



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE NEUROPSIQUIATRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

RAISA FERREIRA COSTA

**UM NOVO MODELO ANATÔMICO-FUNCIONAL: EFEITO DO TOPIRAMATO  
SOBRE A DEGRANULAÇÃO DE MASTÓCITO INDUZIDA POR CAPSAICINA  
NA DURA-MÁTER DE RATO**

Recife  
2020

RAISA FERREIRA COSTA

**UM NOVO MODELO ANATÔMICO-FUNCIONAL: EFEITO DO TOPIRAMATO  
SOBRE A DEGRANULAÇÃO DE MASTÓCITO INDUZIDA POR CAPSAICINA  
NA DURA-MÁTER DE RATO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas

**Área de concentração:**  
Biotecnologia.

**Orientador:** Prof. Dr. Marcelo Moraes Valença.

Recife  
2020

Catálogo na Fonte:  
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Costa, Raisal Ferreira

Um novo modelo anatômico-funcional : efeito do topiramato sobre a degranulação de mastócito induzida por capsaicina na dura-mater de rato / Raisal Ferreira Costa. - 2020.

64 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Moraes Valença.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Recife, 2020.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Neurologia. 2. Sistema nervoso – Doenças. 3. Enxaqueca. I. Valença, Marcelo Moraes (orientador). II. Título.

616.8

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2021-072

RAISA FERREIRA COSTA

**UM NOVO MODELO ANATÔMICO-FUNCIONAL: EFEITO DO TOPIRAMATO  
SOBRE A DEGRANULAÇÃO DE MASTÓCITO INDUZIDA POR CAPSAICINA  
NA DURA-MÁTER DE RATO**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
ciências biológicas da Universidade  
Federal de Pernambuco, como  
requisito para a obtenção do título de  
mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 20/10/2020.

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Marcelo Moraes Valença (Orientador)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof. Dr. Rubem Carlos Araújo Guedes  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Daniella Araújo de Oliveira  
Universidade Federal de Pernambuco

---

*Dedico esse trabalho ao curso de Ciências Biológicas da UFPE, à minha família e às pessoas com quem convivi profissionalmente ao longo desses anos. A experiência de uma produção compartilhada com amigos e orientador foi a melhor experiência de minha formação acadêmica.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado saúde e forças para superar as dificuldades.

Ao meu orientador, Marcelo Moraes Valença, pelos incentivos, correções e conselhos, que me guiou em todo o trabalho com muita sabedoria, e me deu todas as coordenadas que foram essenciais neste trabalho.

A minha mãe, Sônia Helena Ferreira Costa, que em todos os momentos esteve do meu lado, me fortaleceu nos momentos de cansaço, e comemorou comigo momentos de vitória.

Ao meu pai, Emmanuel Ferreira de Carvalho, que como anjinho se fez presente com todo amor, carinho e suporte de sempre. Grandes heróis deixam grandes saudades.

Aos meus irmãos, pela constante dedicação e contribuição na minha formação.

Agradeço à professora Sandra Lopes do Laboratório de Anatomia (anexo), que disponibilizou o laboratório para os experimentos e o biotério para manutenção dos ratos.

Agradeço ao biotério de Nutrição, pelo concebimento dos ratos para a minha pesquisa.

Agradeço ao laboratório de Histotecnologia e de Análises de Imagens e Morfometria da Pós-Graduação em Saúde Translacional da UFPE, principalmente a Silvania Paz, pela Captura de imagens e realização das lâminas.

Agradeço a equipe de Neurociência, principalmente a Emanuela Paz, pelo suporte emocional, técnico, protocolos e publicação de trabalhos.

Agradeço as professoras Manuela Freitas e Daniela Oliveira, pelas correções de artigos e trabalhos, e por todo conhecimento adquirido durante essa jornada.

Agradeço ao professor Rubem Guedes pela paciência e conhecimento de técnica de gavagem e da Depressão Alastrante Cortical.

Agradeço ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológica, aos funcionários, principalmente Adenilda, por toda a ajuda durante o processo seletivo e conclusão acadêmica. E por fim, agradeço aos professores das disciplinas cursadas, pela contribuição do conhecimento na minha formação.

A UFPE que oportunizou a janela que hoje vislumbro um horizonte superior, elevado pela acendrada confiança no mérito e ética aqui presente.

Aos meus amigos e familiares, pelo amor, incentivo e apoio incondicional. A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (Facepe) pelo apoio financeiro durante o período de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

E a todos que direta e indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada.

*"O que se vê depende do que acontece no cérebro." (RUSSELL, 1997)*

## RESUMO

A migrânea é uma doença neurológica extremamente incapacitante devido aos seus sintomas relacionados, porém os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na ativação de uma crise de migrânea permanecem ainda desconhecidos. Modelos experimentais mimetizam a fisiopatologia através de estimulações químicas e elétricas. O topiramato é um importante fármaco usado na prevenção da migrânea, mas seu mecanismo de ação ainda não é bem conhecido. Para entender melhor a inflamação estéril após exposição da dura-máter bilateralmente, criamos um modelo experimental para estudar os mecanismos de ação do topiramato e da capsaicina na degranulação de mastócitos. Trinta e cinco ratos, machos (n=28) e um grupo de fêmeas (n=7), com 60 dias de idade foram divididos em dois grupos: topiramato por via oral (20 mg/kg/dia, gavagem/10 dias) e topiramato agudo *in situ* na dura-máter (10-3M, 20 µl). Os animais foram anestesiados e janelas cranianas entre a sutura coronal e o lambda nos hemisférios foram realizadas com *drill*, para expor bilateralmente a dura-máter. No lado direito foi colocado capsaicina 10<sup>-3</sup> M (80 µl) e no lado esquerdo fluido intersticial sintético (SIF) (80 µl). A porcentagem de mastócitos degranulados foi quantificada após a remoção da dura-máter, pela coloração de azul de toluidina (0,1%). A análise estatística foi feita pelo teste Kolmogorov-Smirnov, posterior teste t e ANOVA. Houve uma maior quantidade de mastócitos degranulados na dura-máter do hemisfério estimulado com capsaicina quando comparado com o lado contralateral controle, tanto em fêmeas (18,43±3,00% *versus* 73,11±2,67%; p<0,001) quanto nos machos (27,21±1,91% *versus* 75±2,55%; p<0,001) como não houve diferença estatística, utilizamos apenas machos. No grupo tratado com topiramato por 10 dias houve uma menor quantidade de células degranuladas pela capsaicina (22,80%±1,17 *versus* 77,00±1,32, p<0,001). O topiramato colocado *in situ* concomitante à capsaicina também atenuou o processo de degranulação dos mastócitos na dura-máter (35,74±1,69% controle *versus* 44,52±0,82% capsaicina + topiramato; p<0,001). Este estudo conseguiu demonstrar que a capsaicina é um método químico de indução e estimulação dos mastócitos e que o topiramato atenua o efeito da capsaicina.

Palavras-Chave: Enxaqueca. Fisiopatologia. Topiramato. Capsaicina. Substâncias endógenas.

## ABSTRACT

Migraine is an extremely disabling neurological disease due to its related symptoms, but the pathophysiological mechanisms involved in the activation of a migraine crisis are still unknown. Experimental models mimic the pathophysiology through chemical and electrical stimulations. Topiramate is an important drug used to prevent migraine, but its mechanism of action is still not well known. A sterile inflammation of the dura mater is believed to trigger pain in the migraine. To better understand the sterile inflammation after exposing the dura mater bilaterally, we created an experimental model for the action mechanisms of topiramate and capsaicin in mast cell degranulation. 35 male (n=28) and one group of females (n=7) 60-day-old rats were divided in 2 groups: topiramate (20mg/kg/day, gavage/10 days) and topiramate *in situ* on the dura mater (10<sup>-3</sup> M, 20μl). The animals were anesthetized and cranial windows between the suture coronal and the lambda in the hemispheres were performed with a drill, to bilaterally expose the dura mater. Capsaicin 10<sup>-3</sup> M (80μl) was placed on the rightside and synthetic interstitial fluid (SIF) (80 μl) on the left side. The percentage of degranulated mast cells was quantified after removal of the dura mater, by staining toluidine blue (0.1%). Statistical analysis was performed using the test Kolmogorov-Smirnov, posterior t test and ANOVA. There was a greater amount of degranulated mast cells in the dura mater of the hemisphere stimulated with capsaicin when compared to the contralateral control side, both in females (18.43 ± 3,00% *versus* 73.11 ± 2.67%; p = 0.0001) and in males (27.21 ± 1,91% *versus* 75.00 ± 2,55%; p < 0.001) as there was no statistic, we used only males. In the group treated with topiramate for 10 days, there was a smaller amount of degranulated cells by capsaisin (22.80 ± 1.17% *versus* 77.00 ± 1.32%, p < 0.001). The topiramate placed *in situ* concomitantly with capsaicin also reduced the mast cell degranulation process in the dura mater (35.74 ± 1.69% control *versus* 44.52 ± 0.82% capsaicin + topiramate; p < 0.001). This study was able to demonstrate that capsaicin is a chemical method of inducing and stimulating mast cells and that topiramate reduces the effect of capsaicin. Keywords: Migraine. Physiopathogenesis. Drugs. Endogenous substances.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1-</b>	Desenho representativo do modelo <i>in vivo</i> das janelas cranianas para exposição da dura-máter .....	26
<b>Figura 2-</b>	Drill utilizado para a raspagem do crânio e realização das janelas cranianas e pipeta para dosagem da solução (SIF- etanol; Capsaicina e Topiramato) .....	28
<b>Figura 3-</b>	Análise microscópica dos mastócitos nas amostras da dura-máter .....	28
<b>Figura 4-</b>	Dados do grupo controle estimulados com capsaicina entre fêmeas (n=7) e machos (n=7) .....	30
<b>Figura 5-</b>	Comparação dos grupos tratados previamente por gavagem em Gavagem controle (machos; n=7) e em Topiramato crônico (machos; n=7) .....	31
<b>Figura 6-</b>	Comparação do grupo agudo tratado <i>in situ</i> com topiramato em concomitante à capsaicina (machos; n=7) .....	31
<b>Figura 7-</b>	Indução da capsaicina e prevenção pelo topiramato nos eventos principais da dor de cabeça .....	32

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AEDs</b>	Drogas antiepilépticas
<b>AITC</b>	Alil Isotiocianato
<b>AMPA</b>	<sup>2</sup> ácidoAlfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
<b>CGRP</b>	Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Cálcio
<b>DAC</b>	Depressão Alastrante Cortical
<b>DA</b>	Depressão Alastrante
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>GABA</b>	Ácido gama-aminobutírico
<b>IL-6</b>	Interleucina-6
<b>IN</b>	Inflamação Neurogênica
<b>KCl</b>	Cloreto de Potássio
<b>Na</b>	Sódio
<b>NO</b>	Óxido Nítrico
<b>NMDA</b>	Ácido N-Metil D-Aspártico
<b>SIF</b>	Fluido Intersticial Sintético
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>SP</b>	Substância P
<b>TCC</b>	Complexo trigeminocervical
<b>TPM</b>	Topiramato
<b>TRPV1</b>	Receptor de Potencial Transitório Vanilóide tipo 1
<b>TRPA1</b>	Receptor de Potencial Transitório Anquirina tipo 1

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
1.2	JUSTIFICATIVA.....	15
1.3	HIPÓTESE.....	16
1.4	OBJETIVO.....	17
<b>1.4.1</b>	<b>Objetivos gerais.....</b>	<b>17</b>
<b>1.4.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>18</b>
2.1	ENXAQUECA OU MIGRÂNEA .....	18
2.2	DURA-MÁTER. ....	19
2.3	MASTÓCITOS .....	20
2.4	MODELOS EXPERIMENTAIS .....	20
2.5	CAPSAICINA.....	21
2.6	FÁRMACOS .....	23
<b>2.6.1</b>	<b>Drogas anti-epilépticas.....</b>	<b>23</b>
2.6.1.1	Topiramato .....	23
<b>3</b>	<b>MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
3.1	ANIMAIS .....	25
3.2	PROCEDIMENTOS ANESTÉSICOS .....	25
3.3	MODELO <i>IN VIVO</i> .....	25
3.4	GRUPOS E TRATAMENTOS .....	26
<b>3.4.1</b>	<b>Grupo controle.....</b>	<b>26</b>
3.4.1.1	Fêmeas .....	26
3.4.1.2	Machos. ....	26
3.4.1.3	Gavagem controle .....	27
<b>3.4.2</b>	<b>Grupo de tratamento.....</b>	<b>27</b>
3.4.2.1	Topiramato Crônico .....	27
3.4.2.2	Topiramato Agudo .....	27
3.5	ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA DOS MASTÓCITOS .....	28
3.6	ANÁLISE DOS DADOS .....	29

