com posterior contato via aplicativo de mensagens para monitoramento.

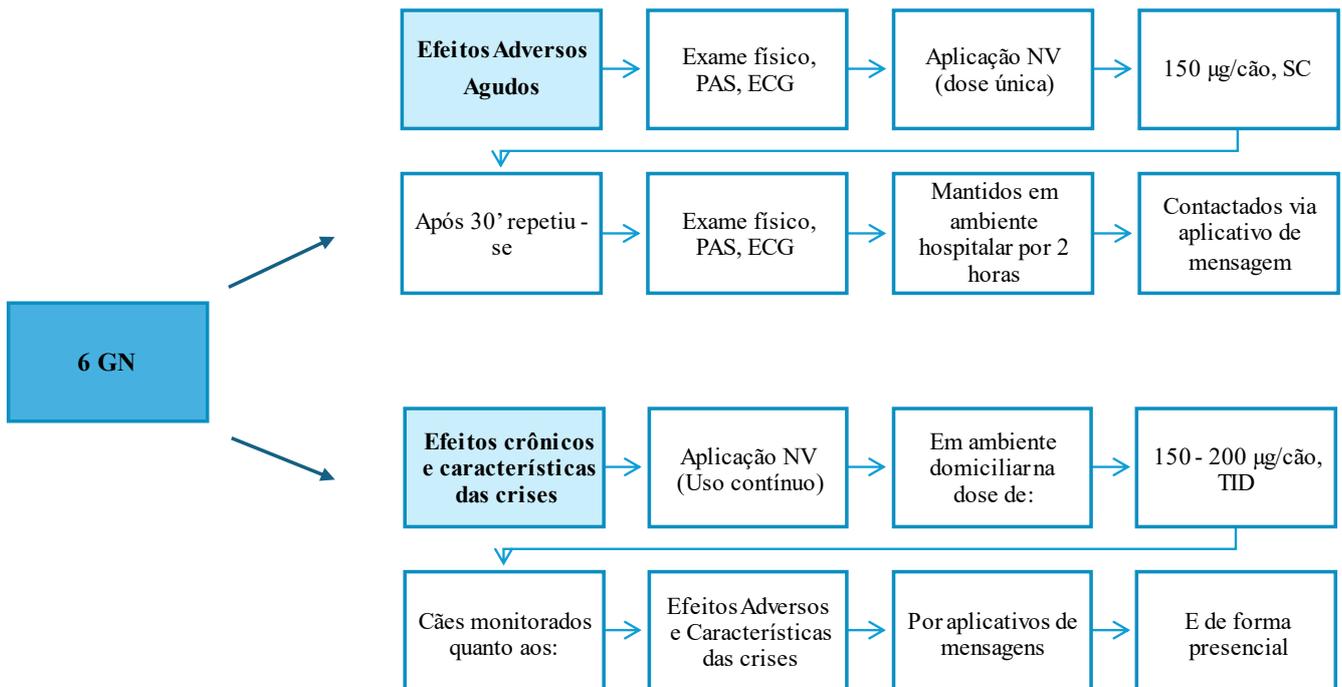
#### 4.4.2 Grupo Neurovespina (GN)

Seis cães com crises epilépticas, classificadas como idiopática de origem desconhecida ou provável genética, foram selecionados conforme os critérios de confiança nível I, II ou III estabelecidos pelo Consenso Veterinário sobre Epilepsia (Berendt et al., 2015).

Os critérios de inclusão foram cães com duas ou mais crises não provocadas com pelo menos 24 horas de intervalo; idade entre 6 meses a 6 anos para a primeira crise epiléptica, exame físico e neurológico interictais normais, exames hematológicos (hemograma completo, sódio, potássio, cloreto, cálcio, fósforo, ALT, FA, bilirrubina total, ureia, creatinina, proteína total e frações, albumina, glicose, colesterol, triglicerídeos, ácidos biliares em jejum); urinálise; sorologia negativa para doenças infecciosas (toxoplasmose, neosporose, erliquiose, babesia, leishmaniose e cinomose) e sem alterações cerebrais detectáveis na ressonância magnética (Hitachi - AIRIS II (Image Data Handling) version 5.0 software de 0,3 tesla), tomografia computadorizada (aparelho multi-slice Canon Aquilion Start com reconstrução multiplanar em cortes de 1,0 mm e intervalo de mesa de 0,8 mm de espessura, com a utilização de contraste iodado não-iônico por via intravenosa.) e avaliação do líquido cérebro espinhal normal.

Para inclusão no critério Tier III, alguns dos cães foram submetidos ao eletroencefalograma, porém não foi considerado um critério para exclusão dos demais cães, visto ser um exame de difícil acesso e alta complexidade para interpretação.

Atendidos os critérios de inclusão, os cães foram submetidos a mensuração da pressão arterial sistólica (PAS) e realização de eletrocardiograma, nos mesmos padrões aplicados ao grupo sadio, antes e 30 minutos após a aplicação de 150 µg/cão de NV, por via subcutânea, em ambiente intra-hospitalar. O tempo total de observação intra-hospitalar foi de duas horas, e todos os tutores foram contactados via aplicativos de mensagens por um período de 12, 24 e 48 horas após a aplicação (Figura 9). Nesses pacientes, a administração da NV foi continuada pelos tutores em suas residências, com doses entre 150 a 200 µg/cão (0,3 a 0,4 ml) por via subcutânea a cada 8 horas, por pelo menos seis meses. A massa corporal dos pacientes foi avaliada antes do início da NV e pelo menos seis meses após. Para analisar os valores de PAS antes e após a aplicação da NV utilizou-se o teste não paramétrico Kruskal-Wallis, considerou-se o nível de significância  $p < 0,05$ ; para avaliar as alterações eletrocardiográficas (ECG) e efeitos adversos da NV em uso agudo foi utilizado o teste exato de Fisher, em análise bicaudal, com um nível de significância de  $p < 0,05$ , no qual foi atribuído um sim para cada cão que tivesse apresentado alguma alteração de ECG ou efeito adverso, e um não se nenhuma alteração fosse observada ou relatada; para avaliar a massa corporal dos indivíduos antes e após o uso crônico da NV, foi realizado o teste t pareado em formato bicaudal, incluindo seis pares de observações. Considerou-se o nível de significância  $p < 0,05$  e a eficácia do pareamento foi avaliada através do coeficiente de correlação.



**Figura 9** - Fluxograma do protocolo experimental conduzido para os 6 cães do grupo tratado (GN). As etapas para avaliação dos efeitos adversos agudos foram as mesmas para o Grupo sadio. Para a avaliação de efeitos adversos crônicos e características das crises, os animais receberam NV em regime de uso contínuo (150-200 µg/cão, TID, SC) em ambiente domiciliar, com acompanhamento remoto e presencial para monitorar efeitos adversos e crises epiléticas.

#### 4.4.3 Acompanhamento dos pacientes: Grupo Neurovespina (GN)

Os dados retrospectivos foram coletados durante o semestre que antecedeu o início da administração da NV. Esses dados incluíam informações sobre a dose e a frequência dos fármacos antiepiléticos convencionais, bem como detalhes das crises epiléticas, como frequência, tipos (focal, generalizada ou focal com generalização), média de duração, data de início de ocorrência, horário das crises e duração do período pós-ictal. Em seguida, esses dados foram comparados as informações prospectivas durante o estudo.

Durante os atendimentos iniciais os tutores foram instruídos a diferenciar alterações comportamentais e motoras, assim como a identificar possíveis tipos de crises e padrões compatíveis com o período pós-ictal. Durante todo o estudo, para os dados prospectivos, os proprietários foram orientados a manter um registro diário de crises, o qual incluiu data, horário, número, tipo e a duração das crises epiléticas e duração os períodos pós ictais, para seus cães.

Devido à dificuldade de identificação pelos tutores, as crises focais não foram incluídas na análise do estudo, enquanto as crises agrupadas e o *status epilepticus* foram contabilizados de forma conjunta.

No registro dos resultados, as crises agrupadas e os *status epilepticus* foram contabilizados em uma única categoria. Quando uma crise agrupada (ou seja, mais de uma crise dentro de um período de 24 horas com recuperação completa entre elas) ou *status epilepticus* (uma crise epiléptica contínua por mais de cinco minutos ou múltiplas crises sem recuperação completa da consciência entre elas) foi observada, cada um desses episódios foi contabilizado como uma crise generalizada e também um episódio de crises agrupadas ou *status epilepticus*. Por exemplo, se um cão teve duas crises agrupadas e um *status epilepticus*, isso foi contabilizado como três crises generalizadas e três crises agrupadas ou *status epilepticus*.

De forma continuada, os tutores foram questionados quinzenalmente e orientados a entrar em contato imediato quanto à presença de alterações adversas, fisiológicas (polidipsia, polifagia e poliúria), comportamentais (atenção dos cães, interação com o meio ambiente, letargia) ou motoras (alteração de marcha, paresias, “fraquezas”). Os dados sobre a ocorrência de efeitos adversos com o uso crônico da NV foram analisados usando o risco relativo, com intervalos de confiança de 95% calculados pelo escore assintótico de Koopman. A análise incluiu tanto o valor do risco relativo quanto o recíproco do risco relativo. A categorização dos resultados foi feita com efeitos adversos e sem efeitos adversos para comparar os grupos.

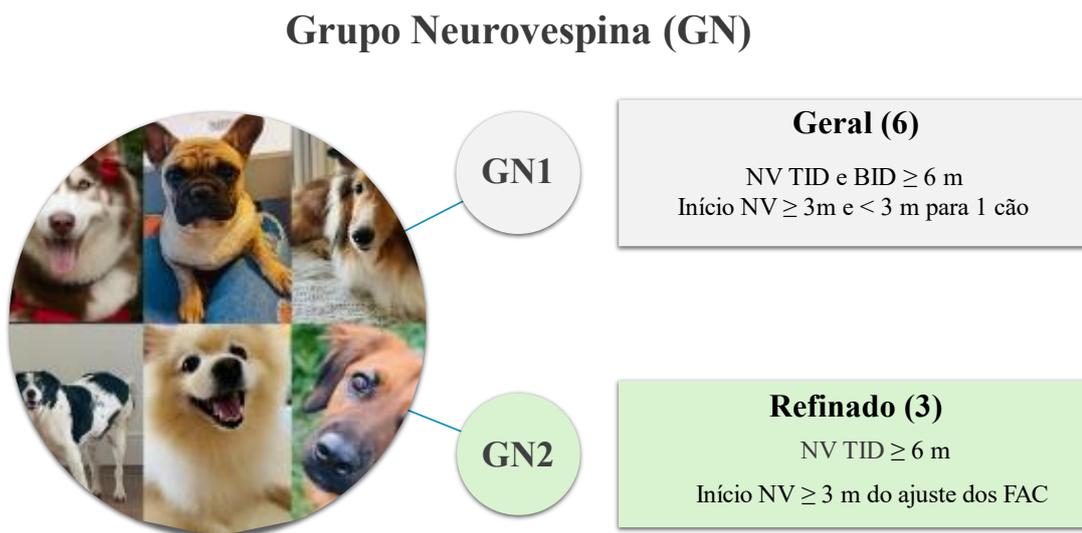
Em todos os cães cujos tutores concordaram em associar o peptídeo experimental ao tratamento já estabelecido, dose e frequência dos antiepilépticos convencionais foram revisados, bem como a dosagem sérica de fenobarbital. Doses abaixo do nível terapêutico foram reajustadas, mantendo-se inicialmente todas as medicações incluídas no tratamento.

Considerou-se em nível terapêutico as concentrações séricas de fenobarbital a partir de 25 mg/mL. As concentrações séricas de brometo de potássio e levetiracetam não foram mensuradas. No entanto, considerou-se adequada uma dose mínima de brometo de potássio de 30 mg/kg SID e de levetiracetam uma dosagem mínima de 20 mg/kg a cada 8 horas.

Após os ajustes dos fármacos tradicionais, e início da NV foi considerada uma terapia eficaz quando houve redução de mais de 50% das crises, e esta foi sustentada por um período mínimo de dois meses. Quando os cães apresentaram esses critérios e mantiveram o uso regular da NV, foi iniciada a redução dos fármacos antiepilépticos tradicionais, com o objetivo de avaliar se a NV como adjuvante seria capaz de manter as crises sustentadas.

Devido à dificuldade de alguns dos tutores em administrar a NV a cada oito horas e à inclusão de um cão cujo início do uso da NV não respeitou o período mínimo de três meses

após o ajuste dos fármacos antiepilépticos convencionais (FAC), o grupo tratado com neurovespina foi dividido em dois subgrupos para as análises estatística: GN1 e GN2. O GN1, denominado grupo neurovespina geral, incluiu todos os cães da pesquisa. O GN2, denominado grupo neurovespina modelo refinado, incluiu apenas cães que receberam a NV após três meses do ajuste dos FAC e mantiveram o regime TID por pelo menos seis meses. Enquanto a administração da NV foi mantida a cada oito horas, esses cães permaneceram no GN2 (figura 10).

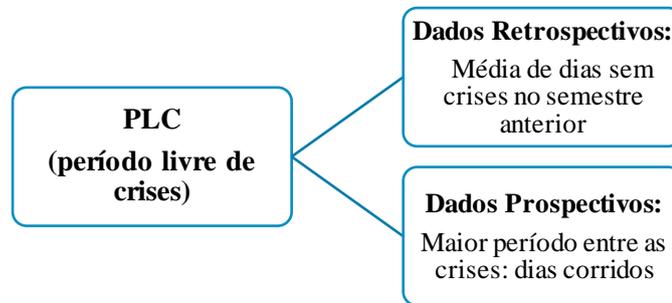


**Figura 10** - Divisão do grupo tratado com NV em dois subgrupos de análise: GN1 (grupo neurovespina geral), composto por todos os cães do estudo, e GN2 (grupo neurovespina modelo refinado), formado apenas pelos animais que receberam a NV após três meses de ajuste dos fármacos antiepilépticos convencionais (FAC) e mantiveram a administração a cada oito horas (TID) por, no mínimo, seis meses.

Os cães foram acompanhados por um período mínimo de seis meses. Todos os dados retrospectivos e prospectivos coletados foram registrados individualmente. Os dados retrospectivos foram comparados com aqueles obtidos após a administração da NV, para investigar os efeitos do tratamento, por meio das análises estatísticas para as variáveis período livre de crises e frequência média semestral.

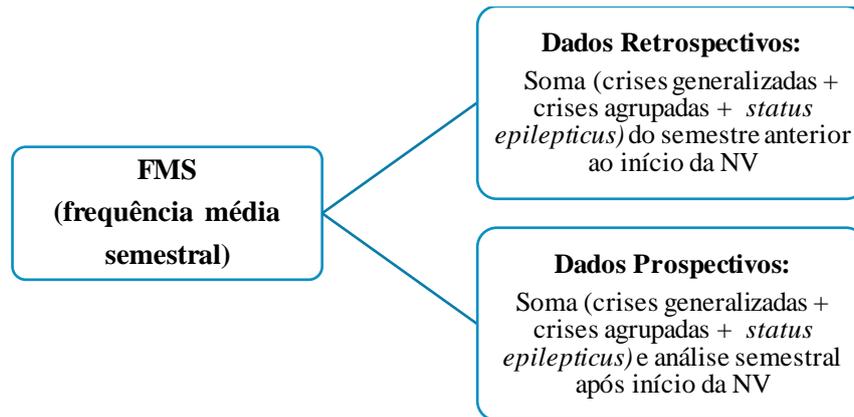
Para avaliar o período livre de crises (PLC) apresentado pelos cães, considerou-se, para os dados retrospectivos, a média de dias sem crises durante o semestre anterior ao início da administração da NV. Para os dados prospectivos, foi considerado o maior período em dias consecutivos sem crises. Os dados do PLC nos grupos GN1 e GN2 apresentaram distribuição

normal, justificando o uso do teste t bicaudal para amostras dependentes na comparação das médias dos períodos retrospectivo (antes da NV) e prospectivo (durante a NV) (figura 11). A diferença entre as médias foi acompanhada pelo erro padrão da média (SEM) e pelo intervalo de confiança de 95%. O nível de significância estabelecido para essas comparações foi de  $p < 0,05$ .



**Figura 11** - Representação do "Período Livre de Crises" (PLC), relacionando dados retrospectivos (média de dias sem crises no semestre anterior) e dados prospectivos (maior período entre as crises, em dias corridos).

A frequência média semestral (FMS) foi definida com base na quantidade total de crises generalizadas, crises agrupadas ou *status epilepticus* registradas por semestre. Para avaliar o efeito do tratamento com NV, foram analisados os números totais de crises nos seis meses anteriores ao tratamento (dados retrospectivos) e em semestres consecutivos após seu início (dados prospectivos) (figura 12). Dessa forma as análises estatísticas foram feitas comparando os semestres. A FMS do semestre anterior ao tratamento foi comparada à FMS do semestre com menor frequência de crises (melhor semestre) e à FMS de todos os semestres prospectivos analisados, com o objetivo de identificar o efeito da NV ao longo dos semestres avaliados.



**Figura 12** - Representação da Frequência Média Semestral (FMS) considerando dados retrospectivos (somatório de crises generalizadas, crises agrupadas e **status epilepticus** do semestre anterior ao início da NV) e dados prospectivos (mesma somatória e análise semestral após o início da NV).

Para o grupo GN1, a FMS de crises no período anterior ao início da NV e no melhor semestre foi avaliado por meio do teste não paramétrico, postos sinalizados de Wilcoxon para pares correspondentes com nível de significância bicaudal de 0,05. O teste calculou o valor de p de forma exata e considerou a soma dos postos positivos e negativos, bem como a soma dos postos sinalizados (W). A mediana das diferenças foi determinada para avaliar a tendência central das mudanças. Adicionalmente, a eficácia do pareamento foi examinada pelo coeficiente de correlação de Spearman, para verificar a relação entre os grupos antes e depois do tratamento.

A FMS para GN1 também foi comparada em três momentos distintos: antes do tratamento com a NV e após 6 meses, antes do tratamento com NV e após 12 meses, e entre 6 meses e 12 meses após o início do tratamento. Para avaliar as diferenças nas medianas do número total de crises epiléticas nesses três momentos, utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com nível de significância  $p < 0,05$ . Após o Kruskal-Wallis foram realizadas comparações múltiplas usando o teste de Dunn para identificar quais momentos apresentavam diferenças significativas entre si. O nível de significância estabelecido para essas comparações foi de  $\alpha = 0,05$ .

Para o grupo GN2 a FMS de crises no período anterior ao início da NV foi comparada aos semestres de uso da NV por meio do teste t não pareado. Os dados seguiram distribuição normal e foram agrupados em duas colunas, sendo a primeira representando o semestre sem a utilização da NV e a segunda coluna com todos os dados após seis meses de uso, independente do semestre. O teste foi realizado de forma bicaudal, e o nível de significância adotado para o teste foi de  $p < 0,05$ . Adicionalmente, um teste F para comparação de variâncias foi aplicado

para verificar a homogeneidade das variâncias entre os dois grupos, com significância definida também em  $p < 0,05$ .

Além dessas análises foi desenvolvido um escore quantitativo para avaliar a correlação entre a adesão dos tutores ao tratamento com a NV e dois desfechos: a redução percentual da frequência das crises e o aumento percentual do maior período livre de crises. Este escore considerou três critérios: regularidade nas aplicações, adaptação positiva dos cães à via de administração e satisfação do tutor com o tratamento. Para cada um desses critérios, foi atribuído um ponto, totalizando a pontuação final. Com base nessa pontuação, a adesão foi classificada como baixa (0 a 1 pontos), média (2 pontos) ou alta (3 pontos). Para a análise de correlação, as comparações foram realizadas com base no melhor semestre de resposta para cada desfecho avaliado. A relação entre a adesão ao tratamento e a redução percentual das crises epiléticas foi avaliada utilizando o coeficiente de correlação de Pearson (-1 a 1), onde a redução das crises foi a variável dependente e a adesão ao tratamento, a variável independente. A correlação entre a adesão ao tratamento e o aumento do PLC foi analisada utilizando o coeficiente de correlação de Spearman (-1 a 1). As comparações foram realizadas com 6 pares de dados para cada desfecho, utilizando um teste bicaudal com nível de significância de 0,05, e as estimativas de correlação foram acompanhadas de intervalos de confiança de 95%.

#### **4.4.4 Análise Estatística**

As análises dos respectivos dados estão descritas ao longo da sessão metodologia, e, para todas elas, exceto para as análises de contingência, a normalidade dos dados foi avaliada utilizando os testes de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov. Os resultados estão apresentados em média e desvio padrão e/ou erro padrão da média para dados normais e mediana e intervalo interquartil para os dados que não seguiram uma distribuição normal. Os testes estatísticos utilizados para avaliação dos dados, e o nível de significância adotado estão citados ao longo do texto. O programa estatístico utilizado para todas as análises foi o software estatístico software GraphPad Prism 10.3.0 (507).

## **5 RESULTADOS**

### **5.1 Grupos de estudo: Grupo sadio**

O grupo sadio (GS) foi composto por quatro cães machos e três fêmeas, com idade variando entre 2 e 8 (média de 4,43 anos), e massa corporal variando entre 6 a 25,2kg (média de 18,31 kg). As raças dos cães eram três sem raça definida, dois Huskys Siberianos, um pastor alemão, um pug.

O eletrocardiograma não mostrou alterações no padrão das ondas e a pressão arterial sistólica (PAS) apresentou uma média de 140 mmHg (variando de 130 e 140 mmHg) antes da administração da NV, e uma média de 130 mmHg (variando de 120 e 140 mmHg) após a administração da NV. Segundo o teste exato de Fisher não houve diferenças estatística significativa nas alterações do ECG ( $p > 0,9999$ ), os resultados indicam que, na amostra estudada, o uso agudo da NV não afetou os parâmetros de ECG no momento após a aplicação da NV. Quanto a PAS os resultados do teste de Kruskal-Wallis (4.027) indicaram que não houve diferença significativa entre as medianas da PAS entre os grupos (valor de  $p = 0.2585$ ).

Nenhum dos cães avaliados apresentou efeitos adversos observados clinicamente, o teste exato de Fisher indicou que não houve diferenças estatística significativa ( $p > 0,9999$ ) para os efeitos adversos com o uso agudo da NV.

### **5.2 Grupos de estudo: Grupo Neuroespina**

#### **5.2.1 Descrição dos cães**

Dos 18 cães que atenderam aos critérios de inclusão e iniciaram o tratamento com o peptídeo neuroespina, apenas seis seguiram o uso contínuo da medicação na dose e frequência recomendadas por pelo menos seis meses, período mínimo estabelecido para a avaliação dos dados.

Dessa forma, o grupo tratado (GN) final foi composto por seis cães: cinco machos (quatro castrados e um não castrado) e uma fêmea não castrada, e massas corporais variando de 5,3 a 26,0 kg (média de 17,5 kg). As raças dos cães incluíram dois cães sem raça definida de grande porte, um Husky Siberiano, um Pastor de Shetland, um Spitz Alemão e um Buldogue Francês (Figura 13).



**Figura 13** - Cães participantes do projeto. No entanto a imagem do cão no canto superior esquerdo é ilustrativa (fonte: Google).

A primeira crise epiléptica foi observada, em média, por volta de um ano e um mês de idade (variando de seis meses a um ano e seis meses), enquanto a idade média dos cães no momento da inclusão no estudo foi cinco anos e oito meses (variando de três a 10 anos).

Com relação à investigação diagnóstica, de acordo com os critérios estabelecidos pelo Consenso sobre Epilepsia Veterinária (2015), o nível de confiança Tier III foi aplicado em quatro cães, enquanto o nível de confiança Tier II foi utilizado em um cão. No sexto cão, a tomografia contrastada de crânio foi realizada em substituição à ressonância magnética de crânio devido à indisponibilidade deste exame em Brasília no período em questão.

### 5.2.2 Características das crises

As crises epilépticas recorrentes foram classificadas em epilepsia idiopática com provável origem genética em dois cães (cão n.2, n.5) e epilepsia idiopática de causa desconhecida em quatro cães (cão n. 1, n.3, n.4, n.6).

Quanto aos tipos de crises, em três cães (cão n.1, n.3, n.5) os tutores referiam crises focais com generalização secundária (50%), e os outros três cães apresentavam primariamente crises generalizadas (50%). Todos os cães, na maioria das crises, evoluíam para episódios de crises agrupadas ou *status epilepticus*.

Em três dos seis cães (50%) os tutores relataram gatilhos ambientais para desencadeamento de algumas das crises tais como estresse, mudança de rotina, trovões, fogos de artifício, excitação intensa, privação de sono, enquanto nos demais cães os tutores descreveram as crises como eventos totalmente aleatórias.

Além disso, em três dos seis cães (50%) os proprietários relataram que as crises epilépticas ocorriam durante o período noturno (sono). As crises epilépticas que aconteceram durante o dia ocorreram mais frequentemente quando os cães estavam em posição de repouso, e no início da manhã.