3.7	CONFLITO DE INTERESSES.....	29
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
4.1	ARTIGO 1: ACTION OF CAPSAICIN IN THE DEGRANULATION OF MAST CELLS IN DURA MATER OF RATS: LITERATURE REVIEW .....	33
4.2	ARTIGO 2: EFFECT OF CAPSAICIN AND TOPIRAMATE ON MAST CELL GRANULATION IN RAT INTRACRANIAL DURA MATER: NEW <i>IN VIVO</i> MODEL .....	37
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO. ....</b>	<b>48</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>51</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>52</b>
	<b>APÊNDICE A - QUANTIFICAÇÃO DE MASTÓCITOS POR AMOSTRAS DE DURA-MÁTER EM RATOS.....</b>	<b>59</b>
	<b>ANEXO A - PHARMACOLOGICAL MECHANISM OF TOPIRAMATE IN THE PROPHYLAXIS AND TREATMENT OF MIGRAINE: A REVIEW.....</b>	<b>61</b>
	<b>ANEXO B - OF THE AVAILABLE TRIPTANS, WHICH SHOULD BE CHOSEN AND HOW SHOULD THEY BE USED?.....</b>	<b>62</b>
	<b>ANEXO C - HISTOMORPHOMETRIC ANALYSIS OF MAST CELLS IN DIFFERENT REGIONS OF HUMAN INTRACRANIAL DURA MATER.....</b>	<b>63</b>
	<b>ANEXO D - COMITÉ DE ÉTICA .....</b>	<b>64</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A enxaqueca foi considerada durante muito tempo como um distúrbio vascular, associado como o local de origem, os vasos sanguíneos cerebrais (HO, et al. 2010; CHARLES, 2013). Atualmente é considerada um distúrbio neurovascular, pois os desencadeantes da enxaqueca causam disfunção bioeletroquímica cerebral primária, envolvendo também áreas da dura-máter e do gânglio do nervo trigêmeo, havendo uma dilatação dos vasos sanguíneos cranianos que são inervados, na sua maioria, por fibras sensoriais do nervo trigêmeo (GOADSBY et al., 2017).

Estímulos químicos e elétricos induzem a ativação dessas fibras sensoriais levando a uma liberação de peptídeos vasoativos, como o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e, conseqüentemente ocorre degranulação de mastócitos, liberação de histamina e óxido nítrico (NO). Essa interação mastócito-nervo é sugerida como uma das principais causas para a inflamação neurogênica (SUZUKI, 1988; DONG et al., 2014)

Em estudos com animais experimentais, para avaliar a fisiopatogênese da enxaqueca, tratamento com agentes inflamatórios químicos, como cloreto de potássio (KCl) e capsaicina, mimetiza a despolarização neuronal associada à ativação do trigêmeo. Essa despolarização causa um aumento na liberação de CGRP, e ativação dos mastócitos, simulando assim a inflamação neurogênica, aumentando a permeabilidade vascular da dura-máter de ratos (SILBERSTEIN, 2006; LEVY, 2007; MARTELLA et al., 2008; ZHOU et al., 2010; LAURITZEN et al., 2011; LUKÁCS et al., 2015; MALHOTRA, 2016).

A capsaicina é um componente ativo da pimenta que induz a liberação de CGRP de maneira dependente da concentração, por meio da ativação dos *Receptores de Potencial Transitório Vanilóide* do tipo 1 (TRPV1), presentes nos terminais axônicos e nos mastócitos (JANSEN et al., 1990; JANSEN-OLESEN et al., 1996). A liberação é significativamente aumentada pelas soluções de  $Ca^{2+}$ , uma vez que a abertura do TRPV1, um canal catiônico não seletivo, leva ao aumento no  $Ca^{2+}$  intracelular, facilitando a degranulação de mastócitos e despolarização dos neurônios e conseqüente vasodilatação das artérias (ERDELYI et al., 1987).

O alívio da dor da enxaqueca ocorre por bloqueadores e antagonistas seletivos do receptor CGRP que reduzem a vasodilatação e a inflamação

neurogênica e conferem benefício clínico na enxaqueca. Como por exemplo, anti-inflamatórios bloqueadores dos receptores adrenérgicos, antidepressivos, anticonvulsivantes (BERGER et al., 2012; SILBERSTEIN et al., 2012). Dentre estes, o topiramato, uma droga bastante eficaz no tratamento preventivo da enxaqueca, é um dos mais conhecidos, possuindo uma variedade de mecanismos de ação como a sua inibição no disparo excitatório dos neurônios, bloqueando os canais de sódio ( $\text{Na}^+$ ) e de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), e ajudando a diminuir a liberação de neurotransmissores e peptídeos vasoativos (WHITE, 2005; ROSAS et al., 2018).

Diante do exposto, o objetivo desse estudo é criar um modelo experimental *in vivo* para avaliar os mecanismos de ação do topiramato e da capsaicina na degranulação de mastócitos da dura-máter de ratos.

## 1.2 JUSTIFICATIVA

A enxaqueca é um distúrbio neurológico complexo e crônico que se manifesta como crises de dores recorrentes de moderada a forte intensidade, que acomete grande parte da população. A dor na enxaqueca está associada a náuseas e/ou maior sensibilidade à luz e ao som, afetando negativamente a qualidade de vida do indivíduo, podendo desencadear uma série de complicações, causar déficits funcionais no sistema nervoso central, acompanhada por sintomas afetivos e cognitivos. Para o tratamento preventivo da enxaqueca são utilizadas classes de drogas como o topiramato, que podem atuar nos vasos sanguíneos e nervos periféricos, resultando na inibição da vasodilatação. Assim diante do exposto, o presente trabalho visa um estudo mais aprofundado sobre os mecanismos de ação da capsaicina na indução da degranulação de mastócitos e do topiramato, demonstrando seu efeito protetor e eficaz na inibição das ações da capsaicina, reduzindo a ativação dos mastócitos, utilizando um modelo animal *in vivo* com ratos para permitir uma melhor compreensão dos mecanismos fisiopatogênicos da enxaqueca.

### 1.3 HIPÓTESE

O modelo experimental *in vivo* é factível para estudar a fisiopatologia da enxaqueca e avaliar os mecanismos de ação do topiramato e da capsaicina na degranulação de mastócitos da dura-máter de ratos.

## 1.4 OBJETIVOS

### 1.4.1 Objetivo geral

·Avaliar se o modelo experimental *in vivo* é factível para estudar a fisiopatologia da enxaqueca e para avaliar os mecanismos de ação do topiramato e da capsaicina na degranulação de mastócitos da dura-máter de ratos

### 1.4.2 Objetivos específicos

Desenvolver um modelo experimental para avaliar a fisiopatologia da enxaqueca via degranulação de mastócito;

Avaliar a análise histomorfológica dos mastócitos;

Avaliar a percentagem de mastócitos degranulados no grupo induzido por capsaicina e no grupo tratado de forma preventiva e *in situ* com topiramato.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 ENXAQUECA OU MIGRÂNEA

O processo fisiopatogênico da enxaqueca está relacionado a inflamação neurogênica que pode ser afetada por diversos fatores, como química, elétrica e ambiental e ao sistema trigeminal. A enxaqueca é um distúrbio neurológico muito prevalente e incapacitante, com crises espontâneas de dor de cabeça (TFELT-HANSEN et al., 2000). O sistema trigeminovascular, constituído por vasos cranianos, dura-máter e estruturas neurais trigeminais, está diretamente relacionado com a fisiopatologia da enxaqueca, com a depressão alastrante cortical (DAC) e seus sintomas relacionados (BERNSTEIN; BURSTEIN, 2012; KASPER, 2016). Durante o DAC, ocorre a ativação das aferências trigeminais que induzem a vasodilatação das artérias meníngeas pela liberação de neuropeptídeos (CGRP). Assim, acredita-se que o DAC seja o correlato fisiopatológico dos sintomas neurológicos na enxaqueca (LAURITZEN et al., 2011; KARATAS et al., 2013)

A depressão alastrante (DA) apresenta os mesmos distúrbios iônicos da enxaqueca, como o aumento na concentração de potássio, e redução de sódio e de cálcio extracelular e aumento da liberação de neurotransmissores (ex. glutamato) (HANSEN, NEDDERGARD, 1988; EGERT et al., 1995; LAURITZEN et al., 2011; DREIR, 2011). O glutamato está envolvido na iniciação e propagação de DAC, sua liberação ativa os receptores do ácido N-metil-D-aspartico (NMDA) estimulando a produção de NO, histamina e CGRP que possivelmente leva a despolarização sustentada. A onda de despolarização causa vasodilatação e um aumento do fluxo sanguíneo cerebral (ZHOU et al., 2010). Milner (1958) relacionou a depressão alastrante com os sintomas de enxaqueca escritos por Lashley (1941), que comprovava que os distúrbios visuais, somatossensoriais e somatomotores e auditivos durante a enxaqueca ocorre devido a uma inatividade neuronal no córtex, que progride a uma velocidade de cerca de 3 mm/min, semelhante ao que acontece na DAC (LASHLEY, 1941; LEO, 1944; MILNER, 1958; CHARLES, 2013; HANSEN, BACA, VANVALKENBURGH, 2013; CUCCHIARA et al., 2014; CHEN et al., 2015.). Drogas que são capazes de alterar os parâmetros da DA também devem influenciar a aparência e o curso de ataques de enxaqueca (MILNER, 1958).

As fases fisiopatológicas da enxaqueca incluem iniciação, ativação, transmissão nos neurônios aferentes primários e sensibilização do sistema nervoso central (SNC). A ativação dos neurônios nociceptivos dentro do complexonuclear do trigêmeo leva a uma despolarização, extravasamento de plasma e liberação de substâncias exógenas e endógenas como as citocinas (IL- 6) e neuropeptídeos vasoativos que desempenham papéis importantes na dor e na mediação de inflamações neurovasculares associadas a enxaquecas. (NEEBet al., 2011; WEATHERALL, 2015; KASPER, 2016; GOADSBY et al., 2017). A enxaqueca pode ser estimulada por vários fatores que contribuem para um aumento da excitabilidade da rede neuronal envolvendo um desequilíbrio bioeletroquímico que interfere na normalidade eletrofisiológica do córtex, hipotálamo e os núcleos do tronco encefálico (COPPOLA et al., 2014; MOULTON et al., 2014; CHONG et al., 2017; GOADSBY, 2017).

## 2.2 DURA-MÁTER

Nos últimos 10 anos, alguns estudos têm demonstrado a relação da dura-máter com a enxaqueca, demonstrando que apresenta mecanismos fisiopatológicos como alterações anormais do sistema nervoso, de neurotransmissores, neuromoduladores e neuropeptídeos (VALENÇA et al., 2009; BAUN et al., 2012; SCHUELER et al., 2013; KLINIC et al., 2015; SHELUKHINA et al., 2017).

A dura-máter é um órgão sensorial que apresenta uma rica inervação aferente e uma ampla rede de vasos sanguíneos. Essa meninge possui uma grande quantidade de fibra C do gânglio trigeminal contendo substâncias que podem estar envolvidas na modulação da dor da enxaqueca, dentre elas, CGRP (SCHUELER et al., 2013).

Estudos experimentais mostraram que o aumento da concentração de CGRP pode causar liberação de histamina na dura do rato por meio de degranulação de mastócitos. Os receptores histamínicos estão presentes nas micróglia e neurônios sensoriais, que quando expressos, regulam a degranulação dos mastócitos e essas estruturas estão intimamente implicadas na gênese da dor de cabeça. A ativação do sistema trigeminovascular, incluindo a dura-máter, aumentam os níveis plasmáticos de CGRP via fibra C devido a

interação nervo-mastócito (EFTEKHARI, EDVINSSON, 2010; ROSA, FANTOZZI, 2013; ALSTADHAUG, 2014; DONG et al., 2014).

### 2.3 MASTÓCITOS

Os mastócitos estão localizados próximos às fibras nervosas sensoriais na dura-máter do rato (BARBARA et al., 2004). Existe uma sinalização inter-axonal dos mastócitos com as fibras C relacionando tanto à fisiologia quanto às funções fisiopatológicas da dura-máter, com a enxaqueca (RICE et al., 2017). Vasodilatação, extravasamento plasmático e degranulação de mastócitos contribuem para a liberação de substâncias pró-inflamatórias na meninge resultando em dor, durante as crises de enxaqueca (GEPPETTI et al., 2012; BORAN, BOLAY, 2013; ERDENER, DALKARA, 2014).