### **5.2.3 Medicções antiepilépticas prévias**

Antes da introdução da NV no tratamento dos cães com crises epilépticas, FAC já haviam sido prescritos por outros médicos veterinários, em monoterapia ou terapia combinada. Em todos os cães os FAC necessitaram de reajustes nas doses de um ou mais dos medicamentos, pois em cinco cães, um ou mais fármacos estavam abaixo do nível recomendado ou apresentavam controle inadequado das crises, e em um cão a dose sérica foi considerada em níveis tóxicos.

Em cinco cães, a NV foi iniciada de três a seis meses após os ajustes das doses dos FAC, enquanto no cão n. 4 a NV foi iniciada durante os ajustes das doses. No momento da introdução da NV, um cão (n.4) era tratado com fenobarbital em monoterapia e cinco eram tratados com fenobarbital em combinação com outros fármacos antiepilépticos (Tabela 2).

O cão tratado em monoterapia com o fenobarbital já havia anteriormente utilizado brometo de potássio em doses altas, sem sucesso e com importantes efeitos adversos. Nesse cão a dose oral do fenobarbital era de 6,9 mg/kg administradas duas vezes ao dia (BID).

Quanto aos cães tratados em terapia combinada, as doses orais do fenobarbital variaram de 4,5mg/kg a 7,6 mg/kg, administradas duas vezes ao dia (BID). As concentrações séricas do fenobarbital variaram de 30 a 54 mcg/mL.

Um cão (n.1) era medicado com Fenobarbital (4,5mg/kg, bid, com dosagem sérica de 37 mcg/ml) e brometo de potássio (30mg/kg, SID). Um cão (n.3) era medicado com Fenobarbital (dose oral de 7,6 mg/kg, bid e dosagem sérica de 54 mcg/ml) e levetiracetam (20mg/kg, TID). Dois cães (n.5 e n.6) eram tratados com fenobarbital (doses de 5,8 mg/kg e 7,14 mg/kg, BID, com dosagens séricas de 30 mcg/mL e 38,4 mcg/mL, respectivamente), brometo de potássio (30 mg/kg, SID e 22 mg/kg, SID) e levetiracetam (20 mg/kg, TID e 15 mg/kg, BID).

**Tabela 2** - Dados dos FAC e tempo de tratamento (em meses) antes da introdução da NV.

<b>Cão/n.</b>	<b>FB sérico</b>	<b>FB (dose oral)</b>	<b>Br (dose oral)</b>	<b>LV (dose oral)</b>	<b>Tempo com tratamento convencional</b>
<b>1</b>	37	4,5	30	NA	23
<b>2</b>	36	7,5	30	NA	23
<b>3</b>	54	7,6	NA	20	108
<b>4</b>	23	6,9	NA	NA	62
<b>5</b>	38,4	7,14	22	15*	44
<b>6</b>	30	5,8	33	20	71

Legenda: FB = dosagem sérica FB (mcg/mL); FB = fenobarbital (mg/kg, BID); BP = brometo de potássio (mg/k, SID), LT = levetiracetam (mg/k, TID); TMC = tempo médio com tratamento convencional antes da neurovespina (meses); NA = não se aplica; \* esse paciente utilizava o LT BID. Fonte: elaborada pela autora.

Três (n.1, n.3, n.5) dos seis cães (50%) tiveram histórico de uso do óleo de canabidiol, em concentrações não conhecidas, de forma regular e contínua por pelo menos 6 meses, antes do início da NV, mas os tutores não observaram resultados quanto a melhora da frequência e gravidade das crises, o que os levou a utilização esporádica nos cães. No momento do estudo, os cães estavam recebendo o canabidiol de maneira irregular, sendo administrada de forma esporádica ou apenas durante as crises.

A análise do tempo de tratamento com medicamentos convencionais antes do início do uso da NV foi a seguinte: Cães n.1 e n.2 por 23 meses, Cão n.3 por 108 meses, Cão n.4 por 62 meses, Cão n.5 por 44 meses, Cão n.6 por 71 meses (Tabela 2). A média dos tempos de tratamento foi de 55,17 meses, ou aproximadamente 4 anos e 7 meses, antes de iniciar a associação com a NV.

Ao menos um efeito colateral foi identificado em todos os cães tratados com FAC. Os efeitos adversos mais frequentemente relatados com o uso das medicações convencionais foram

letargia, fraqueza, alteração de marcha, polidipsia, polifagia e poliúria. Dois cães necessitaram de celiotomia em cinco ocasiões distintas para a remoção de corpos estranhos gástricos e intestinais, e os mesmos cães apresentaram bromismo. O brometo de potássio foi o fármaco que apresentou o maior número de efeitos adversos, sendo os principais letargia, alteração da marcha e locomoção (ataxia e paresia), o que resultou na descontinuação da medicação por parte do tutor do cão n. 4.

Todos os cães foram considerados farmacorresistentes, em cinco dos seis cães após os ajustes das medicações receberam a "dose de resgate" ou "*rescue dose*" com levetiracetam (dose de 20 a 30mg/kg, TID) por cinco dias, nos episódios de crises agrupadas ou episódios de *status epilepticus*. Apenas o cão de n.3 já fazia o uso da "dose de resgate", na dose de 60 a 90 mg/kg, TID, antes dos ajustes dos fármacos.

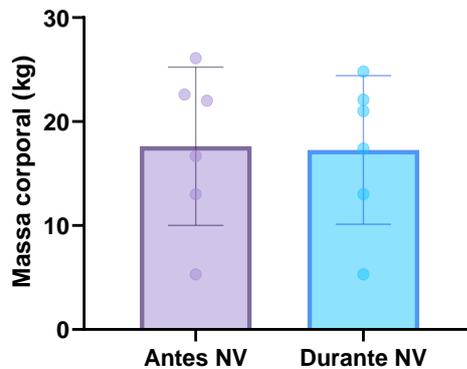
#### 5.2.4 Avaliação de possíveis efeitos adversos do peptídeo Neurovespina

Para as doses utilizadas do peptídeo NV (150 a 200 µg/cão, 0,1 a 0,4 ml/kg, via subcutânea), nenhum dos cães apresentou efeitos adversos na primeira e única aplicação (GC) assim como os cães em tratamento/uso crônico (GN). Todos os tutores negaram alterações fisiológicas (polidipsia, polifagia e poliúria), comportamentais (atenção dos cães, interação com o meio ambiente, letargia) ou motoras (alteração de marcha, paresias, "fraquezas") com a utilização do peptídeo NV. O risco relativo de ocorrência de efeitos adversos nos cães sem e durante o uso de NV foi calculado como 0,000, com um intervalo de confiança de 95% variando de 0,000 a 1,000, indicando que não há diferença significativa entre os momentos avaliados.

Nos cães avaliados, o eletrocardiograma não mostrou alterações no padrão das ondas em nenhum dos cães, e a pressão arterial sistólica (PAS) apresentou uma média de 138 mmHg (variando de 120 a 150 mmHg) antes da administração da NV, e uma média de 137 mmHg (variando de 130 a 145 mmHg) após a administração da NV, valores considerados normais para a espécie. Segundo o teste exato de Fisher não houve diferença estatística significativa nas alterações do ECG ( $p > 0,9999$ ), o uso agudo da NV não afetou os parâmetros de ECG no momento após a aplicação da NV. Quanto a PAS os resultados do teste de Kruskal-Wallis (4.027) indicaram que não houve diferença significativa entre as medianas da PAS entre os grupos (valor de  $p = 0.2585$ ).

Após no mínimo 6 meses de tratamento com a NV, as massas corporais dos cães foram registradas da seguinte maneira: considerando o primeiro valor como antes do tratamento e o segundo valor como após: Cão 1 (22 kg e 21 kg), Cão 2 (22,6 kg e 22,1 kg), Cão 3 (26,1 kg e

24,8 kg), Cão 4 (5,3 kg em ambos os momentos), Cão 5 (16,7 kg e 17,4 kg), e Cão 6 (13 kg em ambos os momentos). Os resultados do teste t pareado indicaram que a diferença entre a massa corporal antes e durante o uso da NV não foi estatisticamente significativa ( $p = 0.2956$ ), média das diferenças foi de -0.3500 kg, com um intervalo de confiança de 95% variando de -1.120 a 0.4205 kg (Figura 14).



**Figura 14** - Gráfico de barras apresentando dados da massa corporal (Kg) antes e durante o tratamento com NV. Os pontos individuais representam os valores de massa corporal de cada cão, enquanto as barras de erro vertical indicam o erro padrão da média.

Durante as consultas de acompanhamento e após a introdução da Neurovespina como adjuvante ao tratamento convencional, 83,3% dos tutores relataram, espontaneamente, melhorias no comportamento e/ou no desempenho motor dos cães, mencionando que eles pareciam mais "alertas, enérgicos e ativos".

### 5.2.5 Adesão ao uso da Neurovespina

Quatro dos seis cães (66,6%) foram incluídos no grupo de alta adesão terapêutica à NV, enquanto dois (33,3%) foram incluídos no grupo de média adesão para o melhor semestre avaliado. No entanto, apenas dois cães (n.3 e n.6) mantiveram-se no grupo de alta adesão durante toda a pesquisa.

A análise de correlação de Pearson entre a adesão ao tratamento e a redução percentual das crises epiléticas (CE) resultou no coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ) de 0,7278, indicando uma correlação positiva moderada entre as variáveis; contudo, o intervalo de confiança de 95% para este coeficiente variou de -0,2045 a 0,9678, abrangendo o zero, o que sugere que a correlação observada pode não ser estatisticamente significativa, uma vez que o

valor de P para o teste bicaudal foi de 0,1010, excedendo o nível de significância adotado de 0,05; adicionalmente, o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi de 0,5297, indicando que aproximadamente 52,97% da variação na redução das crises epiléticas poderia ser explicada pela adesão ao tratamento, embora este resultado não seja considerado estatisticamente significativo, com a análise sendo conduzida com 6 pares de dados ( $n=6$ ).

Para avaliar a correlação entre adesão ao tratamento o aumento percentual do período livre de crises a análise de correlação de Spearman foi utilizada, e mostrou uma correlação positiva moderada entre a adesão ao tratamento e o aumento no período livre de crises ( $r = 0,4140$ ). No entanto, a falta de significância ( $p = 0,5333$ ) indica que essa correlação não pode ser considerada estatisticamente significativa.

Do ponto de vista clínico, foram observadas algumas constatações importantes que devem ser consideradas. Especificamente, pacientes que apresentaram diminuição no escore de adesão ao longo do tratamento, não mantiveram a redução nas crises epiléticas de forma sustentada. Em contraste, os pacientes n. 3 e n. 6, que mantiveram um escore de adesão consistentemente alto durante toda a pesquisa, mostraram uma diminuição sustentada das crises epiléticas ao longo de todos os semestres avaliados.

### **5.2.6 Avaliação do período livre de crise, frequência média mensal**

Para avaliar o maior período livre de crises (PLC) e a frequência média semestral (FMS) após a introdução da NV, o grupo tratado com Neurovespina foi analisado em dois subgrupos: o grupo GN1 (grupo Neurovespina geral) incluiu todos os cães da pesquisa, e o GN2 (grupo Neurovespina modelo refinado) foram inclusos os cães de n. 1, n.3, n.6.

#### ***Período livre de crises após a introdução da Neurovespina***

Nos primeiros 90 dias após o início da NV, em conjunto com o tratamento antiepilético convencional, clinicamente foi observada redução no número de crises (*média mensal*) epiléticas em quatro cães (n. 1, n. 2, n.3, n.4).

O cão n. 1, apresentava uma crise agrupada seguida por *status epilepticus* ao mês e, após a instituição do tratamento com neurovespina obteve um período livre de crises de 60 dias consecutivos. Este cão foi monitorado por 24 meses, alcançando um período livre de crises de 45 dias no segundo semestre, 43 dias no terceiro semestre e 56 no quarto semestre.

O cão n. 2 apresentava uma crise generalizada mensalmente seguida de *status epilepticus*. Após o uso da neurovespina, apresentou um período livre de crises de 78 dias consecutivos. No entanto, subsequente a esse período, o próximo período livre de crises foi de 14 dias. Foi necessário, então, ajustar a dose de fenobarbital de 27 mcg/ml para 35 mcg/ml e introduzir o brometo de potássio na dose de 31,3 mg/kg para melhor controle das crises. Após o ajuste dos fármacos o paciente apresentou de forma consecutiva os seguintes PLC 42, 19, 16, 15 e 120 dias. Este cão foi acompanhado por um período de 18 meses.

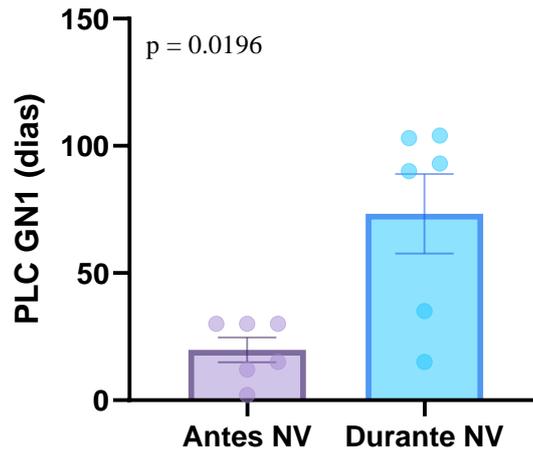
O cão n. 3, acompanhado no estudo durante 12 meses, apresentava média de três crises ao mês, e após a introdução da neurovespina, obteve um período livre de crises de 59 dias. Posteriormente, retornou ao mesmo PLC observado antes do tratamento, porém cerca de cinco meses depois, apresentou um período livre de crises de 93 dias consecutivos, e outro de 82 dias. Nesse cão foi possível reduzir o fenobarbital de 7,6 mg/kg, BID para fenobarbital 4 mg/kg, TID.

O cão n. 4, acompanhado por um período de 8 meses, apresentava uma crise generalizada seguida de crises agrupadas ou *status epilepticus* mensalmente, e após o início da NV apresentou um período livre de crises de 104 dias consecutivos.

Os cães n. 5 e 6 foram acompanhados por períodos de 6 meses e 54 meses, respectivamente. Durante os primeiros 90 dias de tratamento com neurovespina, esses cães não apresentaram variação no período livre de crises, diferentemente dos demais.

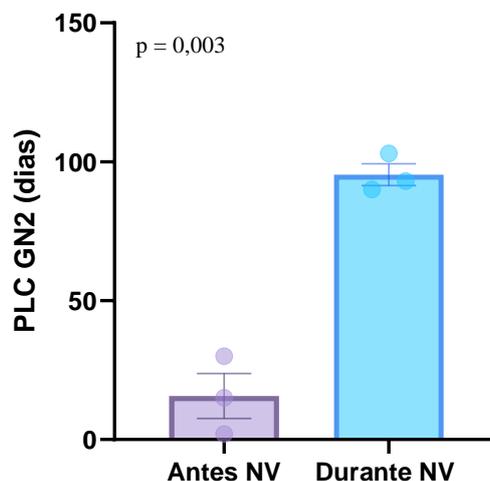
Para o cão n.6, os primeiros seis meses de acompanhamento houve redução gradual das crises, de uma crise a cada dois dias para uma a cada 30 dias. Posteriormente, observou-se um período livre de crises de cerca de 180 dias. Nesse cão foi possível retirar o levetiracetam e reduzir os demais fármacos antiepilépticos convencionais: fenobarbital 5,8mg/kg, BID (sérico 30 mcg/mL), brometo de potássio 3,8 mg/kg, SID, e levetiracetam 20 mg/kg, TID, para fenobarbital 3,8 mg/kg, BID, brometo de potássio 23 mg/kg, SID.

O teste t pareado foi utilizado para avaliar o PLC antes da NV e o melhor PLC após o início da NV para o grupo GN1, com um valor de p de 0,0196, indicando uma diferença estatisticamente significativa. A média das diferenças entre os períodos foi de  $53,50 \pm 15,80$ , com desvio padrão de 38,71 e intervalo de confiança de 95% entre 12,87 e 94,13. O teste foi bicaudal, com  $t = 3,385$  e 5 graus de liberdade, mostrando um aumento significativo no PLC durante o uso da NV (Figura 15).



**Figura 15** - Gráfico de barras apresentando o PLC do grupo GN1 antes e durante o uso da NV. Os pontos sobre as barras representam os valores individuais de PLC para cada cão, enquanto as barras indicam a média e o erro padrão da média (SEM). A barra roxa corresponde ao período antes do uso da NV (Antes NV) e a barra azul ao período durante o uso da NV (Durante NV). O teste t pareado indicou diferença significativa entre os grupos, com  $p = 0.0196$ .

O teste t pareado foi utilizado para avaliar o PLC antes da NV e o melhor PLC após o início da NV para o grupo GN2, com um valor de  $p$  de 0,0030, indicando uma diferença estatisticamente significativa. A média das diferenças entre os períodos foi de  $79,67 \pm 4,410$ , com desvio padrão de 7,638 e intervalo de confiança de 95% entre 60,69 e 98,64. O teste foi bicaudal, com  $t = 18,07$  e 2 graus de liberdade, evidenciando um aumento expressivo no PLC durante o uso da NV (Figura 16).



**Figura 16** - Gráfico de barras apresentando o PLC do grupo GN2 antes e durante o uso da NV. Os pontos sobre as barras representam os valores individuais de PLC para cada cão, enquanto as barras indicam a média e o erro padrão da média (SEM). A barra roxa corresponde ao período antes do uso da NV (Antes NV) e a barra azul ao período durante o uso da NV (Durante NV). O teste t pareado indicou diferença significativa entre os grupos, com  $p = 0.003$ .

### ***Frequência média semestral (FMS)***

Clinicamente foi observada estabilização ou redução da frequência média semestral das crises epilépticas para os cães testados.

O cão nº 1 apresentava, em média, seis crises generalizadas seguidas por crises agrupadas ou *status epilepticus* por semestre antes do tratamento com NV, e em todas essas crises o paciente foi internado. No primeiro semestre de tratamento com NV, o número de crises foi reduzido para três crises agrupadas, com ausência de *status epilepticus*; no segundo semestre, o paciente apresentou seis crises generalizadas, duas crises agrupadas e ausência de *status epilepticus*; e no terceiro semestre, o paciente teve cinco crises generalizadas, quatro crises agrupadas, sem *status epilepticus*.

O cão nº 2 apresentava, em média, sete crises generalizadas seguidas de crises agrupadas ou *status epilepticus* por semestre, mas esse número foi reduzido para seis crises generalizadas, uma crise agrupada e ausência de *status epilepticus* no primeiro semestre de tratamento com NV. No segundo semestre, o paciente apresentou três crises generalizadas, duas crises agrupadas e ausência de *status epilepticus*.

O cão n.3, antes do tratamento com NV, tinha uma média semestral de 2 crises focais, 12 crises generalizadas e três crises agrupadas. No primeiro semestre de tratamento, passou a apresentar seis crises generalizadas e três crises agrupadas. No segundo semestre de tratamento apresentou três crises generalizadas, e uma crise agrupada que evoluiu para *status*.

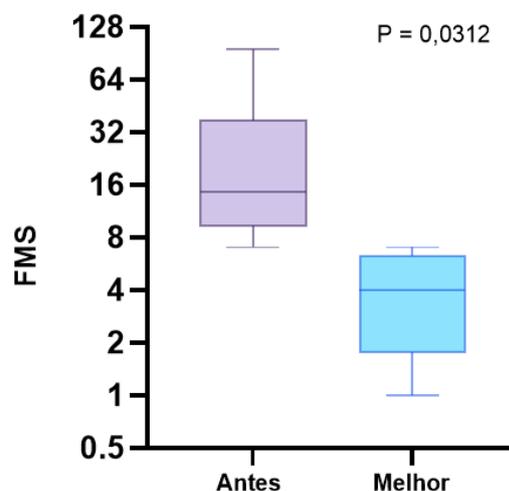
O cão nº 4 apresentava, em média, três crises generalizadas, três crises agrupadas e um *status epilepticus* por semestre, mas esse número foi reduzido para uma crise generalizada, uma crise agrupada e ausência de *status epilepticus* no primeiro semestre de tratamento com NV.

O cão nº 5 apresentava, em média, seis focais, oito crises generalizadas, duas crises agrupadas por semestre, mas esse número foi reduzido para seis focais, sete crises generalizadas, e ausência de crises agrupadas ou *status epilepticus* no primeiro semestre de

tratamento com NV. Além da redução das crises, os tutores referiram redução do tempo de crise e do período pós ictal.

O cão nº 6 apresentava crises a cada dois dias (cerca de 15 crises mensais) seguidas de crises agrupadas que evoluíam para *status epilepticus*. Nos primeiros seis meses de acompanhamento houve redução gradual das crises, passando de crises a cada dois dias para crises a cada 30 dias, tendo então seis crises generalizadas, com ausência de crises agrupadas e *status epilepticus* durante o primeiro semestre de tratamento com NV. No segundo semestre, o paciente apresentou uma crise generalizada; no terceiro semestre, teve duas crises generalizadas; e do quarto ao oitavo semestre, manteve uma frequência de uma a duas crises generalizadas a cada seis meses. Nesse cão foi possível eliminar gradual e definitivamente o uso de levetiracetam 23mg/kg, TID, e reduzir a dose do brometo de potássio de 33mg/kg SID para 23mg/kg SID e do fenobarbital e 5,8 mg/kg, BID (35 mcg/ml) para 3,8mg/kg, BID.

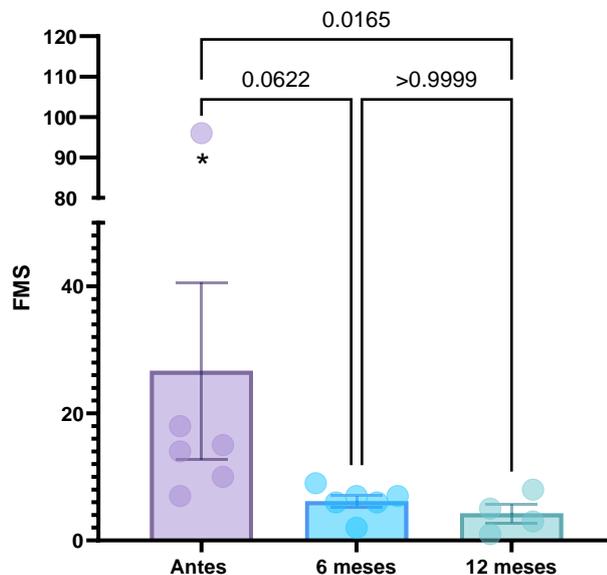
O teste de postos com sinais de Wilcoxon, para o grupo GN1, resultou em uma diferença significativa entre os dois semestres avaliados (antes da NV e o melhor semestre durante o uso da NV), com um valor de p de 0,0312, para o grupo GN1. A soma dos postos positivos foi 0,000 e a soma dos postos negativos foi -21,00, resultando em uma soma total de postos assinados (W) de -21,00. Foram avaliados 6 pares de dados, a mediana das diferenças entre os dois períodos foi de -10,50 (Figura 17).



**Figura 17** - Gráfico de caixa e bigode comparando a frequência média semanal (FMS) de crises epiléticas antes (Antes) e após o melhor semestre de resposta a NV (Melhor) para

GN1. O eixo Y está representado em base 2 ( $\log_2$ ). Os valores são expressos em mediana e intervalo interquartil, com  $p = 0,0312$ .

Os resultados do teste de Kruskal-Wallis, para o grupo GN1, mostraram uma diferença nas medianas do número de crises epilépticas ao longo de três momentos distintos, com um valor de  $p$  de 0,0032 e uma estatística de Kruskal-Wallis de 9,141, envolvendo três momentos e um total de 16 valores. O teste de comparações múltiplas de Dunn mostrou uma diferença significativa apenas nos momentos antes e 12 meses do uso da NV, e para esse período o rank médio foi de 8,500, com um valor de  $p$  ajustado de 0,0165. As comparações entre os momentos antes e seis meses de uso apresentou um valor de  $p$  ajustado de 0,0622, e entre seis meses e 12 meses do uso o valor de  $p$  ajustado foi superior a 0,9999 (Figura 18).

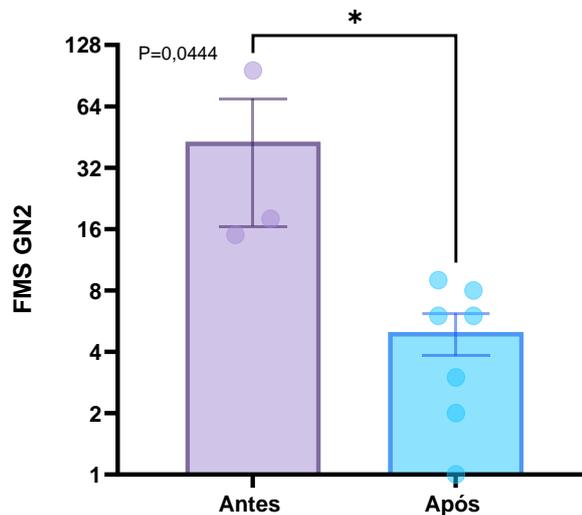


**Figura 18:** Histograma apresentando a comparação da FMS do grupo GN1 em três momentos distintos: antes, 6 meses e 12 meses após o uso da NV. Os dados são representados em mediana e intervalo interquartil, o asterisco (\*) indica um outlier no semestre “Antes”. Os valores de P sobre as barras demonstram as comparações entre os momentos, evidenciando a significância no momento “Antes” e 12 meses.