A degranulação de mastócitos foi sugerida como um elemento importante de inflamação neurogênica, pois essas células liberam a histamina que é ativada pela liberação de CGRP nos terminais trigeminais e, acontece um feedback positivo, que por sua vez, o CGRP ativa a liberação de histamina (ROSA, FANTOZZI, 2013; ALSTADHAUG, 2014; DONG et al., 2014). Além do CGRP, a histamina também interage com o aumento de produção de NO nos mastócitos (EDVINSSON, 2001; TORE et al., 2010; KLINIC et al., 2015). Todos os três mediadores químicos contribuem para vasodilatação e IN. Assim, o CGRP, atua como vasodilatador muito potente das artérias intracranianas, ocupando posição de destaque no grupo nociceptivo na cascata de dor de enxaqueca (IRMAK et al., 2019).

### 2.4 MODELOS EXPERIMENTAIS

Os modelos experimentais têm contribuído para mimetizar a fisiopatologia da enxaqueca, utilizando de substâncias químicas para liberação de neuropeptídeos vasoativos e conseqüentemente mediadores da permeabilidade vascular das artérias cerebrais.

A técnica de janela craniana em ratos é usada para examinar o esgotamento dos neurônios sensoriais do trigêmeo e dosar a quantidade de neuropeptídeos liberados como o CGRP. No estudo de Baylie; Brayden (2011) a capsaicina apresenta a ação estimuladora de aumento de liberação de peptídeos

vasoativos (CGRP); já no estudo de Szolcsanyi (1990) demonstra o esgotamento dos neurônios sensoriais por capsaicina e a relação dos neuropeptídeos liberados na análise do diâmetro das artérias cranianas, para verificar se houve dilatação, e conseqüentemente, enxaqueca. Huang et al. (2018) observam que a estimulação química também com capsaicina influencia na liberação de CGRP avaliado imunohistoquimicamente através do anticorpo-policlonal de coelhos.

Além disso, outros modelos experimentais de janela craniana em ratos, estudam medindo o diâmetro das artérias após infusões químicas para mimetizar a fisiopatologia da enxaqueca através da vasodilatação. No artigo de Koldro e colaboradores (2019) eles realizaram infusão com alil isotiocianato (AITC) sobre a dura-máter de ratos *in vivo* e foi observado que as artérias piais dilataram significativamente. Quando a substância foi infundida intravenosamente com bloqueadores como olcegepante, HC-030031, sumatriptano e capzepina, todos inibiram a vasodilatação induzida por AITC, mas não a capzepina. O AITC causa dilatação das artérias via mecanismo dependente de CGRP e Receptor de Potencial Transitório Anquirina tipo 1 (TRPA1). O TRPA1 é um canal no endotélio das artérias cerebrais que causa vasodilatação quando ativados por CGRP.

O estudo de Peterson e seus colaboradores (2005) mediu o diâmetro das artérias piais por meio dos efeitos da hipotensão e mudanças no dióxido de carbono arterial induzida farmacologicamente por peptídeos vasoativos (CGRP) que causam hipotensão e por hemorragia foi observado que aumentou o diâmetro das artérias e, conseqüentemente, o fluxo sanguíneo.

O estudo de Hanes e seus colaboradores (2018) utiliza a janela craniana para investigar *in vivo* os efeitos da adenosina, que já foi demonstrado aumentar no plasma, e induzir vasodilatação durante ataques de enxaqueca. Sugerindo que os receptores vasculares de adenosina medeiam a vasodilatação meníngea e bloqueiam a vasodilatação produzida pelo Receptor agonista da Adenosina (CGS21680), mas não modulam a liberação sensorial de CGRP.

## 2.5 CAPSAICINA

A capsaicina é uma das substâncias químicas utilizadas em estudos com animais para ativar o sistema trigeminovascular mimetizando parte do processo fisiopatológico da enxaqueca e servindo como modelo experimental, pois está associada à liberação de neuropeptídeos sensoriais, por meio da abertura de

canais catiônicos que resulta em acúmulo intracelular de cálcio, e ativação dos mastócitos (DONERER et al., 1990). Esses mastócitos, por meio de mediadores vasoativos, contribuem para estimulação das grandes artérias cranianas resultando em inflamação neurogênica e essa inervação é fundamental para o seu envolvimento na enxaqueca (SZOLCSANYI, 1990; BAYLIE, BRAYDEN, 2011).

O receptor TRPV1 da capsaicina atua como mediador sensorial ao estresse. Após a ativação desse receptor há abertura de cálcio intracelular e saída de potássio levando a uma hiperpolarização dos neurônios do gânglio trigeminal e vasodilatação pela liberação de CGRP e substância P. Assim, os canais TRPV desempenham papéis patológicos na vasculatura tornando-se um importante mediador às respostas vasculares (THEOHARIDES et al., 1995; SULLIVAN et al., 2015; DUX et al., 2016).

A ativação dos mastócitos por capsaicina leva a degranulação e consequente liberação de substâncias pró-inflamatórias (histamina e NO). A histamina aumenta os níveis de CGRP liberados pelos neurônios da fibra C do gânglio e consequente maior percentual de mastócitos degranulados, um ciclo de *feedback* positivo, e o NO contribui para controlar a viabilidade das artérias cranianas (SHELUKHINA et al., 2015). Em estudos utilizando a capsaicina, observou-se que em animais neonatais, a estimulação química destruía as terminações nervosas peptidérgicas, demonstrando que estresses em neonatais não induz a degranulação de mastócitos, pois não apresentam uma estrutura neural consistente (DIMTRIADOU et al., 1991).

Em estudos com ratos adultos, foi demonstrado o efeito da capsaicina relacionado a alterações de histamina por dose-resposta e consequente ativação de mastócitos, observando resultados significativos de degranulação (CHENG et al., 2006). Outro estudo evidenciou que comidas com capsaicina conseguem estimular neuropeptídios, como a substância P, que podem provocar a co-liberação de CGRP, localizados no mesmo neurônio, e assim, ativando a liberação de histamina nos mastócitos, mediando a ativação dos mastócitos (FRYDAS et al., 2013). Essa conexão dos mastócitos com os neurônios sensoriais da dura-máter apresenta uma resposta bidirecional, onde sinaliza respostas com os nervos com relação ao ambiente externo e substâncias endógenas e exógenas e degranula em resposta aos sinais durais para a

imunidade do organismo (WALLENGREN, HAKÁNSON, 1987; LEVY et al., 2012).

## 2.6 FÁRMACOS

O tratamento preventivo da enxaqueca utiliza-se de diferentes substâncias e mecanismos de ação para inibir as estimulações químicas ou elétricas de indução da enxaqueca, além da redução da frequência de crises, gravidade, duração e melhor responsividade das crises agudas ao tratamento sintomático (RIZZOLI, 2014; DOMÍNGUEZ-MORENO, BOADA, MENA-ARCEO, 2019).

Para o tratamento profilático se considera a frequência e intensidade dos episódios de enxaqueca e de manter o tratamento por ao menos 6 meses de forma ininterrupta para redução de mais de 50% das crises (TFELT-HANSEN et al., 2000).

### 2.6.1 Drogas antiepilépticas

Os anticonvulsionantes são considerados fármacos de primeira linha e de eficácia comprovada (por exemplo, topiramato e valproato) que compartilham um mecanismo de ação semelhante. (RIZZOLI, 2014). As drogas antiepilépticas (AEDS) são responsáveis pela redução da depressão alastrante cortical e consequentemente da enxaqueca, bem como inibe receptores do núcleo caudal do trigêmeo (MACIEL-JR, 2006). Geralmente, os AEDS agem estabilizando as membranas neuronais por meio dos receptores iônicos de voltagem, reduzindo a liberação de neuropeptídios vasoativos (WHITE, 2005; COSTA et al., 2013).

Devido à semelhança fisiopatológica entre epilepsia e enxaqueca mecanismos de ação têm sido propostos em ambas as doenças tais como: a modulação dos canais iônicos de sódio ( $\text{Na}^+$ ) e cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), o bloqueio da transmissão do glutamato excitatório. Estes mecanismos podem influenciar o estado excitatório das células e as atividades do trigêmeo. (ROSAS et al., 2018).

#### 2.6.1.1 Topiramato

O topiramato (TPM) é um de dois medicamentos antiepilépticos aprovados pela FDA para prevenção da enxaqueca (AURORA, BRIN, 2017; HOFFMAN, CHARLES, 2018). Esse fármaco tem sido escolhido como o principal

tratamento preventivo da enxaqueca, pois afeta diretamente os neurônios dentro do complexo trigeminovascular em ambos episódios, agudos e crônicos da enxaqueca (STORER, GOADSBY, 2004). Além disso, o TPM é a única droga capaz de atravessar a barreira hematoencefálica e modificar a neurotransmissão, reduzindo a excitação dos receptores kainato e AMPA (SHANK et al., 2000).

Entre outros mecanismos, o topiramato é visto impedindo o disparo síncrono de neurônios, bloqueando os canais iônicos, diminuindo a liberação de neurotransmissores e peptídeos vasoativos, inibindo receptores GABA-A e reduzindo a hiperexcitabilidade neuronal. (STORER, GOADSBY 2004; ROSAS et al., 2018). Até este ponto, o topiramato foi demonstrado normalizar níveis excessivamente elevados de glutamato no cérebro de ratos espontaneamente epiléticos (SPRITZER, BRAVO, SARCHIELLI, 2016; SILBERSTEIN, 2017). Desta forma, o topiramato tem duplo efeito de reduzir a transmissão nociceptiva, a sensibilização central e inibir a DAC (AURORA, BRIN, 2017; SILBERSTEIN, 2017).

### 3 MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animal (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco(UFPE) (n<sup>o</sup>:23076.041888/2018-90). 35 ratos (*Rattus norvergicus*) adultos (60- dias de idade) foram divididos em 5 grupos: 3 grupos controles estimulados com capsaicina [fêmeas (n = 7), machos (n = 7) e gavagem machos (n=7)] e 2 grupos de tratamento [topiramato por gavagem/10 dias machos (n=7) e topiramato agudo machos (n=7)] com pesos entre 200-300 g foram mantidos em uma sala climatizada em um ciclo claro/escuro de 12/12 horas com alimentos e água *ad libitum* disponíveis, e colocados em gaiolas individualizadas divididos por grupo e com no máximo 4 ratos por gaiola.

#### 3.2 PROCEDIMENTOS ANESTÉSICO

Os 35 ratos, com 60 dias de vida, foram anestesiados com quetamina (1ml/kg) e xilasina (0,1ml/kg) via intraperitoneal.

#### 3.3 MODELO *IN VIVO*

A pele sobre a cabeça foi aberta, expondo o crânio. Com a ajuda de um *drill*, uma abertura de uma janela craniana de 6 mm (rosto-caudal) e 4 mm (inferior-superior) foi cuidadosamente realizada no osso parietal para expor a dura-máter entre a coronal e o lambda, um pouco abaixo da linha sagital dos dois lados do crânio (Fig.1). Posteriormente, 20 µl de SIF com etanol 1,4% (Controle) foi adicionado sobre o lado esquerdo da dura-máter do rato por 30 segundos, e exposta ao contato por mesmo período de tempo a um algodão embebido com 60 microlitros para não haver o vazamento do tratamento. O mesmo procedimento foi realizado do lado direito do crânio, porém, foi adicionado 10<sup>-3</sup> M de capsaicina diluído em etanol (1,4%) e SIF. Logo após a cirurgia, o encéfalo com a dura foi armazenado em coletor com formol tamponado a 10% por 24h. As amostras de dura-máter foram coradas com azul de toluidina 0,1% e lâminas foram confeccionadas para contagem de mastócitos degranulados e granulados em microscopia de luz na ampliação de 400x (Fig 2).

Figura 1- Desenho representativo do modelo *in vivo* das janelas cranianas para exposição da dura-máter. As janelas cranianas são os quadrados vermelhos da figura.



### 3.4 GRUPOS E PROCEDIMENTO

#### 3.4.1 Grupo controle

##### 3.4.1.1 Fêmeas

Os animais foram anestesiados e após abertura da janela craniana a dura-máter do lado esquerdo foi lavada com 20 $\mu$ L de SIF com etanol por 30 segundos e exposta ao contato por mesmo período de tempo a um algodão embebido com 60 microlitros, utilizando pipeta de 100  $\mu$ L. No lado direito do crânio, a dura-máter foi estimulada com capsaicina ( $10^{-3}$  M) por mais 60 segundos. Foi utilizado fêmeas para demonstrar se haveria diferença na porcentagem de mastócitos com relação ao sexo.

##### 3.4.1.2 Machos

Os animais foram anestesiados e após abertura da janela craniana a dura-máter do lado esquerdo foi lavada com 20 $\mu$ L de SIF com etanol por 30 segundos e exposta ao contato por mesmo período de tempo a um algodão embebido com 60 microlitros para não haver o vazamento do tratamento, utilizando pipeta de 100  $\mu$ L. No lado direito do crânio, a dura-máter foi estimulada com capsaicina ( $10^{-3}$  M) por mais 60 segundos.