A diferença no número total de crises entre o momento antes e o melhor período após o início da NV para o grupo GN2 foi realizado um teste t pareado. Os resultados indicaram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os períodos analisados ( $p = 0,2881$ ). A

média das diferenças entre os períodos foi de -39,67, com um desvio padrão de 47,92 e erro padrão da média de 27,67. O intervalo de confiança de 95% para a diferença foi de -158,7 a 79,37. A correlação entre os pares foi de -0,7831, mas também não foi estatisticamente significativa ( $p = 0,2137$ ).

O teste t não pareado indicou diferença significativa no número de crises entre os momentos “Antes” (sem NV) e “Após” para o grupo GN2, valor de  $p = 0,0444$  ( $p < 0,05$ ). A média do grupo S/NV foi de 43,00, enquanto a média do grupo C/NV foi de 5,000, resultando em uma diferença média de  $-38,00 \pm 15,95$ . O intervalo de confiança de 95% para essa diferença variou de -74,78 a -1,219. O teste F para comparação de variâncias também revelou uma diferença significativa nas variâncias entre os grupos ( $p < 0,0001$ ). O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi de 0,4150, indicando que aproximadamente 41,5% da variação total pode ser explicada pela diferença entre os grupos (Figura 19).



**Figura 19:** Gráfico de barras representa a comparação entre o número de crises epiléticas no grupo GN2 “Antes” e “Após” o uso da NV. Considerou-se a média do número de crises com o erro padrão da média (SEM). Observa-se uma redução significativa no número de crises após o uso da NV, com um valor de P de 0,0444 ( $< 0,05$ ). O asterisco (\*) incide a diferença entre os momentos avaliados.

Portanto, para os testes avaliados houve diferenças significativas no PLC e FMS antes e após a introdução da Neurovespina para os grupos avaliados, dessa forma podemos dizer que o peptídeo diminuiu o PLC e a FMS no GN1 e GN2.

## 6 DISCUSSÃO

A epilepsia refratária representa um problema grave em humanos e cães (Patterson, 2013; Potschka, 2023), afetando 30% de ambas as espécies (Bialer e White, 2010; Jiang e Yu, 2023; Potschka, 2023;), embora se estime que a prevalência possa ser maior em cães (Löscher, 2022). Em um estudo com 402 cães, foi observado que a epilepsia resultou na morte de 71% dos cães, principalmente devido ao mau controle das crises e consequente eutanásia (Hamers et al., 2023). Além disso, até o presente momento, nenhum dos fármacos antiepiléticos (FAC) disponíveis ou outra terapia não medicamentosa é capaz de prevenir a epileptogênese (Löscher, 2022; Jiang e Yu, 2023) e reduzir significativamente a refratariedade ao tratamento associada a poucos ou nenhum efeitos adversos (Löscher, 2022).

Estudos revelam a necessidade de novas opções farmacológicas na medicina veterinária (Berendt et al., 2015; De Risio et al., 2015; Löscher, 2022; Potschka et. al, 2023) e humana (Bialer e White, 2010; Löscher, 2022), especialmente fármacos que forneçam controle das crises epiléticas, com poucos efeitos adversos, baixo custo e que atuem na fase latente da epilepsia (Jiang e Yu, 2023).

Nesse contexto, um peptídeo denominado de “Neurovespina” (NV) foi bioinspirado e desenhado a partir de um peptídeo natural extraído da peçonha de vespas sociais endêmicas do cerrado brasileiro, e vem sendo testado para o tratamento de epilepsia e doenças neurodegenerativas em modelos animais primatas e camundongos *Swiss* (Dos Anjos, 2013; Dos Anjos, 2017; Campos, 2020; Marques, 2024).

Sendo o cão considerado um modelo de epilepsia idiopática de ocorrência natural para a medicina translacional, este estudo teve como objetivo avaliar a ação antiepilética do peptídeo NV em cães, e até o presente momento, representa a primeira descrição do uso do peptídeo nessa espécie. Para tanto, os cães foram tratados diariamente com o peptídeo por um período mínimo de 6 meses, a fim de elucidar a possível ação antiepilética e secundariamente os efeitos adversos.

Nesse estudo, o grupo experimental de cães apresentou uma média de idade de um ano e um mês, com predominância do gênero masculino (83%, n=5). Esses resultados estão em concordância com a literatura, que demonstra que machos são frequentemente super-representados nos casos de epilepsia idiopática (Hamers et al., 2023). Além disso, o início

precoce das crises, especialmente em cães machos, tem sido associado a um pior prognóstico terapêutico, com menor taxa de sucesso no controle das crises (Potschka et al., 2023).

As crises epilêpticas de início focal representam a principal forma de apresentação em cães e estão associadas a um pior prognóstico (Berendt et al., 2015; Löscher, 2022). Entretanto, mesmo sabendo da relevância dessa apresentação clínica, em nosso estudo, essas crises não foram incluídas nas análises estatísticas devido à dificuldade da maioria dos tutores em identificá-las, uma limitação também relatada em outros estudos, que mostram que essas crises podem se manifestar por sinais discretos e serem confundidas com comportamentos normais, como ansiedade e inquietação (Berendt et al., 2015; Löscher, 2022).

Outra limitação observada durante as entrevistas, incluiu a dificuldade dos tutores em diferenciar as crises agrupadas e *status epilepticus* apresentados por seus cães, o que está de acordo com estudos que demonstram a complexidade dessa distinção, até mesmo para profissionais (Potschka et al., 2023). Por isso, neste estudo, consideramos as crises agrupadas e *status epilepticus* conjuntamente para as análises estatísticas.

Em estudos experimentais em camundongos epilêpticos utilizando somente a NV como tratamento, foi possível identificar que a gravidade das crises melhorou após a introdução do peptídeo, além disso, houve redução da duração das crises e do período pós ictal (Dos Anjos, 2017). Em nosso estudo, por meio de entrevista com os tutores, quatro deles relataram melhora na duração das crises, além de mais rápida recuperação nos períodos pós ictal após a introdução da NV associada aos FAC. Ademais a maioria dos cães antes do tratamento com a NV evoluíam para episódios de crises agrupadas e *status epilepticus*, e após a introdução da NV o número de interações foi diminuído nesses cães.

Sabemos que o uso terapêutico de novas opções farmacológicas incluem não apenas o conhecimento do mecanismo de ação, mas também definição das doses a serem utilizadas (Bialer, 2010). Dessa forma, a padronização de dose da NV representou um dos desafios para a realização desse estudo, visto que o entendimento quanto ao uso, metabolismo, doses e intervalos de administração para cães não é descrito na literatura.

A escolha da dose terapêutica ajustada e frequências da administração da NV foram baseadas em dados publicados sobre toxicidade, farmacocinética, e farmacodinâmica da NV em camundongos (Dos Anjos et al., 2017; Campos et. al, 2020) e primatas (dados não publicados), bem como de outros peptídeos testados em cães (Parkes et al., 2001; Ionut et. al., 2008; Ryan et. al., 2013; Ionut et. al., 2016).

Embora os mecanismos de ação da NV ainda não sejam completamente elucidados, e uma dose terapêutica pré-estabelecida não tenha sido definida, consideramos que houve boa

resposta na dose de 150µg/cão (0,3ml), a cada oito horas, para o grupo tratado (GN). A análise estatística da frequência média semestral (FMS) de crises e do período livre de crises (PLC) para o grupo tratado foi significativo. Esses resultados demonstraram que a NV aumentou o PLC dos cães, no entanto, é possível que os resultados possam ser aprimorados com o ajuste e definição das doses com base na concentração sérica, conforme é padronizado no uso do fenobarbital por exemplo (Berendt et al., 2015).

Ademais, Dos Santos (2017) seguiu a padronização de dose para camundongos *Swiss* a partir da administração em três doses diferentes juntamente com a avaliação eletroencefalográfica e outros testes para avaliação dos efeitos adversos para as doses testadas. Assim foi definida uma dose efetiva 90% de 3,2mg/kg para os camundongos. Essa pode ser uma medida a ser adotada juntamente com a tentativa de mensurar a Neurovespina sérica utilizando a técnica de HPLC-DAD (High-Performance Liquid Chromatography – diode array detector, em português, cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos) em cães com melhores respostas.

Embora o grupo de pesquisa tenha tentado usar a HPLC-DAD para a quantificação sérica, não foi possível observar os picos principais em tempos de retenção com o método utilizado, ou seja, a fração referente ao peptídeo nas amostras obtidas. Provavelmente, fatores relacionados ao preparo da amostra e até mesmo a flutuação natural da concentração do peptídeo ao longo do dia podem estar dificultando a detecção da NV. Outra possibilidade seria a alta afinidade do peptídeo com a proteína albumina, fazendo com que ocorra uma diminuição da porção livre do peptídeo a ser detectado, o que sugere a utilização de técnicas mais sensíveis para a quantificação de peptídeos em plasma. Sauter (2020) descreveu o uso do ensaio ultrasensível para determinar a quantificação das concentrações plasmáticas de exenatide em cães Beagle.

Os efeitos adversos dos fármacos antiepilépticos convencionais (FAC) são frequentemente observados na maioria dos cães em tratamento (Potschka et al., 2015; Potschka et al., 2023; Trevisan, 2024). Estudos referem que o controle dos efeitos adversos causados pelo uso dos FAC é tão importante quanto o controle das crises, pois apresentam impacto significativo na qualidade de vida dos animais e na adesão ao tratamento pelos tutores (Hamers et al., 2023; Potschka et al., 2023). Diante disso, nesse estudo os efeitos adversos das medicações convencionais e da NV foram analisados. Antes da introdução da NV, todos os efeitos adversos associados ao uso dos FAC foram investigados, e assim como observados em outros estudos (Bhatti et al., 2015; Podell et al., 2016; Löscher, 2022), os efeitos adversos dos FAC mais observados foram a letargia, a fraqueza, alteração de marcha, polidipsia, polifagia,

poliúria. Em nosso estudo o brometo de potássio foi o fármaco que apresentou o maior número de efeitos adversos, assim como descrito por outros autores (Charalambous et al., 2016; Hamers et al., 2023).

Quanto aos efeitos adversos relacionados a NV, nenhum dos cães apresentaram quaisquer alterações nas funções fisiológicas, alterações neurológicas ou comportamentais após o uso único (GC) e uso crônico (GV) para as doses utilizadas do peptídeo (150 a 200 µg/cão, via subcutânea). O risco relativo calculado como 0,000, foi utilizado para comparar a probabilidade da ocorrência do evento "efeitos adversos", e demonstrou que não houve diferença estatisticamente significativa entre os períodos antes e durante o uso de NV. No entanto, a amplitude do intervalo de confiança, que se estendeu até o valor de 1,000, reflete a incerteza em torno desta estimativa, e sugere que o modelo utilizado pode não ter sido suficientemente, possivelmente uma amostra maior traria mais consistência para esse resultado.

Embora haja poucas informações sobre a relação entre epilepsia idiopática em cães e a ocorrência de hipertensão ou distúrbios no ritmo cardíaco (Trevisan, 2024), essa conexão já está bem estabelecida em pacientes humanos (Liu et al., 2023; Elnawasany, 2023; Asadollahi, 2024). Isso se deve, em parte, às semelhanças entre os canais iônicos do músculo cardíaco e do sistema nervoso (Shah, 2010), especialmente os canais de cálcio (Simms et al., 2014; Pallone et al., 2018). Um estudo observou que a NV diminuiu a condutância de cálcio ao bloquear os canais de cálcio Cav1.2, um canal tipo L amplamente presente no tecido nervoso e cardíaco (Campos, 2020). Com base nessas informações, consideramos relevante investigar o efeito agudo da NV sobre o ritmo cardíaco e a pressão arterial sistólica (PAS).

Nos cães avaliados, os resultados do teste exato de Fisher indicaram que não houve diferenças significativas no ECG antes e após o uso agudo da NV. A ausência de alterações no ECG sugere que, a curto prazo, esse fármaco não exerce influência deletéria sobre a eletrofisiologia cardíaca. No entanto, a falta de impacto agudo no ECG não elimina a necessidade de monitoramento a longo prazo, considerando que efeitos adversos cardíacos podem surgir com o uso crônico de alguns antiepilépticos (Liu et al., 2023). Embora os principais responsáveis por alterações cardíacas sejam os FAC indutores de enzimas e moduladores de canais de sódio (Liu et al., 2023), o que não parece ser o caso da NV com base nos dados disponíveis (Campos, 2022), estudos longitudinais futuros são recomendados para confirmar a segurança cardíaca do uso contínuo de NV.

Outro ponto relevante diz respeito à escolha do teste exato de Fisher, utilizado por termos classificado os dados como categóricos binários (presença ou ausência de alterações no ECG). Essa avaliação de contingência pode ter interferido nos nossos resultados, visto que

estudos sugerem que cães epiléticos com ritmo sinusal e frequência cardíaca normais podem apresentar anormalidades elétricas associadas a atrasos na condução, evidenciadas pelo aumento da duração da onda P e o atraso no início do complexo QRS (Musteata et al., 2017). Da mesma forma outros autores avaliaram diretamente os valores numéricos quanto as amplitudes das ondas do ECG, por meio de testes o Mann-Whitney e Kruskal-Wallis (Musteata et al., 2017; Trevisan, 2024). Em um estudo transversal recente, Trevisan et al. (2024) observaram que as principais alterações no ECG incluíram maior duração do complexo QRS e do intervalo S-T. Nesse contexto, o uso de dados numéricos seria preferível, pois oferece maior precisão e riqueza de informações em comparação aos dados categóricos binários. No entanto, é importante ressaltar que os dados numéricos relacionados às alterações eletrocardiográficas secundárias à epilepsia e ao uso de fármacos antiepiléticos (FAC) ainda são escassos na literatura veterinária. Estudos adicionais são necessários para padronizar dados eletrocardiográficos em pacientes epiléticos tratados com FAC, visando gerar dados mais robustos e mensuráveis para análises estatísticas.

Em humanos, a relação entre variações pressóricas sistêmicas e crises epiléticas está bem estabelecida (Nass et al., 2019; Zining Liu et al., 2023), assim como o impacto do uso dos FAC sobre a pressão arterial (Liu et al., 2023). Em cães, porém, poucos estudos abordam essa relação (Trevisan et al., 2024). Entre os poucos estudos disponíveis, destaca-se a investigação de Trevisan e colaboradores (2024), que avaliou a influência do fenobarbital nas variações pressóricas em 21 cães divididos em dois grupos: sem crises e com crises epiléticas. Após 60 dias de uso do fenobarbital, foi observado que os cães epiléticos apresentaram valores mais elevados de pressão arterial média e diastólica. Assim diante dos achados relatados na literatura em humanos e cães, buscamos avaliar a relação do uso agudo da NV com alterações pressóricas. Contudo, nossos resultados não identificaram diferenças significativas nas medianas da pressão arterial sistólica (PAS) antes e após o tratamento com NV. Esses achados sugerem que a NV não exerceu impacto mensurável sobre a PAS. Contudo, é essencial dar continuidade às avaliações longitudinais, além de realizar estudos adicionais que diferenciem os efeitos do tratamento com FAC e NV sobre a PAS, bem como os efeitos diretos da própria epilepsia nesse parâmetro.

Outra relação amplamente reconhecida na medicina humana, mas ainda pouco explorada na medicina veterinária, é a associação entre o uso de fármacos antiepiléticos convencionais (FAC) e alterações ponderais, com destaque para o ganho de massa corporal, que tem sido vinculado à baixa adesão ao tratamento (Hamed et al., 2015). Em cães, essa relação não é bem estabelecida, embora polifagia e alterações endócrinas sejam frequentemente

relatadas como efeitos adversos (Bhatti et al., 2015; Potschka et al., 2015; Hamers et al., 2023). Nossos resultados diferem da literatura, já que o uso de NV não resultou em variações na massa corporal após seis meses ( $p = 0,2956$ ), e a polifagia não foi relatada como um efeito adverso. Esses achados podem indicar que a NV possa ter pouca influência sobre o perfil endócrino dos cães, sugerindo seu potencial futuro como opção terapêutica para pacientes com alterações metabólicas. Contudo, mais estudos são necessários para validar esses achados.

Por fim, sabe-se que a associação de fármacos em pacientes refratários está diretamente associada ao aumento dos efeitos adversos (Potschka et al., 2015). Um estudo recente avaliou a coadministração de canabidiol com FAC e observou a potencialização dos efeitos adversos (Rozental et al., 2023). No entanto, nossos resultados divergiram, já que a NV não demonstrou alterações observacionais, mesmo com o uso concomitante de três FAC. Dessa forma, com base nas análises realizadas e nos pontos discutidos sobre os efeitos adversos, concluímos que a NV, na dose utilizada, apresenta um perfil de segurança adequado para o uso em cães. No entanto, reconhecemos limitações em nossa afirmação, especialmente devido ao número reduzido de indivíduos na amostra e à ausência de testes complementares, como a avaliação de toxicidade celular. Novos estudos podem auxiliar para o melhor entendimento dos efeitos adversos a partir de estudos longitudinais, com um maior número amostral, além de outros testes de toxicidade, avaliando o potencial genotóxico, citotóxico, hematotóxico e imunotóxico, como realizado por Dos Anjos (2017).

Em nosso estudo, durante as consultas de acompanhamento após a introdução da NV como adjuvante ao tratamento convencional, 83,3% dos tutores relataram espontaneamente melhorias no comportamento e no desempenho motor dos cães, mencionando que os animais estavam mais "alertas, enérgicos e ativos". Embora a discussão desse dado observacional não estivesse originalmente prevista, decidimos incluí-lo, uma vez que a NV demonstrou ação neuroprotetora de neurônios hipocâmpais em modelos de epilepsia (Mortari et al., 2005; Dos Anjos, 2013; Dos Anjos et al., 2017; Campos et al., 2020) e neurônios dopaminérgicos da substância negra em modelo murino de parkinsonismo (Campos et al., 2016). Indagamos se essas melhorias de comportamento possam estar associadas ao efeito neuroprotetor previamente demonstrado pela NV em outras espécies, e entendemos que essa informação seja relevante, uma vez que o desenvolvimento de fármacos com efeito modificador da doença, atuando na fase latente da epilepsia e promovendo neuroproteção, permanece um desafio (Löscher, 2022). No entanto, não podemos confirmar esses dados em cães, sendo necessárias investigações adicionais que incluam monitoramento por eletroencefalograma e avaliações histopatológicas das estruturas cerebrais.

Sabemos que em todo tipo de tratamento a adesão à terapêutica é fundamental para obtenção dos resultados esperados. Em um estudo no Reino Unido referiu que apenas 20% dos tutores cumprem todas as recomendações apresentadas pelo veterinário para o controle das crises (Booth et al., 2021). Dessa forma, no presente estudo criamos um escore de adesão ao tratamento com a NV pois observamos que a via de administração subcutânea e a frequência de administração de três vezes ao dia representou um desafio para permanência dos tutores na pesquisa. Dos 26 cães que iniciaram na pesquisa, somente seis completaram a maioria dos critérios definidos. Para o grupo tratado (GN), embora a análise de correlação de Pearson entre a adesão ao tratamento e a redução percentual das crises epilêpticas tenha resultado em um coeficiente de correlação forte ( $r = 0,7278$ ), não foi observada significância estatística ( $p = 0,1010$ ). O mesmo foi observado na correlação de Spearman, entre a adesão ao tratamento e o aumento percentual do período livre de crises, que apresentou uma correlação positiva moderada ( $r = 0,4140$ ). No entanto, a falta de significância estatística ( $p = 0,5333$ ) indica que essa correlação não pode ser considerada estatisticamente relevante. A significância possivelmente não foi observada devido ao  $n = 4$  para o grupo alta adesão e  $n=2$  para o grupo média adesão. Consideramos que o aumento no número de cães tratados possa fazer diferença para as análises estatísticas futuras. Mas ainda que o número amostral fosse maior, outro fator limitante se refere ao tempo, pois a adesão ao tratamento foi reduzida ao longo dos semestres avaliados, onde quatro cães iniciaram no grupo alta adesão terapêutica e apenas dois permaneceram ao fim de primeiro semestre de uso da NV.

Dos Anjos (2017) avaliou a atividade antiepiléptica da NV por meio da análise da duração, frequência e severidade das crises recorrentes, juntamente com avaliações por EEG, durante o período crônico do modelo estudado, comparando os resultados com os demais grupos do estudo. No entanto, a reprodução exata dessas análises no contexto clínico veterinário é impraticável, pois os tutores enfrentam dificuldades para quantificar com precisão o número, a duração e o tipo de crises. Além disso, o uso rotineiro de EEG ainda não é aplicado de forma rotineira e padronizada na medicina veterinária (Charalambous et al., 2023; Löscher, 2022; De Risio et al., 2015).

Estudos clínicos em cães que avaliam o efeito de medicações antiepilépticas emergentes têm focado principalmente na frequência das crises antes e após a terapia, bem como nos efeitos adversos associados (McGrath et al., 2019; Rozental et al., 2022). Rozental e colaboradores (2022) utilizaram variáveis como a quantidade de crises e o período livre de crises para medir a eficácia do canabidiol, enquanto McGrath e colaboradores (2019) avaliaram a eficácia com base na frequência das crises em cães. Em nosso estudo, utilizamos as variáveis período livre

de crises (PLC) e frequência média semestral (FMS) para comparar os eventos antes e após pelo menos seis meses de uso da NV.

Observamos resultados estatisticamente significativos em ambas as variáveis, para ambos os grupos avaliados (GN1 e GN2). Especificamente em relação à FMS do grupo GN1, as análises mostraram significância entre os períodos antes da NV e após 12 meses de uso, sugerindo que o tratamento com NV pode ter um efeito mais pronunciado a longo prazo. Esses achados estão alinhados com estudos anteriores que indicam que o controle de crises em pacientes tratados com FAC como o brometo de potássio, tende a se tornar mais evidente ao longo do tempo (Potschka et al., 2023). Entretanto, esperávamos resultados diferentes, visto que em nossas observações o passar do tempo esteve diretamente relacionado a diminuição da adesão ao tratamento, a partir do sexto mês observamos que apenas dois tutores mantiveram a frequência de administração e todas as recomendações indicadas.

Com base nesses resultados, podemos supor que a diferença significativa observada entre os momentos "antes" e "12 meses de tratamento" pode ter sido influenciado também pela presença de outlier secundários aos dados do paciente n. 6 que apresentou redução de 96 crises semestrais para uma crise ao fim de 12 meses, e do cão de n. 3 que reduziu a frequência de crises de 15 semestrais para três crises durante o segundo semestre avaliado.

Por fim, as análises do PLC e da FMS revelaram que o tratamento com NV promoveu uma melhora significativa no controle das crises epiléticas, em ambos os grupos tratados (GN1 e GN2). Juntos, esses parâmetros refletem um impacto relevante do tratamento no controle das crises epiléticas em cães com epilepsia refratária, sugerindo que a NV tem o potencial de prolongar significativamente o tempo sem crises e reduzir a frequência das crises.

Acreditamos que o aumento do PLC e a redução da FMS observados estejam relacionados à ação da NV nos canais de cálcio tipo 1.2, diminuindo o influxo de cálcio e, conseqüentemente, a excitabilidade neuronal, como descrito por Campos (2020). Além disso, estudos sugerem que os canais de cálcio tipo L (Cav1.x) desempenham um papel crucial no desencadeamento de despolarizações paroxísticas (PDS) (Meyer et al., 2021), e, portanto, uma possível ação da NV nesses canais, com a conseqüente redução do PDS, pode estar associada ao controle eficaz das crises epiléticas. Outras possibilidades podem estar associadas a efeitos semelhantes aos do peptídeo precursor da NV, a Occidentalina-1202, cujos estudos indicam afinidade por receptores glutamatérgicos do tipo cainato e a capacidade de reduzir potenciais pós-sinápticos excitatórios, especialmente pela modulação do glutamato (Mortari et al., 2023). Embora essas hipóteses ainda precisem ser testadas especificamente para a NV, a combinação desses mecanismos pode ajudar a explicar a eficácia observada da NV na melhora dos

parâmetros de PLC e FMS, evidenciando seu potencial como terapia adjuvante no manejo da epilepsia refratária. Esse ponto é altamente relevante, pois a NV, pode expandir as opções terapêuticas, dado que seu mecanismo de ação difere dos fármacos antiepiléticos convencionais (FAC), que atuam predominantemente na neurotransmissão GABAérgica (Potschka et al., 2023). O possível mecanismo de ação também pode explicar a significância dos dados mesmo para um grupo amostral composto por cães com alta tendência à refratariedade (83% do sexo masculino, 100% dos cães com início precoce de início de apresentação das crises) (Potschka et al., 2023).

Dentre as limitações do nosso estudo, destaca-se o tamanho amostral, o que pode ter reduzido o poder estatístico das análises, apesar do uso de testes adaptados para pequenas amostras. Além disso, faltam dados concretos sobre o mecanismo de ação da NV em cães, o que limita a compreensão de seus efeitos. Futuros estudos são essenciais para aprofundar o entendimento do mecanismo de ação NV, visto que os dados atuais foram obtidos em modelos celulares compostos por um único tipo de célula indiferenciada. Essas células têm a capacidade de alterar seu padrão de expressão em resposta a diferentes insultos e tratamentos, o que pode afetar os resultados experimentais dos dados apresentados por Campos (2020).