### 3.4.1.3 Gavagem controle

Os ratos machos foram anestesiados e após abertura da janela craniana a dura-máter do lado esquerdo foi lavada com 20 $\mu$ L de SIF com etanol por 30 segundos e exposta ao contato por mesmo período de tempo a um algodão embebido com 60  $\mu$ L, utilizando pipeta de 100  $\mu$ L. No lado direito do crânio, a dura-máter foi estimulada com capsaicina ( $10^{-3}$  M) por mais 60 segundos. A gavagem foi realizada apenas com água deionizada (1 mL) previamente durante 10 dias no grupo controle. A água deionizada foi utilizada como solvente dos tratamentos.

## 3.4.2 Grupo de tratamento

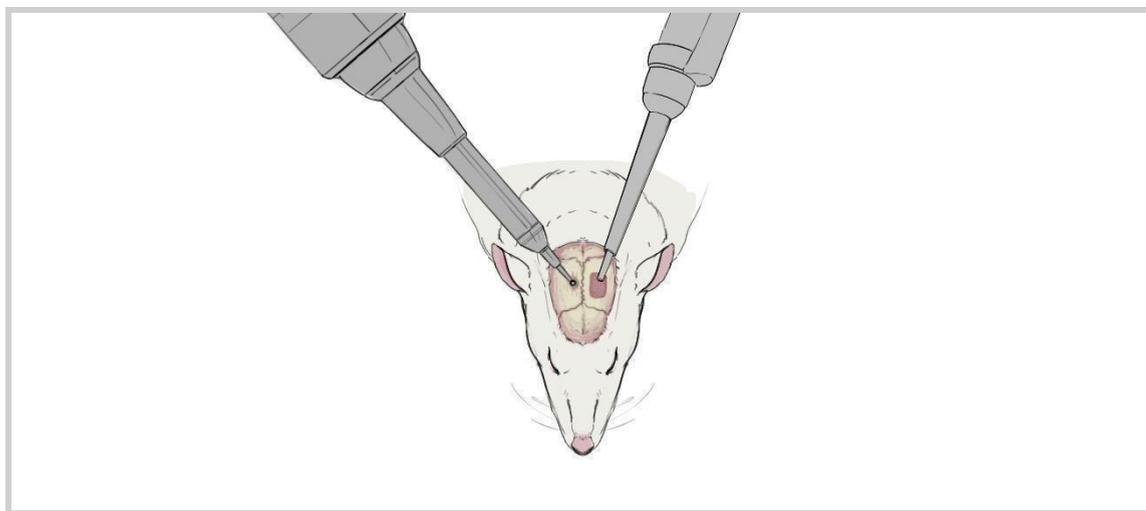
### 3.4.2.1 Topiramato

Os ratos foram tratados previamente com uma solução de 1 mL de SIF com 20 mg de topiramato via oral (gavagem) durante 10 dias de gavagem para posterior abertura da janela craniana e lavagem da dura-máter com SIF (20 $\mu$ L) por 30 segundos e exposta ao contato por mesmo período de tempo a um algodão embebido com 60  $\mu$ L lado esquerdo e capsaicina seguindo o mesmo padrão dos outros grupos, (80  $\mu$ L)  $10^{-3}$ M do lado direito.

### 3.4.2.2 Topiramato Agudo

Os ratos não receberam nenhum tratamento prévio, mas foi colocado *in situ* na dura-máter em concomitante à capsaicina  $10^{-3}$  M. A dura foi exposta para lavagem com SIF do lado esquerdo (20  $\mu$ L) por 30 segundos e exposta ao contato por mesmo período de tempo a um algodão embebido com 60 microlitros, e topiramato ( $10^{-3}$  M) com capsaicina na concentração  $10^{-3}$  M do lado direito, seguindo o mesmo padrão dos outros grupos.

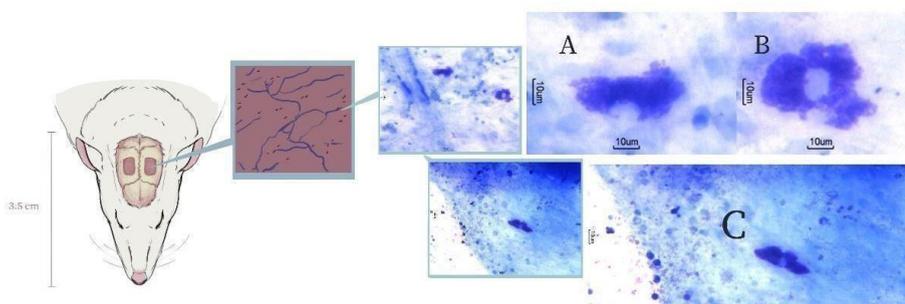
Figura 2 - *Drill* utilizado para a raspagem do crânio e realização das janelas cranianas e pipeta para dosagem da solução (SIF- etanol; Capsaicina e Topiramato). O *drill* está no lado esquerdo do crânio e a pipeta está na janela direita do crânio.



### 3.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA DOS MASTÓCITOS

Amostras de dura-máter com mesma área em todos os grupos, e quantidades semelhantes de mastócitos presente em toda a dura, foram coradas com azul toluidina acidificada (0,1%) (pH 2.5) durante 5 min, e examinadas utilizando um microscópio de luz por dois observadores cegos para as condições experimentais. A degranulação de mastócitos foi definida como o conteúdo de grânulos visível no exterior da célula ou perda de mais de 50% de coloração celular ou ambas (ROZNIECKI et al., 1999)<sup>23</sup>.

Figura 3 - Análise microscópica dos mastócitos nas amostras da dura-Máter. A) Mastócito degranulado; B) Mastócito degranulado; ambos capturados na lâmina R4 do grupo controle em fêmeas; C) Mastócito granulado na lâmina R3 do grupo topiramato em machos.



### 3.6. ANÁLISE DE DADOS

A análise estatística foi feita através do *software Graphpad prism* versão 8.0.3 e realizou-se o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, posterior teste t de Student para análise entre 2 amostras independentes e o teste ANOVA para comparação entre 3 ou mais amostras independentes. Todos os valores foram descritos média  $\pm$  EP. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

### 3.7 CONFLITO DE INTERESSE

Declaramos não haver qualquer conflito de interesse da proposta apresentada.

## 4 RESULTADOS

Os grupos controle, machos e fêmeas, foram comparados para determinar se a diferença entre os sexos iria interferir a resposta da capsaicina quanto a porcentagem de mastócitos degranulados e observou-se que os resultados foram semelhantes entre os sexos [fêmeas ( $73,11 \pm 3\%$ ) versus machos ( $75 \pm 3\%$ ); ( $p < 0,001$ )] (Figura 4).

Os grupos que receberam tratamento prévio de topiramato e água deionizada por meio do método de gavagem apresentaram resultados altamente significativos, visto que o grupo tratado com topiramato apresentou uma porcentagem significativa de redução de mastócitos degranulados diferentemente do grupo tratado com água deionizada quando induzido com capsaicina ( $22,80 \pm 1,17\%$  versus  $77,00 \pm 1,32\%$ ,  $p < 0,001$ ) (Figura 5).

A dura-máter tratada com topiramato juntamente com capsaicina apresentou uma redução significativa de mastócitos degranulados ( $35,74 \pm 1,69\%$  controle veículo versus  $44,52 \pm 0,82\%$  capsaicina+topiramato;  $p = 0,005$ ), porém o melhor tratamento preventivo foi o grupo tratado previamente com topiramato por 10 dias (Figura 6). Esses grupos demonstraram que a presença da droga antiepiléptica predominou mais do que o indutor da despolarização dos neurônios (capsaicina) (Figura 7).

A porcentagem de mastócitos na análise estatística está relacionada ao número total de mastócitos degranulados observados em toda a amostra de dura-máter.

Figura 4 - Dados do grupo controle estimulados com capsaicina entre fêmeas ( $n=7$ ) e machos ( $n=7$ ).

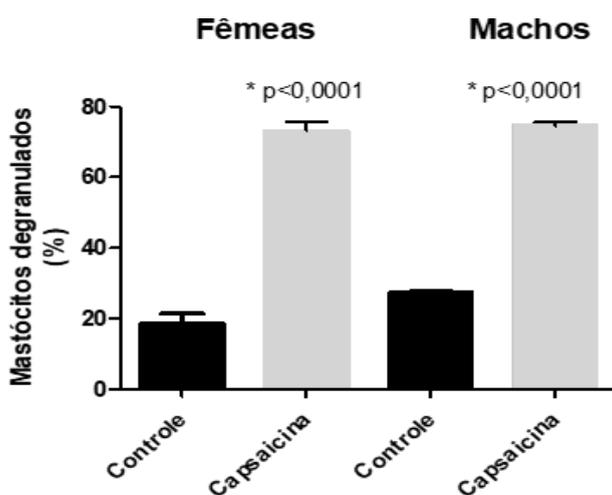


Figura 5 - Comparação dos grupos tratados durante 10 dias por gavagem em controle veículo (machos; n=7) e topiramato (machos; n=7).

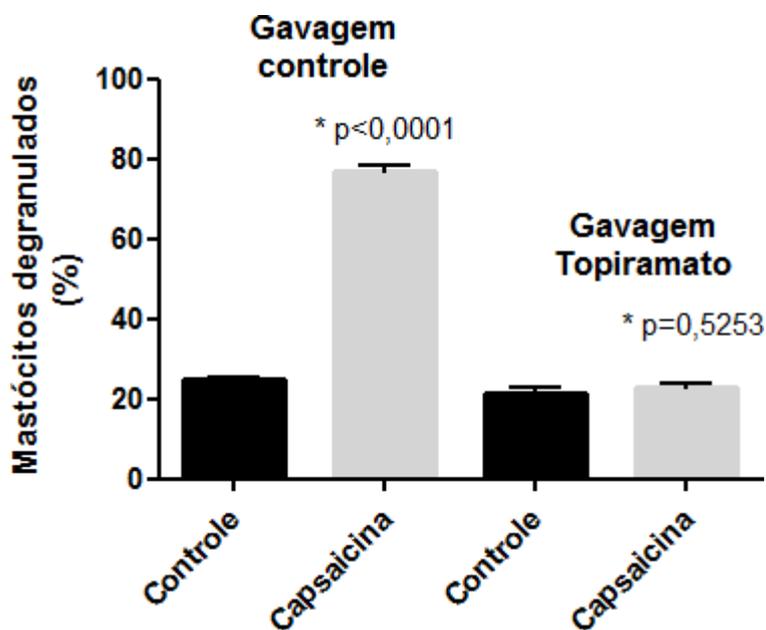
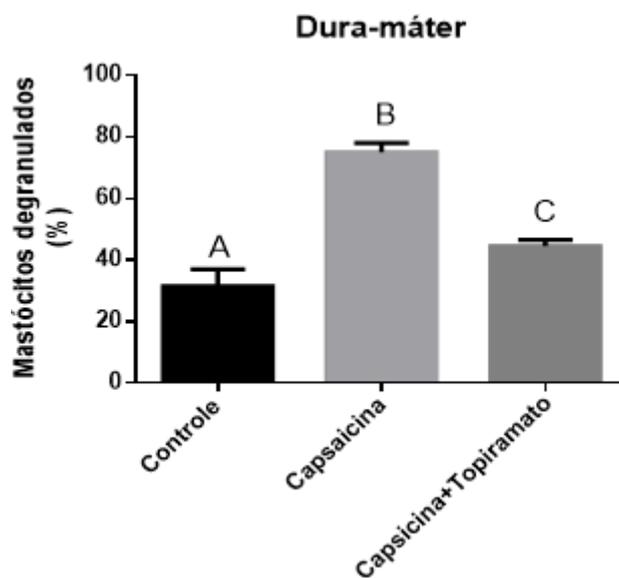


Figura 6 - Comparação entre a dura-máter tratado *in situ* com topiramato versus dura-máter com veículo, ambas na presença da capsaicina (machos; n=7).