Além disso, a atividade antiepilética da NV, até o momento, foi comprovada em modelos agudos e em crises induzidas por agentes químicos, como pilocarpina e ácido caínico (Dos Anjos et al., 2017). Contudo, modelos agudos e crônicos refletem condições biológicas distintas, visto que crises espontâneas e recorrentes em um encéfalo naturalmente epilético diferem significativamente de crises induzidas em encéfalo normais (White e Löscher, 2014).

Devido às limitações metodológicas na padronização da dose de NV, é possível que as quantidades administradas nos cães tenham sido subterapêuticas. Enquanto em camundongos com massa corporal entre 38 e 45 g foram tratados com uma dose média de 4 mg/kg, equivalente a uma média de 120 µg por animal (Dos Santos, 2017), os cães, com média de massa corporal de 18 kg, receberam entre 150 e 200 µg por cão. Essa diferença na proporção de doses pode indicar que os cães podem ter recebido quantidades proporcionalmente menores em relação a massa corporal, limitando a eficácia do tratamento. Dessa forma, futuros estudos devem investigar se as alterações no PLC e da FMS são mantidas ou melhoradas com doses maiores, associadas à ausência ou mínima ocorrência de efeitos adversos, assim com a tentativa de estabelecimento de uma dose máxima, visto que o aumento da dose pode ser uma estratégia eficaz para superar falhas terapêuticas em cães refratários (Potschka et al., 2023).

Ademais, uma avaliação interessante seria investigar o uso da NV em pacientes com epilepsia idiopática que ainda não foram classificados como resistentes, uma vez que estudos em humanos sugerem que, após a falha do primeiro e segundo antiepiléticos (AEC), as chances de resposta a outros tratamentos medicamentosos diminuem consideravelmente (Rozenal et al., 2023), ainda investigações clínicas demonstram que, em humanos, os níveis séricos de FAC em pacientes com epilepsia resistente a medicamentos são significativamente inferiores aos observados em pacientes com epilepsia controlada por medicação (Potschka et al., 2023).

Estudos longitudinais são de extrema importância para pesquisas clínicas, visto que a resposta aos medicamentos pode seguir diferentes padrões ao longo do curso da doença (Potschka et al., 2023). Por isso, essas pesquisas, juntamente com estudos cegos e multicêntricos, devem ser priorizadas. Além disso, é essencial avaliar outras possibilidades relacionadas à via de administração e à frequência de uso do peptídeo.

Estudos realizados em camundongos avaliaram o efeito antiepilético e neuroprotetor da NV em associação a nanotecnologia, e os resultados indicaram uma redução na frequência de administração, além de um possível aumento na eficácia terapêutica do peptídeo. Esses resultados também sugeriram a manutenção da segurança farmacológica, oferecendo um tratamento mais confortável para os indivíduos (dados não publicados). Dessa maneira, a terapia com nanotecnologia associada ao uso transdérmico em cães pode representar uma solução promissora para aumentar a adesão dos tutores ao tratamento. Isso, por sua vez, poderia facilitar o aumento do número de cães avaliados em estudos longitudinais, ampliando a força dos dados e a compreensão dos efeitos a longo prazo.

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo indicam que o peptídeo NV foi efetivo em reduzir a frequência das crises epiléticas em cães diagnosticados com epilepsia idiopática, e que a dose de 150 a 200  $\mu\text{g}/\text{cão}$  a cada 8 horas, foi eficaz e segura. Esses achados sugerem que a NV tem potencial como uma futura opção terapêutica adjuvante no tratamento da epilepsia refratária em cães, abordando um dos maiores desafios no manejo clínico: a resistência aos fármacos antiepiléticos convencionais (FAC).

No entanto, é necessário ampliar as investigações sobre a toxicidade da NV, incluindo exames de hematotoxicidade e genotoxicidade, essenciais para assegurar sua segurança em longo prazo. Além disso, é crucial aprofundar o conhecimento acerca de seu mecanismo de ação, que, em estudos com camundongos, demonstrou ser distinto dos FAC licenciados para cães, os quais atuam predominantemente sobre os receptores GABAérgicos. Essa distinção abre novas fronteiras no campo terapêutico e ampliar de forma significativa as opções terapêuticas disponíveis.

Esses resultados contribuem para o avanço das terapias inovadoras, mas reforçam a necessidade de um maior grupo amostral, e estudos longitudinais e multicêntricos que validem o uso da NV em maior escala. Além disso, recomenda-se que futuros estudos explorem diferentes vias de administração, como a transdérmica, associadas à nanotecnologia, com o objetivo de otimizar a adesão e, conseqüentemente, a eficácia do tratamento.

Por fim, esses achados são promissores tanto para a medicina veterinária quanto para a medicina humana, considerando a relevância dos cães como modelos translacionais no estudo da epilepsia. A NV, portanto, destaca-se como um fármaco promissor, com poucos efeitos adversos, e com grande potencial para melhorar substancialmente a qualidade de vida de pacientes epiléticos e suas famílias.

## REFERENCIAS

ASADOLLAHI, M.; SHAHIDI, M.; RAMEZANI, M.; SHEIBANI, M. Interictal electrocardiographic alternations in patients with drug-resistant epilepsy. *Seizure*, v. 69, p. 7-10, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2018.07.002>.

Atividade antiepiléptica e neuroprotetora do peptídeo neurovespina em um modelo crônico de Epilepsia do Lobo Temporal e avaliação da sua toxicidade aguda em camundongos *Swiss*. 2019. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de Brasília, Brasília, 2019.

BARNETT, A. Exenatide: a review of its effects on glycemic control and weight in patients with type 2 diabetes. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, v. 8, n. 15, p. 2593-2608, 2007. DOI: 10.1517/14656566.8.15.2593.

BERENDT, M. et al. International veterinary epilepsy task force consensus report on epilepsy definition, classification and terminology in companion animals. *BMC Veterinary Research*, v. 11, n. 182, p. 1-11, 2015. DOI: 10.1186/s12917-015-0461-2. Disponível em: <https://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-015-0461-2>

BHATTI, S. F. M.; DE RISIO, L.; MUÑANA, K. *International Veterinary Epilepsy Task Force consensus proposal: medical treatment of canine epilepsy in Europe*. *BMC Veterinary Research*, v. 11, n. 176, 2015. Disponível em: <https://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-015-0464-z>.

BIALER, M.; WHITE, H. S. Key factors in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 9, n. 1, p. 68-82, 2010.

BOOTH, S.; MELLER, S.; PACKER, R. M.; FARQUHAR, R.; MADDISON, J. E.; VOLK, H. A. Owner compliance in canine epilepsy. *Veterinary Record*, v. 188, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/vetr.16>.

CAMPOS, G. A. A. Avaliação da ação antiparkinsoniana do peptídeo Neurovespina no modelo murino da Doença de Parkinson. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

CHARALAMBOUS, M.; BRODBELT, D.; KUZIEK, J.; FLEEMAN, L.; DANDY, G.; HAMMOND, R.; HARVEY, R.; PANCIERA, D. L.; SANDERS, S. A. Epilepsy in dogs: review and implications for human epilepsy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 37, n. 1, p. 123-133, 2023.

CHARALAMBOUS, M.; SHIVAPOUR, S. K.; BRODBELT, D. C.; VOLK, H. A. Antiepileptic drugs' tolerability and safety—a systematic review and meta-analysis of adverse effects in dogs. *BMC Veterinary Research*, v. 12, p. 79, 2016.

CHOI, S. (Ed.). *Encyclopedia of Signaling Molecules*. 2. ed. Switzerland: Springer International Publishing AG, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-67199-4>.

COLLINA, S. et al. Peptides as therapeutic agents: challenges and opportunities in the green transition era. *Molecules*, v. 28, n. 20, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules28207165>.

CUNHA, A. O. S.; MORTARI, M. R.; OLIVEIRA, L.; CAROLINO, R. O. G.; COUTINHO-NETTO, J.; DOS SANTOS, W. F. Anticonvulsant effects of the wasp *Polybia ignobilis* venom on chemically induced seizures and action on GABA and glutamate receptors. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, v. 141, p. 50-57, 2005.

DE RISIO, L.; BHATTI, S.; MUÑANA, K.; et al. International veterinary epilepsy task force consensus proposal: diagnostic approach to epilepsy in dogs. *BMC Veterinary Research*, v. 11, n. 148, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0462-1>.

DOS ANJOS, L. Avaliação da atividade antiepiléptica e neuroproteção do peptídeo Occidentalina-1202 isolado da peçonha da vespa social *Polybia occidentalis*. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

DOS ANJOS, L. C. Avaliação antiepiléptica e neuroprotetora de dois peptídeos sintetizados a partir da Occidentalina-1202 isolada da vespa social *Polybia occidentalis*. 2017.

DOS ANJOS, L. C. Avaliação da atividade antiepiléptica e da expressão neuronal de c-fos de dois peptídeos sintetizados a partir da Occidentalina-1202 isolada da vespa social *Polybia occidentalis*. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

ELNAWASANY, Mohamed; BASIOUNY, Mohamed; ELGAMMAL, Tarek. Cardiac dysrhythmia in drug-resistant epileptic children. *Tanta Medical Journal*, v. 51, p. 55-61,

ERLEN, A.; POTSCHKA, H.; VOLK, H. A.; SAUTER-LOUIS, C.; O'NEILL, D. G. Occurrence of seizures in dogs under primary veterinary care in the UK: prevalence and risk factors. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 32, p. 1665-1676, 2018. DOI: 10.1111/jvim.15290.

FALCO-WALTER, J. Epilepsy—definition, classification, pathophysiology, and epidemiology. *Seminars in Neurology*, v. 40, n. 6, p. 617-623, 2020.

FINNEGAN, S. L.; VOLK, H. A.; ASHER, L.; DALEY, M.; PACKER, R. M. A. Investigating the potential for seizure prediction in dogs with idiopathic epilepsy: owner-reported prodromal changes and seizure triggers. *Veterinary Record*, 2020.

FISCHER, A.; HÜLSMEYER, V. I.; MUNOZ SCHMIEDER, V. P. Cyclooxygenase-2 inhibition as an add-on strategy in drug resistant epilepsy—a canine translational study. *Frontiers in Veterinary Science*, v. 9, 2022. DOI: 10.3389/fvets.2022.864293.

FISHER, R. S.; VAN E. B., W.; BLUME, W.; et al. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*, v. 46, n. 4, p. 470-472, 2005.

FORBES, J.; KRISHNAMURTHY, K. Peptide - Biochemistry. *StatPearls*, 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562260/>.

GARCÍA-BELENGUER, S.; GRASA, L.; VALERO, O.; PALACIO, J.; LUÑO, I.; ROSADO, B. Gut microbiota in canine idiopathic epilepsy: effects of disease and treatment. *Animals*, v. 11, n. 11, p. 3121, 2021. DOI: 10.3390/ani11113121.

HAMED, S. A. Antiepileptic drugs influences on body weight in people with epilepsy. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, v. 8, n. 1, p. 103-114, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1586/17512433.2015.991716>.

HAMERS, M. F. N.; PLONEK, M.; BHATTI, S. F. M.; BERGKNUT, N.; DIAZ ESPINEIRA, M. M.; SANTIFORT, K. M.; MANDIGERS, P. J. J. Quality of life in dogs with idiopathic epilepsy and their owners with an emphasis on breed—A pilot study. *Frontiers in Veterinary Science*, v. 9, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.1107315>.

HÜLSMEYER, V.; ZIMMERMANN, R.; BRAUER, C.; SAUTER-LOUIS, C.; FISCHER, A. Epilepsy in Border Collies: Clinical Manifestation, Outcome, and Mode of Inheritance. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, Munich, v. 24, n. 2, p. 171-178, 2010.

IONUT, V. et al. Exenatide treatment alone improves  $\beta$ -cell function in a canine model of pre-diabetes. *PLoS ONE*, v. 11, n. 7, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158703>.

IONUT, V.; ZHENG, D.; STEFANOVSKI, D.; BERGMAN, R. N. Exenatide can reduce glucose independent of islet hormones or gastric emptying. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, v. 295, n. 2, p. E269-E277, ago. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90222.2008>.

JIANG, J.; YU, Y. *Pharmacologically targeting transient receptor potential channels for seizures and epilepsy: emerging preclinical evidence of druggability*. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 244, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2023.108384>.

LERCHE, H.; SHAH, M.; BECK, H.; NOEBELS, J.; JOHNSTON, D.; VINCENT, A. Ion channels in genetic and acquired forms of epilepsy. *The Journal of Physiology*, v. 591, 2013. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.240606>.

LÖSCHER, W. Dogs as a natural animal model of epilepsy. *Frontiers in Veterinary Science*, v. 9, p. 928009, jun. 2022. DOI: 10.3389/fvets.2022.928009.

LÖSCHER, W. The holy grail of epilepsy prevention: Preclinical approaches to antiepileptogenic treatments. *Neuropharmacology*, v. 167, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.04.011>.

LIU, Z.; THERGARAJAN, P.; ANTONIC-BAKER, A.; et al. Cardiac structural and functional abnormalities in epilepsy: a systematic review and meta-analysis. *Epilepsia Open*, v. 8, n. 1, p. 46–59, 2023. DOI: 10.1002/epi4.12692. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/epi4.12692>.

MCGRATH, S.; BARTNER, L. R.; RAO, S.; PACKER, R. A.; GUSTAFSON, D. L. Randomized blinded controlled clinical trial to assess the effect of oral cannabidiol administration in addition to conventional antiepileptic treatment on seizure frequency in dogs with intractable idiopathic epilepsy. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 254, n. 11, p. 1301-1308, 2019. DOI: 10.2460/javma.254.11.1301.

MCGRATH, S.; BARTNER, L. R.; RAO, S.; PACKER, R. A.; GUSTAFSON, D. L. Randomized blinded controlled clinical trial to assess the effect of oral cannabidiol administration in addition to conventional antiepileptic treatment on seizure frequency in dogs with intractable idiopathic epilepsy. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 254, n. 11, p. 1301-1308, 2019.

MESRAOUA, B.; BRIGO, F.; LATTANZI, S.; ABOU-KHALIL, B.; AL HAIL, H.; ASADI-POOYA, A. A. Epilepsia resistente a medicamentos: definição, fisiopatologia e tratamento. *Journal of the Neurological Sciences*, v. 452, p. 120766, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jns.2023.120766>.

MEYER, C.; KETTNER, A.; HOCHENEGG, U.; RUBI, L.; HILBER, K.; KOENIG, X.; BOEHM, S.; HOTKA, M.; KUBISTA, H. On the origin of paroxysmal depolarization shifts: the contribution of Cav1.x channels as the common denominator of a polymorphous neuronal discharge pattern. *Neuroscience*, v. 468, p. 265-281, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2021.05.011>.

MONTEIRO, R.; ADAMS, V.; KEYS, D.; PLATT, S. R. Canine idiopathic epilepsy: prevalence, risk factors and outcome associated with cluster seizures and *status epilepticus*. *Journal of Small Animal Practice*, v. 53, n. 9, p. 526-530, 2012.

MORTARI, M. R. Atividade neurobiológica e caracterização química da peçonha da vespa social *Polybia occidentalis* (Hymenoptera, Vespidae): identificação de peptídeos antinociceptivos e anticonvulsivantes. 2007. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

MORTARI, M. R. et al. Anticonvulsant and behavioural effects of the denatured venom of the social wasp *Polybia occidentalis* (Polistinae, Vespidae). *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, v. 97, p. 289-295, 2005.

MORTARI, M. R.; CUNHA, A. O. S.; DOS ANJOS, L. C.; et al. A new class of peptides from wasp venom: a pathway to antiepileptic/neuroprotective drugs. *Brain Communications*, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1093/braincomms/fcad016>.

MUÑANA, K. R. Management of refractory epilepsy. *Topics in Companion Animal Medicine*, v. 28, n. 2, p. 67-71, 2013.

MUSTEATA, M.; MOCANU, D.; STANCIU, G.; ARMAȘU, M.; SOLCAN, G. Distúrbios do sistema nervoso autônomo cardíaco interictal em cães com epilepsia idiopática. *Revista Veterinária*, v. 228, p. 41-45, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2017.10.008>.

NASS, R. D.; HAMPEL, K. G.; ELGER, C. E.; SURGES, R. Blood pressure in seizures and epilepsy. *Frontiers in Neurology*, v. 10, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00501>.

PALLONE, T. L.; KHURANA, S.; CAO, C. Voltage-dependent calcium channels: structure and function (CACNA). In: *Encyclopedia of Signaling Molecules*. Springer, Cham, 1 jun. 2018, p. 5942-5949. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-67199-4\\_145](https://doi.org/10.1007/978-3-319-67199-4_145).

PARKES, D. G.; MACE, K. F.; TRAUTMANN, M. E. Discovery and development of exenatide: the first antidiabetic agent to leverage the multiple benefits of the incretin

hormone, GLP-1. *Expert Opinion on Drug Discovery*, v. 8, n. 2, p. 219-244, 2013. Disponível em: [informahealthcare.com](http://informahealthcare.com).

PARKES, D.; JODKA, C.; SMITH, P.; NAYAK, S.; RINEHART, L.; GINGERICH, R.; CHEN, K.; YOUNG, A. Pharmacokinetic actions of exendin-4 in the rat: comparison with glucagon-like peptide-1. *Drug Development Research*, [s. l.], v. 53, n. 3, p. 260-267, 2001. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ddr.1113>.

PATTERSON, E. E. Canine epilepsy: an underutilized model. *ILAR Journal*, v. 55, p. 182-186, 2014. DOI: 10.1093/ilar/ilu021.

PATTERSON, E. E. Epileptogenesis and companion animals. *Topics in Companion Animal Medicine*, v. 28, n. 1, p. 42–45, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1053/j.tcam.2013.06.010>.

PODELL, M.; VOLK, H. A.; BERENDT, M.; LÖSCHER, W.; MUÑANA, K.; PATTERSON, E. E.; PLATT, S. R. ACVIM consensus statement on seizure management in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 30, n. 2, p. 477-490, 2016. DOI: 10.1111/jvim.13841.

POTSCHKA, H.; FISCHER, A.; LÖSCHER, W.; VOLK, H. A. Pathophysiology of drug-resistant canine epilepsy. *The Veterinary Journal*, v. 296-297, p. 105990, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2023.105990>.

POTSCHKA, Heidrun; FISCHER, Andrea; LÖSCHER, Wolfgang; et al. International Veterinary Epilepsy Task Force consensus proposal: outcome of therapeutic interventions in canine and feline epilepsy. *BMC Veterinary Research*, [s. l.], v. 11, p. 177, 2015. DOI: 10.1186/s12917-015-0465-y. Disponível em: <https://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-015-0465-y>.

ROZENTAL, A. J.; WEISBECK, B. G.; ALVARENGA, I. C.; GUSTAFSON, D. L.; KUSICK, B. R.; RAO, S.; BARTNER, L. R.; MCGRATH, S. The efficacy and safety of cannabidiol as adjunct treatment for drug-resistant idiopathic epilepsy in 51 dogs: A double-blinded crossover study. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 37, n. 6, p. 2291-2300, 2023. DOI: 10.1111/jvim.16912.

RYAN, G. J.; MONIRI, N. H.; SMILEY, D. D. Clinical effects of once weekly exenatide for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *American Journal of Health-System Pharmacy*, v. 70, n. 13, p. 1123-1131, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.2146/ajhp120168>.

SANDERS, S. The biology of seizures. In: SANDERS, S. *Seizures in Dogs and Cats*. 1. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2015. p. 12-45.

SANTILLI, Roberto A.; MOÏSE, N. Sydney; PARIAUT, Romain; PEREGO, Manuela. *Electrocardiography of the dog and cat: diagnosis of arrhythmias*. 2. ed. Milano: Edra S.p.A., 2018. ISBN 978-88-214-4784-6.

SAUTER, M.; UHL, P.; BURHENNE, J.; HAEFELI, W. E. Ultra-sensitive bioanalysis of the therapeutic peptide exenatide for accurate pharmacokinetic analyses at effective plasma concentrations utilizing UPLC-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, v. 10, n. 3, p. 233-239, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2020.02.008>.

SCHEFFER, I. E. et al. ILAE classification of the epilepsies: position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*, v. 58, n. 4, p. 512-521, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1111/epi.13709>.

SHAH, K.; SEELEY, S.; SCHULZ, C.; FISHER, J.; RAO, S. G. Calcium channels in the heart: disease states and drugs. *Cells*, v. 11, n. 6, p. 943, 2022. <https://doi.org/10.3390/cells11060943>.

SHAH, R. R. Cardiac effects of antiepileptic drugs. In: PANAYIOTOPOULOS, C. P. (Ed.). *Atlas of Epilepsies*. London: Springer-Verlag, 2010. p. 1480-1486. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-1-84882-128-6\\_221](https://doi.org/10.1007/978-1-84882-128-6_221).

SIMMS, B. A.; ZAMPONI, G. W. Neuronal voltage-gated calcium channels: structure, function, and dysfunction. *Neuron*, v. 82, n. 2, p. 24-45, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.03.016>.

SMALLWOOD, T. B.; CLARK, R. J. Advances in venom peptide drug discovery: where are we at and where are we heading? *Expert Opinion on Drug Discovery*, [s. l.], 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/17460441.2021.1922386>

TILLEY, L. P.; SMITH, F. W. K. *Manual of Canine and Feline Cardiology*. 5. ed. Elsevier, 2016.

TREVISAN, Y. P. A.; FREITAS, M. S.; FREITAS, M. N.; KONRAD, J.; BORTOLINI, J.; SCHIPIURA, A. C.; FREITAS, A. F. B.; PAZZINI, S. S.; ALMEIDA, A. B. P. F.; SOUSA, V. R. F. Influence of idiopathic epilepsy on blood pressure and electrocardiography in dogs treated with phenobarbital. *Vet World*, v. 17, n. 2, p. 356-360, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.14202/vetworld.2024.356-360>.

WANG, L. et al. Therapeutic peptides: current applications and future directions. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, v. 7, n. 48, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00904-4>.

WANG, L.; DING, J.; ZHU, C.; GUO, B.; YANG, W.; HE, W.; LI, X.; WANG, Y.; LI, W.; WANG, F.; SUN, T. Semaglutide attenuates seizure severity and ameliorates cognitive dysfunction by blocking the NLR family pyrin domain containing 3 inflammasome in pentylenetetrazole-kindled mice. *International Journal of Molecular Medicine*, v. 48, p. 219, 2021. DOI: 10.3892/ijmm.2021.5052.

WEHRWEIN, E. A.; ORER, H. S.; BARMAN, S. M. Overview of the anatomy, physiology, and pharmacology of the autonomic nervous system. *Comprehensive Physiology*, v. 6, n. 3, p. 1239-1278, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cphy.c150037>.

YANG, X. et al. Animal venom peptides as a treasure trove for new therapeutics against neurodegenerative disorders. *Current Medicinal Chemistry*, v. 26, n. 25, p. 4749-4774, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/0929867325666181031122438>

## ANEXOS

## ANEXO I – PARECER DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO ANIMAL (CEUA)



**Universidade de Brasília**  
 Instituto de Ciências Biológicas  
 Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 03 de setembro de 2020.

**DECLARAÇÃO**

Declaramos que o projeto intitulado “**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-EPILEPTICA DA “NEUROESPINA” EM EPILEPSIAS REFRACTARIAS EM CÃES**”, Protocolo n.º 010/2020, sob responsabilidade da Professora Dra. Ana Carolina Mortari, foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de *Canis familiaris* (20 animais). A presente declaração é válida pelo período de: 03/09/2020 a 25/09/2024.



Dr. José Luiz Jivago de Paula Rólo  
 Coordenador da CEUA – UnB





\*Este documento se refere à avaliação ética do projeto apresentado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.

## ANEXO II – TERMO DE CONSENTIMENTO PARA PARTICIPAÇÃO NA PESQUISA



**Universidade de Brasília**  
**Faculdade de Agronomia e Veterinária**  
**Hospital Veterinário**

### Termo de consentimento

Eu, \_\_\_\_\_ portador do RG \_\_\_\_\_, autorizo a aplicação experimental subcutânea de “NEUROVESPINA”, como forma de tratamento para crises epiléticas do animal sob minha responsabilidade cujo nome é \_\_\_\_\_ com idade de \_\_\_\_\_ anos, da raça \_\_\_\_\_ e com peso de \_\_\_\_\_ Kg. Número de identificação da ficha do Hospital Veterinário da UnB: \_\_\_\_\_. O estudo é vinculado ao projeto de pesquisa científica intitulado “Avaliação da atividade antiepilética da “Neurovespina” em epilepsias refratárias em cães”, coordenado pelas pesquisadoras Profa. Márcia Mortari e Profa. Ana Carolina Mortari, sob a qual recebi informações.

Declaro que os dados farão parte de um estudo científico na Universidade de Brasília – UnB e que os dados obtidos serão passíveis de publicação sem associação direta com o meu animal. Fui também informado que posso retirar meu animal do estudo a qualquer momento, sem qualquer ônus.

Brasília, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

---

Tutor Responsável