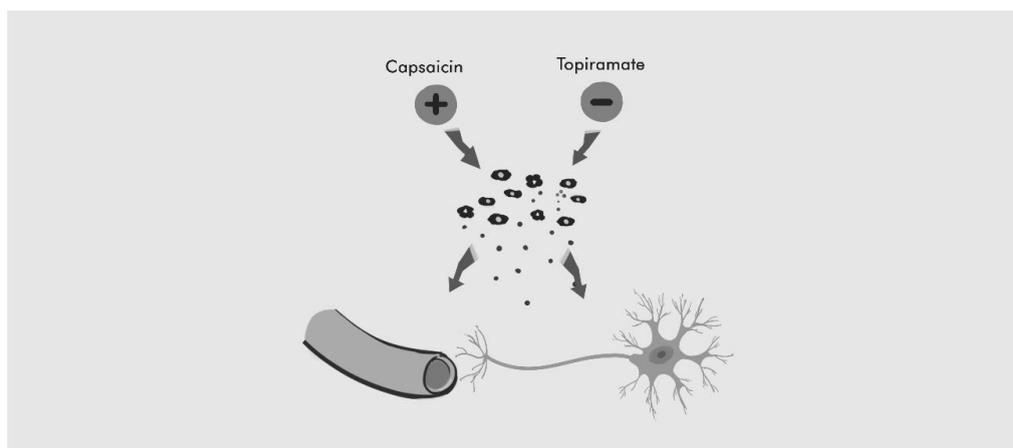


Controle (n=14), Capsaicina (n=7) e Capsaicina+topiramato (n=7). Letras diferentes significa  $p < 0,001$ . Análise estatística com teste paramétrico ANOVA.

Figura 7 - Indução da capsaicina e prevenção pelo topiramato nos eventos principais da dor de cabeça. + Ativação; - Inibição. Mastócitos granulosos, mantêm a forma da membrana plasmática e mastócitos degranulados, membrana rompida e grânulos saindo da célula. Os mastócitos estão localizados próximos dos neurônios e das artérias. Estes grânulos pró- inflamatórios liberados ativam a liberação de peptídeos vasoativos pelas fibras dos neurônios, dilatando as

artérias

cerebrais.



## 4.1 ARTIGO 1: ACTION OF CAPSAICIN IN THE DEGRANULATION OF MAST CELLS IN DURA MATER OF RATS: LITERATURE REVIEW

### Introduction

The mast cells are present in the proximity of sensory nerve fibers in the rat dura mater.<sup>1</sup> There is an interaction between mast cells with C fibers in the dura mater.<sup>2</sup> Vasodilation, plasma leakage and degranulation of mast cells contribute to the release of pro-inflammatory substances in the dura mater, probably related to migraine attack.<sup>3-</sup>

5

The mast cell degranulation has been suggested as an important element of neurogenic inflammation (IN), as mast cells exclusively release histamine that is activated by the release of CGRP at the trigeminal terminals.<sup>6-8</sup> Histamine mediating CGRP receptors are likely to be located in mast cells.<sup>9-12</sup> In addition to CGRP, histamine also interacts with increased production of nitric oxide (NO) in the mast cells.<sup>13-16</sup> All three chemical mediators contribute to vasodilation and IN.<sup>17</sup> Therefore, CGRP is able to release histamine and increase NO production from meningeal mast cells and act as a very potent vasodilator of intracranial arteries, occupying a prominent position in the nociceptive elements in the primary cascade of a headache attack.<sup>17</sup>

The capsaicin is one of the chemicals used in animal studies to activate the trigeminovascular system mimicking part of the migraine pathophysiological process and serving as an experimental model, as it is associated with the release of sensory neuropeptides, through the opening of cationic channels that results in accumulation of intracellular calcium, and mast cell activation.<sup>18</sup> These mast cells, through vasoactive mediators, contribute to stimulation of the large cranial arteries resulting in IN and this innervation is essential for their involvement in primary headaches.<sup>19-21</sup> Thus, as it was shown, this review aims to deepen the knowledge about the mechanisms of action of capsaicin and other chemical inducers in the involvement of mast cell degranulation in amigraine attack.

### Methods

This review was conducted with articles that used capsaicin to activate mast cells, in addition to other chemical inducers that demonstrated interaction between the dura mater and mast cells. The search was carried out with articles published between the

years 1980 and 2019. Articles from SciELO, U.S. National Library of Medicine and the National Institutes Health (PubMed) and Web of Science databases were evaluated. As search strategy, the following terms were used: "Capsaicin" and "mast cell" and "dura-mater" selected in consultation with the Medical Subject Headings (MeSH). The inclusion criteria were experimental model studies in rats that described the mechanisms of action of chemical inducers, including capsaicin. Initially, the titles and abstracts of the articles found were read. Then, the articles were read and, finally, an additional search was carried out that tracked reference lists of all identified articles.

## Results

Of the total 50 articles found, 36 were selected for this review.

## Discussion

### The mechanisms of action of capsaicin

Capsaicin in experimental animals is used to induce inflammation via chemical stress that increase vascular permeability in the dura mater of rats by activating mast cells caused by the release of neuropeptides.<sup>22,23</sup>

The TRPV1 channel acts as a sensory mediator to stress. After activation of these channels, they contribute to the opening of intracellular calcium and potassium output, leading to hyperpolarization of trigeminal ganglion neurons and vasodilation through the release of CGRP and substance P. Thus, TRPV channels play vital roles in the vasculature and an important mediator for vascular responses.<sup>24-26</sup> Baylie e Brayden (2011) demonstrated stimulating actions increase the release of vasoactive peptides.<sup>22</sup> Szolcsanyi (1990) analyzed the depletion of sensory neurons by capsaicin and the relation of neuropeptides released in the analysis of the diameter of the cranial arteries, to verify whether there was dilation, and consequently, migraine.<sup>23</sup> Huang et al. (2018) observe that chemical stimulation with capsaicin also influences the release of CGRP assessed immunohistochemically through the polyclonal antibody of rabbits.

27

The activation of mast cells by capsaicin leads to degranulation and the consequent release of pro-inflammatory substances (histamine and nitric oxide). Histamine increases CGRP levels released by C fiber neurons and consequently more numbers of degranulated mast cells, a positive feedback cycle, and nitric oxide contributes to controlling the viability of cranial arteries.<sup>23</sup> In studies using capsaicin, it was observed that in neonates, chemical stimulation destroyed the peptidergic nerve endings, demonstrating that stresses in neonates do not induce mast cell

degranulation.<sup>22,23</sup>

The stimulating action of capsaicin to increase the release of neuropeptides causes depletion of sensory neurons, releasing CGRP causing destruction of peptidergic nerve endings in neonatal animals that do not have a consistent neural structure. Dimtriadou et al. (1991) used capsaicin (50mg/kg; 48 h) administered subcutaneously in rats and do not had statistical difference in mast cell degranulation of the dura mater. Years later, with higher doses of capsaicin (50 mg / kg 1 day of life and 100 mg / kg 3 days of life) there was a statistical difference in the degranulation of mast cells from the dura mater, due to the increase in the capsaicin dose.<sup>28-29</sup> Thus, neonates are not a good experimental model to mimic the pathophysiology of migraine, because they do not have a consistent and defined neural structure as in adult rats.

In studies with adult rats, capsaicin was able to induce a dose-response in the histamine release and consequent activation of mast cells, observing significant degranulation results.<sup>30</sup> As observed in another study that showed that foods containing capsaicin are able to suppress neuropeptides such as substance P that can cause the co-release of CGRP, since they are often located in the same neuron, thus activating the release of histamine in mast cells, thus mediating mast cell activation.<sup>31</sup> This connection of mast cells with sensory neurons in the dura mater has a bidirectional response, where it signals responses with the nerves in relation to the external environment and endogenous and exogenous substances and degranules in response to dural signals for the body's immunity.<sup>32-33</sup>

In adult rats, it was also shown, through other inducers, as cholinergic agents (carbacol and nicotine); ovarian hormones and compound 48/80, the percentage of degranulated mast cells in the dura mater and its relationship with migraine. It was observed that these chemical inducers had different mechanisms of action to activate mast cells, presenting significant results in the percentage of degranulation and in the pathophysiology of migraine.<sup>34-36</sup>

In the study relating the ovarian hormones (estradiol and progesterone) to the density of mast cells in the dura mater and their potential role in headache, it is observed that the application of estrogen, but not progesterone, increases the density of mast cells.<sup>34</sup> In the study of differentiating PACAP-38 to 27 in the dura mater and the frequency of mast cell degranulation, it was found that the difference is not in the PAC1 receptor but because PACAP38 has greater induction in mast cell degranulation by acting via phospholipase C.<sup>35</sup> And in the study of cholinergic agents in the activation

of calcium channels sensitized by CGRP, there is a relationship that suggests nociceptive regulation of the meninges, providing firing to primary afferents assuming that this is the source of the headache, causing a significant mast cell degranulation and inducing vasodilation in the dura mater.<sup>36</sup> Then, other stimulants have mechanisms of action that resemble capsaicin to degranulate mast cells and increase the levels of these three inflammatory mediators.

Thus, in view of my findings, probably due to the actions of capsaicin, it is possible to study the pathophysiology of migraine by mast cell degranulation. Mast cell degranulation was considered a fundamental element for migraine, as activation and consequent degranulation increases the plasma levels of 3 chemical mediators (CGRP, histamine and nitric oxide) that are related to vasodilation. Capsaicin, with its neuron-stimulating action, opens calcium ion channels, leading to neuron hyperpolarization and the release of vasoactive neuropeptides, activating mast cells and causing vasodilation.

## **Conclusion**

The method of inducing mast cell degranulation by chemical activation of capsaicin, and other inducers, mimics the pathophysiological process of migraine by activating the trigeminovascular system and its interaction with trigeminal nerves in response to neurogenic inflammation.

## 4.2 ARTIGO 2: EFFECT OF CAPSAICIN AND TOPIRAMATE ON MAST CELL DEGRANULATION IN RAT INTRACRANIAL DURA MATER: NEW IN VIVO MODEL

### Introduction

In the last 10 years, some studies have demonstrated the relationship between the dura mater and migraine, in which this disorder has pathophysiological mechanisms such as abnormal changes in the nervous system, neurotransmitters, neuromodulators and neuropeptides<sup>1-5</sup>. The dura mater is a sensory organ that has a rich afferent innervation and a wide network of blood vessels. This meninges has a large amount of C fiber from the trigeminal ganglion containing substances that may be involved in the modulation of migraine pain, including the peptide related to the calcitonin gene (CGRP)<sup>2</sup>.

Mast cells are defense cells that interact with the C fibers of the axons of the trigeminal ganglion<sup>6-8</sup>. These mast cells contain granules with pro-inflammatory action that are released after some neurogenic inflammation (IN)<sup>9-11</sup>. Chemical and electrical stimuli induce inflammation leading to the release of neuropeptides (CGRP) via exocytosis by C fibers, which transmit pain, causing mast cell degranulation. This mast cell-nerve interaction is suggested as one of the main contributors to IN<sup>12-14</sup>.

Capsaicin is a chemical substance used to induce inflammation causing despolarization of neuron terminals, since it activates TRPV1 channels. These channels are cations that cause increased release of CGRP in the artery, producing an increase in meningeal blood flow and mast cell degranulation to simulate migraine pain in guinea pigs<sup>15-18</sup>.

Topiramate (TPM) has a variety of mechanisms of action that act to prevent migraine, since it influences trigeminovascular activity, such as its inhibition in the excitatory of neurons, blocking sodium (Na<sup>+</sup>) channels and activating calcium channels. (Ca<sup>2+</sup>), helping to decrease the release of neurotransmitters and vasoactive peptides.

19-22

Thus, the objective was to create an in vivo experimental model with a cranial window to evaluate the action of capsaicin and topiramate in the percentage of degranulated mast cells in the dura mater of *Rattus norvegicus* rats.

## Methods

### 1. Animals

All experimental procedures were approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of the Federal University of Pernambuco (UFPE) (n0: 23076.041888 / 2018- 90). 35 Adult rats (*Rattus norvegicus*) (60-day old) were divided into 5 groups: 3 control groups stimulated with capsaicin (females, n = 7; males, n = 7 and male gavage, n = 7) and 2 treatment groups [gavage topiramate / 10 male days (n = 7) and male acute topiramate (n = 7)] with weights between 200-300 g were kept in an air- conditioned room on a 12/12 hour light / dark cycle with food and water ad libitum available, and placed in individual cages divided by group and with a maximum of 4 rats per cage.

### 2. Anesthetic procedures

The 35 rats with 60 days of life were anesthetized with ketamine (1ml / kg) and xilasine (0.1 / kg) via intraperitoneal.

#### 2.1 *In vivo* model

The skin over the head was opened, exposing the skull. With the help of a drill, an opening of a 6 mm (rostral-caudal) and 4 mm (lower-upper) cranial window was carefully performed on the parietal bone to expose the dura mater between the coronal and lambda, slightly below the sagittal line on both sides of the skull (Fig.1). Subsequently, 20 µl of SIF with 0.1% ethanol (Control) was added on the left side of the rat's dura mater for 30 seconds, and exposed to contact for the same period of time with a cotton pad soaked with 60 microliters to avoid the leakage of treatment. The same procedure was performed on the right side of the skull, however, 10<sup>-3</sup> M capsaicin diluted in ethanol (0.1%) and SIF was added. Right after the surgery, the brain with the dura was stored in a collector with 10% buffered formaldehyde for 24 hours. The dura mater samples were stained with 0.1% toluidine blue and slides were made to count degranulated and granulated mast cells under light microscopy at 400x magnification (Fig 2).

Figure 1. Representative drawing of the *in vivo* model of the cranial windows for exposure of the dura mater. The cranial windows are the red squares in the figure.



### 3. Groups and treatments

#### 3.1. Group control

##### 3.1.1 Females

The animals were anesthetized and after opening the cranial window, the dura mater on the left side was washed with 20 $\mu$ L of SIF with ethanol for 30 seconds and exposed to contact for the same period of time with a cotton soaked with 60 microliters, using a 100  $\mu$ L pipette. On the right side of the skull, the dura mater was stimulated with capsaicin ( $10^{-3}$ M) for another 60 seconds. Females were used to demonstrate whether there would be a difference in the percentage of mast cells in relation to gender.

##### 3.1.2 Males

The animals were anesthetized and after opening the cranial window, the dura mater on the left side was washed with 20 $\mu$ L of SIF with ethanol for 30 seconds and exposed to contact for the same period of time with a cotton pad soaked with 60 microliters to avoid leakage. treatment using a 100  $\mu$ L pipette. On the right side of the skull, the dura mater was stimulated with capsaicin ( $10^{-3}$ M) for another 60 seconds. The male is the most used sexual gender since in some experimental models the estrous cycle of females interferes in the data.

##### 3.1.3 Control overhead

The male rats were anesthetized and after opening the cranial window, the dura mater on the left side was washed with 20 $\mu$ L of SIF with ethanol for 30 seconds and exposed to contact for the same period of time with a cotton pad soaked in 60 microliters, using a 100  $\mu$ L pipette. On the right side of the skull, the dura mater was stimulated with capsaicin ( $10^{-3}$ M) for another 60 seconds. The gavage was performed only with

deionized water (1 mL) for 10 days before the surgical procedure to expose the animals to the same stress as the animals treated with topiramate and demonstrate whether the stress would interfere with the treatment data. Deionized water was used as the treatment solvent.

### 3.2. Treatment group

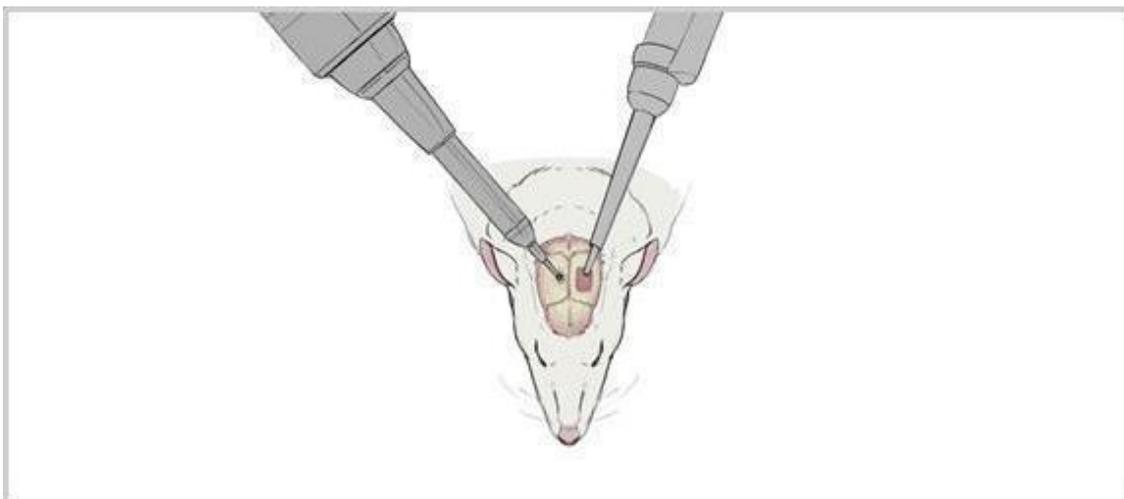
#### 3.2.1 Topiramate

The rats were previously treated with a solution of 1 mL of SIF with 20 mg of topiramate with ethanol (0.1%) orally (gavage) for 10 days of gavage for later opening of the cranial window and washing the dura mater with SIF (20 $\mu$ L) for 30 seconds and exposed to contact for the same period of time with a cotton soaked with 60  $\mu$ L left side and capsaicin following the same pattern as the other groups, (80  $\mu$ L)  $10^{-3}$ M on the right side.

#### 3.2.2 Acute Topiramate

The rats did not receive any previous treatment, but it was placed in situ in the dura mater together with  $10^{-3}$  M capsaicin with ethanol (0.1%). The dura was exposed for washing with SIF on the left side (20  $\mu$ L) for 30 seconds and exposed to contact for the same period of time with a cotton soaked with 60 microliters, and topiramate ( $10^{-3}$  M) with capsaicin in the concentration  $10^{-3}$  M on the right side, following the same pattern as the other groups.

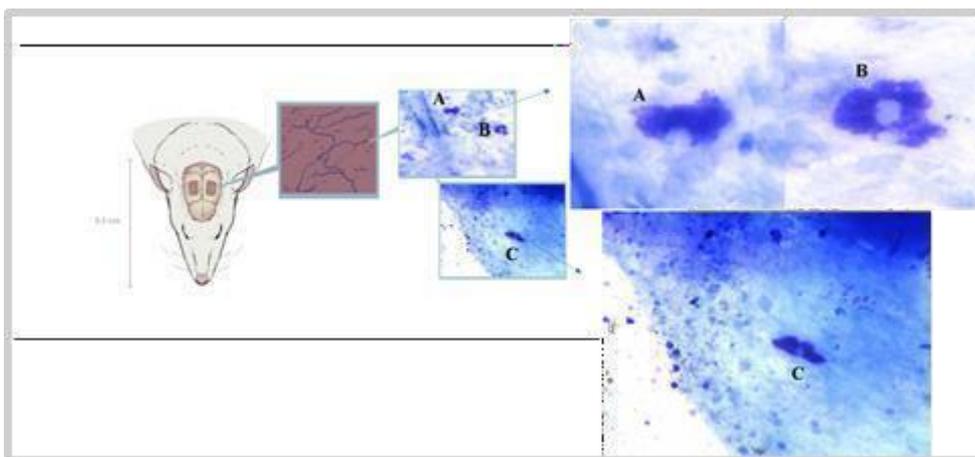
Figure 2- Drill used to scrape the skull and perform cranial windows and pipette to measure the solution (SIF-ethanol; Capsaicin and Topiramate). The drill is on the left side of the skull and the pipette is in the right skull window.



#### 4. Histological analysis of mast cells

Samples of dura mater were stained with acidified toluidine blue (0.1%) (pH 2.5) for 5 min, and examined using a light microscope by two observers blinded to the experimental conditions. Mast cell degranulation was defined as the granule content visible outside the cell or loss of more than 50% of cell staining or both (ROZNIECKI et al, 1999) 23.

Figure 3- Microscopic analysis of mast cells in the dura mater samples. A) Degranulated mast cell; B) Degranulated mast cell; both captured in the R4 slide of the control group in females; C) Mast cell granulated in the R3 slide of the topiramate group in males.



#### 5. Data analysis

The statistical analysis was performed using the Graphpad prism software version 8.0.3 and the Kolmogorov-Smirnov normality test was performed, later Student's t test for analysis between 2 independent samples and the ANOVA test for comparison between 3 or more independent samples. All values were described as mean  $\pm$  EP. Differences were considered significant when  $p < 0.05$ .

## Results

### Effect of topiramate and capsaicin on the percentage of degranulated mast cells

The control groups, males and females, were compared to determine whether the difference between genders would interfere with capsaicin response as to the percentage of degranulated mast cells and it was observed that the results were similar

between genders [females ( $73.11 \pm 3\%$ ) versus males ( $75 \pm 3\%$ ); ( $p < 0.001$ )] (Figure 4).

The groups that received previous treatment of topiramate and deionized water through the gavage method showed highly significant results, since the group treated with topiramate showed a significant percentage of reduction in degranulated mast cells differently from the group treated with deionized water when induced with capsaicin ( $22.80 \pm 1.17\%$  versus  $77.00 \pm 1.32\%$ ,  $p < 0.001$ ) (Figure 5).

The dura mater treated with topiramate together with capsaicin showed a significant reduction in degranulated mast cells ( $35.74 \pm 1.69\%$  vehicle control versus  $44.52 \pm 0.82\%$  capsaicin + topiramate;  $p = 0.005$ ), but the best treatment preventive was the group previously treated with topiramate for 10 days (Figure 6). These groups demonstrated that the presence of the antiepileptic drug predominated more than the neuron depolarization inducer (capsaicin) (Figure 7).

The percentage of mast cells in the statistical analysis is related to the total number of degranulated mast cells observed in the entire dura mater sample.

Figure 4. Data from the control group stimulated with capsaicin between females ( $n = 7$ ) and males ( $n = 7$ ).

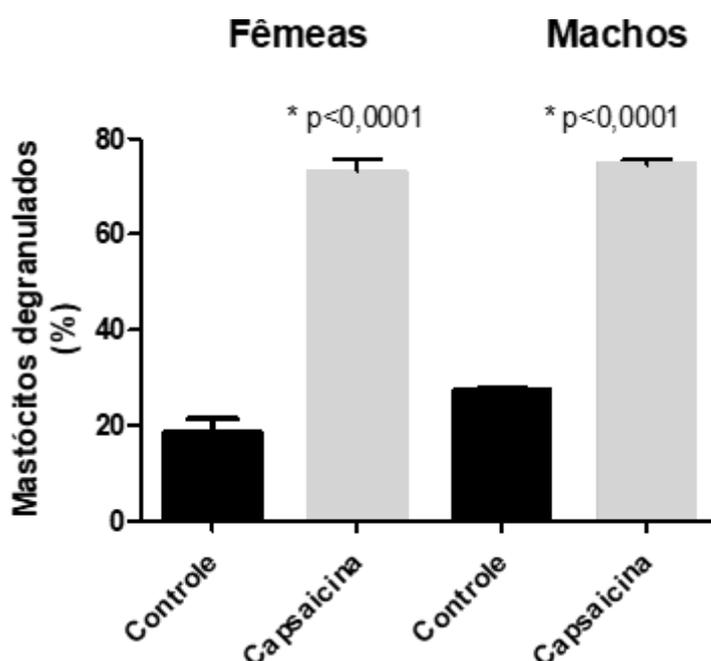


Figure 5. Comparison of groups treated for 10 days by gavage in vehicle control (males;  $n = 7$ ) and topiramate (males;  $n = 7$ ).

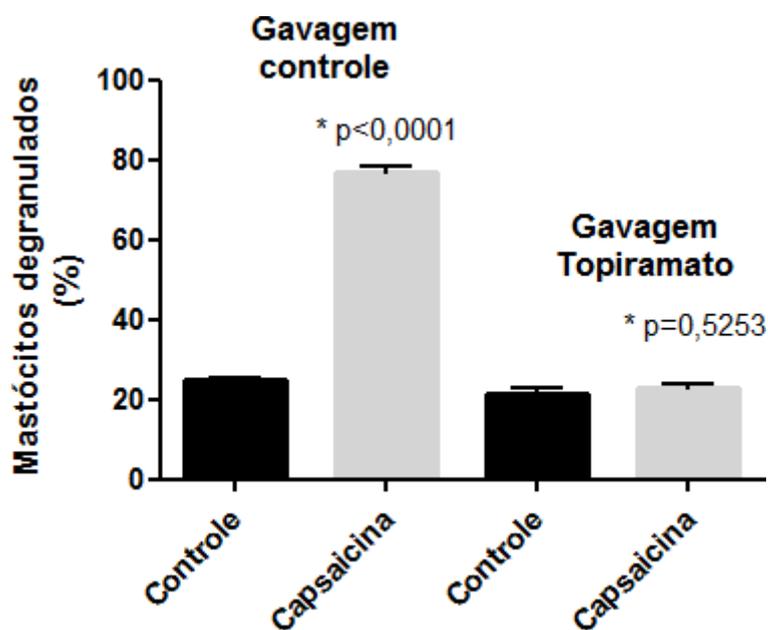
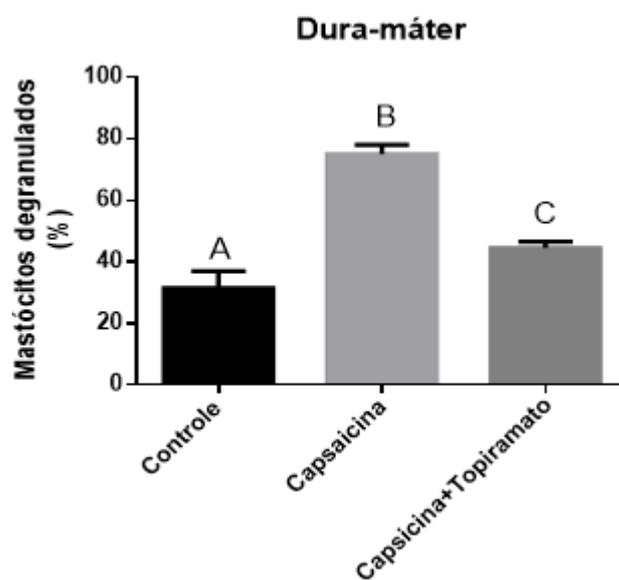
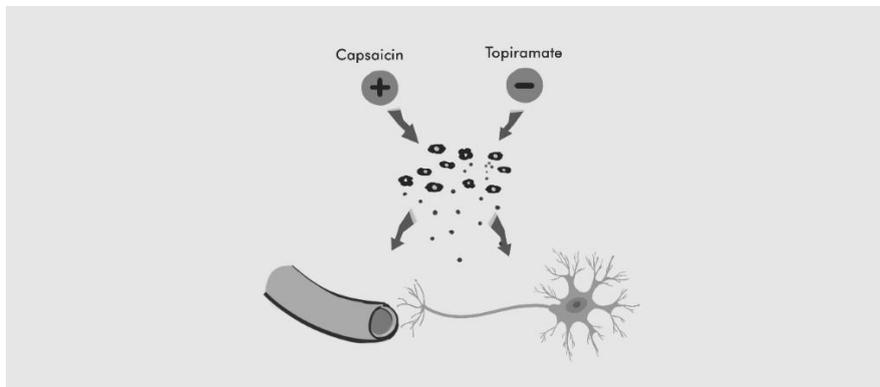


Figura 6. Comparison between dura mater treated in situ with topiramate versus dura mater with vehicle, both in the presence of capsaicin (males; n = 7).



Control (n = 14), Capsaicin (n = 7) and Capsaicin + topiramate (n = 7). Different letters means p < 0.001). Statistical analysis with parametric ANOVA test.

Figure 7. Capsaicin induction and prevention by topiramate in major headache events. + Activation; - Inhibition. Granulated mast cells, maintain the shape of the plasma membrane and degranulated mast cells, ruptured membrane and granules coming out of the cell. Mast cells are located close to neurons and arteries. These released proinflammatory granules activate the release of vasoactive peptides by neuron fibers, dilating the cerebral arteries.



## Discussion

The present work, unprecedented in vivo, proved that capsaicin chemically induces mast cell degranulation in both genders in adult rats and that topiramate, an antiepileptic drug, proved to be a neuromodulatory drug, quite effective in preventive and acute migraine. However, in the study by Dimtriadou et al. (1991) who used capsaicin (50mg / kg; 48h of life) administered subcutaneously in neonatal rats, found no statistically significant difference in mast cell degranulation, since they did not contain a complex and defined neural structure, thus chemical stimulation destroyed the peptidergic nerve endings, demonstrating that stresses in neonates do not induce mast cell degranulation. 24

In the same study, years later, the capsaicin dose was increased (50 mg / kg 1 day of life and 100 mg / kg 3 days of life), with statistical difference in mast cell degranulation 25 Some experimental studies have also reported interest in check if there is a difference in the percentage of mast cell degranulation according to gender, using other inducers as cholinergic agents (Carbacol and Nicotine); ovarian hormones and compound 48/80, presenting in their results, similar data that corroborate with our article, that gender does not influence or interfere in the percentage of mast cells or in

the amount of degranulated mast cells. 3.26.5

In studies with experimental animals, there is an interest in activating neurons in the dura mater, since the trigeminovascular system plays a fundamental role in migraine. Systemic administrations via chemical substances are widely used to evaluate the mechanisms that express the activation and increase of migraine neuromodulators. In the study by Lukács and his collaborators (2017), they activate the trigeminal complex through an immunopotentiator, Complete Freund's Adjuvant (CFA), applied locally to the dura mater and inhibited by acid-derived cyrenic (KYNA, 300mg / kg) administered intraperitoneally. And they observed that CFA increased the immunoreactivity of C-fos and glutamate in neurons, in addition to which positive PACAP fibers were detected, and CGRP and substance P were detected. KYNA, on the other hand, has a neuroprotective effect, acting on glutamate receptors, inhibiting its release and consequently reducing the excitatory triggers of ganglion neurons<sup>27</sup>.

Capsaicin, due to its stimulating action in increasing the release of neuropeptides and causing the depletion of sensory neurons, is widely used in studies of CGRP release<sup>28,29</sup>. Few studies, such as that by Cheng et al. (2006), managed to demonstrate that the effect of capsaicin was related to histamine changes by dose-response<sup>30</sup>. as observed in the study by Frydas et al. (2013), which showed that foods containing capsaicin can suppress neuropeptides as the substance P that can cause the co-release of CGRP, since they are often located in the same neuron, activating the release of histamine in mast cells, mediating the activation of mast cells<sup>31</sup>. This connection of mast cells with sensory neurons presents a bidirectional response, where it signals responses with nerves in relation to the external environment and endogenous and exogenous substances and degranulate response to dural signals for the body's immunity. 32.33

Mast cell degranulation was affected by pretreatment with topiramate and also acutely as it inhibited the role of capsaicin, defining its preventive effect on migraine. The same is seen in the studies by Storer, Goadsby (2004) who uses an electrode to evoke the dilation of blood vessels bilaterally in the skull, in addition to topiramate and this electrical stimulation together with the action of topiramate acted by inhibiting cell firing in the trigeminocervical complex (TCC) at a dose of 30 mg kg<sup>-1</sup> in cats. 34 Another study, carried out by Akerman, Goadsby (2005) also uses an electrode to stimulate the superior sagittal sinus and consequently activate the primary trigeminal afferents, also observing that topiramate inhibited the shots via dose-dependent (3, 5,

10, 30 and 50 mg / kg). At the dose of 5 mg / kg and in the time of 30 min, the reduction of the trigger was  $50 \pm 6\%$  and at the dose of 50 mg / kg it was reduced to  $80 \pm 8\%$  at 60 minutes. 35 In the study by Huang et al. (2018), they used capsaicin intracisternally in adult rats for harmful meningeal stimulation through repeated triggers of the activation of the trigeminovascular system and release of CGRP and topiramate at a dose of 30 mg / kg significantly inhibited capsaicin-induced CGRP expression in adult rats. 36

. Topiramate has multiple actions that can act synergistically to contribute to the prevention of migraine. GABA-A-mediated inhibition and changes in ion channels improve neurotransmission by preventing headaches as it blocks the release of vasoactive peptides and the sensitization of afferent and primary central neurons. In addition, topiramate is the only one within EADS that has the ability to modify excitatory neurotransmission through kainate and AMPA receptors. In addition to preventing synchronous firing of neurons. 37

## Conclusion

The new in vivo experimental model mimics part of the pathophysiological process of migraine from the mechanical and chemical activation of the trigeminovascular system, evaluating the participation of capsaicin and topiramate drugs in the histochemical analysis of mast cells and their interaction with trigeminal nerves in response to neurogenic inflammation. Thus, the method of inducing mast cell degranulation by capsaicin and its inhibition by topiramate is quite efficient, with good reproductibility.

## 5 DISCUSSÃO

O presente trabalho, de maneira inédita *in vivo*, comprovou que a capsaicina induz quimicamente, a degranulação de mastócito, em ratos adultos de ambos os sexos e que o topiramato, diminuiu a degranulação dos mastócitos na dura-máter após a ação da capsaicina dependente da dose 20mg/kg, com a intenção de observar o efeito protetor, com uma concentração menor do que existe na literatura. Não há estudos na literatura desse modelo experimental com análise de degranulação de mastócitos, utilizando a capsaicina como estimulantequímico e o topiramato como fármaco preventivo da enxaqueca, na redução da degranulação de mastócito.

Resultados diferentes foram descritos no estudo de Dimtriadou et al. (1991) quando esses autores utilizavam a capsaicina (50mg/kg; 48 horas de vida) administrada por via subcutânea em ratos não apresentavam diferença estatística na degranulação de mastócito durais em neonatais, pois a ação estimuladora da capsaicina destruiu as terminações nervosas peptidérgicas. Anos depois, com doses maiores de capsaicina (50 mg/kg 1 dia de vida e 100 mg/kg 3 dias de vida) houve diferença estatística na degranulação de mastócito da dura-máter, devido ao aumento da dose de capsaicina (DIMTRIADOU et al., 1997). Assim, neonatais não são um bom modelo experimental para mimetizar a fisiopatologia da enxaqueca, porque não apresentam uma estrutura neural consistente e definida como nos ratos adultos.

Vários estudos experimentais também têm reportado a análise estatística dos mastócitos com relação ao sexo, utilizando outros indutores como agentes colinérgicos (carbacol e nicotina); hormônios ovarianos e composto 48/80, apresentando em seus resultados, dados semelhantes que corroboram com nosso artigo de que o sexo não influencia nem interfere na porcentagem de mastócitos durais e que a degranulação durante as fases do ciclo estral não apresenta diferença estatística quando comparada aos machos (BOES, LEVY, 2012; BAUN et al., 2012; KLINIC et al., 2015). Demonstrados dados diferentes com o que ocorre em humanos. Pois as mulheres tendem a ter uma maior probabilidade de dor de cabeça devido ao ciclo menstrual e gravidez.

A capsaicina é bastante utilizada em estudos com animais experimentais de liberação de CGRP devido a sua ação estimuladora de aumento da liberação

de neuropeptídios e de provocar o esgotamento dos neurônios sensoriais. Poucos estudos, (Cheng et al., 2006), demonstraram que o efeito da capsaicina estava relacionado a alterações de histamina por dose-resposta. Assim como observado no estudo de Frydas et al. (2013), que evidenciou que comidas que continham capsaicina conseguem aumentar a liberação de neuropeptídios como a substância P que pode provocar a co-liberação de CGRP, visto que estão frequentemente localizados no mesmo neurônio, ativando a liberação de histamina nos mastócitos, mediando a ativação dos mastócitos. Essa conexão dos mastócitos com os neurônios sensoriais apresenta uma resposta bidirecional, onde sinaliza respostas com os nervos com relação ao ambiente externo e substâncias endógenas e exógenas e degranula em resposta aos sinais durais para a imunidade do organismo (WALLENGREN, HAKÁNSON, 1987; LEVY et al., 2012).

Nesse estudo, a degranulação de mastócito foi afetada pelo pré-tratamento com o topiramato e também de forma aguda visto que inibiu a ação da capsaicina. Estudos preventivos utilizam do método de gavagem para avaliar o efeito protetor dos fármacos sistemicamente e seus mecanismos de ação de forma fisiológica e sua atuação em várias áreas do sistema nervoso central (WU et al., 2014; TUNALI et al., 2020). O mesmo é visto nos estudos de Storer, Goadsby (2004) que utiliza no seu estudo um eletrodo para evocar a dilatação dos vasos sanguíneos bilateralmente no crânio através da estimulação elétrica e o topiramato demonstrou inibir o disparo celular no complexo trigeminocervical (TCC) na dose de  $30 \text{ mg kg}^{-1}$ , em gatos.

Outros estudos, como Akerman, Goadsby (2005) utiliza também no seu modelo experimental um eletrodo para estimular o seio sagital superior e consequentemente ativar os aferentes trigêmeos primários e também foi observado que o topiramato demonstrou inibir os disparos de modo dose dependente (3, 5, 10, 30 e 50 mg/kg). Na dose de 5 mg/kg e no tempo de 30 min, a redução do disparo foi em  $50 \pm 6\%$  e na dose de 50 mg/kg foi reduzido para  $80 \pm 8\%$  aos 60 minutos. No estudo de Huang et al. (2018), eles utilizaram a capsaicina via intracisternal em ratos adultos para estimulação meníngea nociva através de repetidas provocações da ativação do sistema trigeminovascular e liberação de CGRP e o topiramato na dose 30 mg/kg inibiu

significativamente expressão de CGRP induzida por capsaicina em ratos adultos.

O topiramato apresenta múltiplas ações que podem atuar sinergicamente para contribuir na prevenção da enxaqueca. A inibição mediada por GABA-A e as alterações nos canais iônicos melhoram a neurotransmissão impedindo dores de cabeça visto que bloqueia a liberação de peptídeos vasoativos e a sensibilização dos neurônios aferentes e centrais primários além da ativação dos mastócitos (ALIM et al., 2017). Além disso, o topiramato é o único dentro dos AEDS que possui a capacidade de modificar a neurotransmissão excitatória através dos receptores kainato e AMPA, presentes na dura-máter e nos mastócitos, inibindo a expressão de c-fos e glutamato (LUKÁCS et al., 2017). Além de impedir o disparo síncrono dos neurônios (WHITE, 2005).

Destarte, diante dos meus achados, provavelmente por ações da capsaicina e do topiramato, o novo modelo experimental é factível de estudar a fisiopatologia da enxaqueca pela degranulação de mastócitos. A degranulação de mastócito foi considerada como um elemento fundamental para a enxaqueca, pois a ativação e consequente degranulação aumenta os níveis plasmáticos de 3 mediadores químicos (CGRP, histamina e óxido nítrico) que estão relacionados a vasodilatação. A capsaicina com sua ação estimuladora de neurônios, abre os canais iônicos de cálcio, levando a hiperpolarização dos neurônios e liberação de neuropeptídeos vasoativos, ativando os mastócitos e causando vasodilatação. O topiramato, por sua vez, bloqueia as ações da capsaicina, pois ele modifica a neurotransmissão, bloqueando os canais iônicos via AMPA e kainato e o receptor da capsaicina (TRPV1), reduzindo a liberação de neuropeptídeos vasoativos, inibindo a ativação de mastócitos, vasodilatação, e consequentemente, não havendo enxaqueca.

## 6 CONCLUSÕES

O novo modelo experimental in vivo mimetiza parte do processo fisiopatológico da enxaqueca a partir da ativação química do sistema trigeminovascular com a capsaicina, avaliando a participação dos fármacos capsaicina e topiramato na porcentagem de degranulação de mastócitos e observando o efeito protetor e eficaz do topiramato na inibição das ações da capsaicina, reduzindo a porcentagem de degranulação de mastócito. Dessa forma o método de indução da degranulação de mastócito por capsaicina e a sua redução pelo do topiramato é bastante eficiente, apresentando ser factível de reprodutibilidade para que estudos futuros possam trazer uma solução para o tratamento da enxaqueca.

## REFERÊNCIAS

- AKERMAN, S.; GOADSBY, P. J. Topiramate inhibits trigeminovascular activation: an intravital microscopy study. **British Journal of Pharmacology**, v.146, n.1, p. 7- 14, 2005.
- ALIM, M. A.; ACKERMANN, P. W.; ELIASSON, P.; BLOMGRAN, P.; KRISTIANSSON, P.; PEJLER, G.; PETERSON, M. Increased mast cell degranulation and co- localization of mast cells with the NMDA receptor-1 during healing after Achilles tendon rupture. **Cell and Tissue Research**, v. 370, n.3, p. 451-460, 2017.
- ALSTADHAUG, K. B. Histamine in migraine and brain. **Headache**, v. 54, p. 246-259, 2014.
- AURORA, S. K.; BRIN, M. F. Chronic Migraine: An Update on Physiology, Imaging, and the Mechanism of Action of Two Available Pharmacologic Therapies. **Headache**, v. 57, p. 109-125, 2017.
- BARBARA, G.; STANGHELLINI, V.; DE GIORGIO, R.; CREMON, C.; COTTRELL, G. S.; SANTINI, D.; PASQUINELLI, G.; MORSELLI-LABATE, A.M.; GRADY, E.F.; BUNNETT, N.W.; COLLINS, S.M.; CORINALDESI, R. Activated mast cells in proximity to colonic nerves correlate with abdominal pain in irritable bowel syndrome. **Gastroenterology**, v. 126, p. 693-702, 2004.
- BAUN, M.; PEDERSEN, M. H.; OLESEN, J.; JANSEN-OLESEN, I. Dural mast cell degranulation is a putative mechanism for headache induced by PACAP-38. **Cephalalgia**, v. 32, p. 337-345, 2012.
- BAYLIE, R. L.; BRAYDEN, J. E. TRPV channels and vascular function. **Acta Physiologica (Oxford)**, v. 203, p. 99-116, 2011.
- BERGER, A.; BLOUDEK, L. M.; VARON, S. F.; OSTER, G. Adherence with migraine prophylaxis in clinical practice. **Pain Practice**, v. 12, p. 541-549, 2012.
- BERNSTEIN, C.; BURSTEIN, R. Sensitization of the trigeminovascular pathway: perspective and implications to migraine pathophysiology. **Journal of Clinical Neurology**, v. 8, n.2, p. 89-99, 2012.
- BOES, T.; LEVY, D. Influence of sex, estrous cycle and estrogen on intracranial dural mast cells. **Cephalalgia**, v. 32, n.12, p. 924-931, 2012.
- BORAN, H. E.; BOLAY, H. Pathophysiology of migraine. **Archives of Neuropsychiatry**, v. 50, p. 1-7, 2013.
- CHARLES, A. Migraine: A brain state. **Current Opinion in Neurology**, v. 26, p. 235- 239, 2013.
- CHEN, N.; ZHANG, J.; WANG, P.; GUO, J.; ZHOU, M.; HE, L. Functional alterations of pain processing pathway in migraine patients with cutaneous allodynia. **Pain medicine (Malden, Mass)**, v. 16, n. 6, p. 1211-1220, 2015.
- CHENG, J.; YANG, X. N.; LIU, X.; ZHANG, S. P. Capsaicin for allergic rhinitis in adults. **Cochrane Database System Reviews** 2006.
- CHONG, C.D.; PLASENCIA, J.D.; FRAKES, D.H.; SCHWEDT, T.J. Structural

alterations of the brainstem in migraine. **Neuroimage Clinical**, v. 13, p. 223-227, 2017.

COPPOLA, G.; TINELLI, E.; LEPRE, C.; IACOVELLI, E.; DI LORENZO, G.; SERRAO, M.; PAURI, F.; FIERMONTE, G.; BIANCO, F.; PIERELLI, F. Dynamic changes in thalamic microstructure of migraine without aura patients: A diffusion tensor magnetic resonance imaging study. **European Journal of Neurology**, v. 21, p. 287-292, 2014.

COSTA, C.; TOZZI, A.; RAINERO, I.; CUPINI, L.M.; CALABRESI, P.; AYATA, C.; SARCHIELLI, P. Cortical spreading depression as a target for anti-migraineagents. **Journal of Headache Pain**, v. 14, p. 62, 2013.

CUCCHIARA, B.; DATTA, R.; AGUIRRE, G.K.; IDOKO, K.E.; DETRE, J. Measurement of visual sensitivity in migraine: Validation of two scales and correlation with visualcortex activation. **Cephalalgia**, v. 35, n. 7, p. 585-592, 2014

DIMITRIADOU, V.; BUZZI, M. G.; MOSKOWITZ, M. A.; THEOHARIDES, T. C. Trigeminal sensory fiber stimulation induces morphological changes reflectingsecretion in rat dura mater mast cells. **Neuroscience**, v. 44, p.97-112, 1991.

DIMITRIADOU, V.; ROULEAU, A.; TRUNG, T.; NEWLANDS, G. J.; MILLER, H. R.; LUFFAU, G.; SCHWARTZ, J. C.; GARBARG, M. Functional relationships between sensory nerve fibers and mast cells of dura mater in normal andinflammatory conditions. **Neuroscience**, v. 77, p. 829-839, 1997.

DONG, H.; ZHANG, X.; QIAN, Y. Mast cells and neuroinflammation. **Medical Science Monitor Basic Research**, v. 20, p. 200-206, 2014.

DOMÍNGUEZ-MORENO, R.; BOADA, F.V.; MENA-ARCEO, R. G. Nuevos tratamientos contra la migraña. **Medicina Interna de México**, v. 35, n. 3, p. 397-405, 2019.

DUX, M.; WILL, C.; VOGLER, B.; FILIPOVIC, M. R.; MESSLINGER, K. Meningeal blood flow is controlled by H2 S-NO crosstalk activating a HNO-TRPA1-CGRP signalling pathway. **British Journal of Pharmacology**, v. 173, n. 3, p. 431-45, 2016.

EDVINSSON L. Sensory nerves in man and their role in primary headaches. **Cephalalgia**, v. 21, p. 761-764, 2001.

EFTEKHARI, S.; EDVINSSON, L. Possible sites of action of the new calcitonin gene- related peptide receptor antagonists. **Therapeutic Advances inNeurological Disorders**, v. 3, n.6, p. 369-78, 2010.

EFTEKHARI, S.; WARFVINGE, K.; BLIXT, F.W.; EDVINSSON, L. Differentiation of Nerve Fibers Storing CGRP and CGRP Receptors in the Peripheral Trigeminovascular System. **The Journal of Pain**, v.14, n. 11, p. 1289-1303, 2013.

EGERT, U.; KNOTT, T.; MOHR, A.; NISCH, W.; HÄMMERLE, A. An in-vitro model system for studies of horizontal interaction in excised retina segments with amultielectrode-array. **Göttingen Neurobiology Report**, p. 449, 1995.

ERDELYI L, SUCH G, JANCSO G. Intracellular and voltage clamp studies of capsaicin induced effects on a sensory neuron model. **Acta Physiologica Hungaria**, v.69,

p. 481-492, 1987.

ERDENER, S. E.; DALKARA, T. Modelling headache and migraine and its pharmacological manipulation. *British Journal of Pharmacology*, v. 171, p. 4575-4594, 2014.

FRYDAS, S.; VARVARA, G.; MURMURA, G.; SAGGINI, A.; CARAFFA, A.; ANTINOLFI, P.; PANDOLFI, F. Impact of Capsaicin on Mast Cell Inflammation. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, v. 26, n.3, p. 597-600, 2013.

GEPPETTI, P.; ROSSI, E.; CHIARUGI, A.; BENEMEI, S. Antidromic vasodilatation and the migraine mechanism. *Journal of Headache Pain*, v. 13, p. 103-111, 2012.

GOADSBY, P.J.; HOLLAND, P.R.; MARTINS-OLIVEIRA, M.; HOFFMANN, J.; SCHANKIN, C.; AKERMAN, S. Pathophysiology of Migraine—a disorder of sensory processing. *Physiological Reviews*, v.97, p. 553-622, 2017.

HAANES, K. A.; LABASTIDA-RAMÍREZ, A.; CHAN, K. Y.; DE VRIES, R.; SHOOK, B.; JACKSON, P.; ZHANG, J.; FLORES, C. M.; DANSER, A. H. J.; VILLALÓN, C. M.; MAASSENVANDENBRINK, A. Characterization of the trigeminovascular actions of several adenosine A2A receptor antagonists in an in vivo rat model of migraine. *The Journal of Headache and Pain*, v.19, n.1, p. 41, 2018.

HANSEN, A.J.; NEDDERGARD, M. Brain ion homeostasis in cerebral ischemia. *Neurochemical Pathology*, v. 9, p. 195-209, 1988.

HANSEN, J.M.; BACA, S.M.; VANVALKENBURGH, P.; CHARLES, A. Distinctive anatomical and physiological features of migraine aura revealed by 18 years of recording. *Brain*, v. 136, p. 3589-3595, 2013.

HO, T.W.; EDVINSSON, L.; GOADSBY, P.J. CGRP and its receptors provide new insights into migraine pathophysiology. *Nature Reviews Neurology*, v. 6, p. 573-582, 2010.

HOFFMANN, J.; CHARLES, A. Glutamate and Its Receptors as Therapeutic Targets for Migraine. *Neurotherapeutics*, v.15, n. 2, p. 361-70, 2018.

IRMAK, D.K.; KILINC, E.; TORE, F. Shared Fate of Meningeal Mast Cells and Sensory Neurons in Migraine. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, v. 13, p. 136, 2019.

JANSEN, I.; ALAFACI, C.; UDDMAN, R.; EDVINSSON, L. Evidence that calcitonin gene-related peptide contributes to the capsaicin-induced relaxation of guinea pig cerebral arteries. *Regulatory Peptides*, v. 31, p.167-178, 1990.

JANSEN-OLESEN, I.; MORTENSEN, A.; EDVINSSON, L. Calcitonin gene-related peptide is released from capsaicin-sensitive nerve fibres and induces vasodilatation of human cerebral arteries concomitant with activation of adenylylcyclase. *Cephalalgia*, v.16, p. 310-316, 1996.

KARATAS, H.; ERDENER, S.E.; GURSOY-OZDEMIR, Y.; LULE, S.; EREN-KOCAK, E.; SEM, Z.D.; DALKARA, T. Spreading depression triggers headache by activating neuronal Panx1 channels. *Science*, v. 339, p. 1092-1095, 2013.

KASPER, D.L.; HAUSER, S.L.; JAMESON, J.L.; FAUCI, A.S.; LONGO, D.L.;

LOSCALZO, J. **Medicina Interna de Harrison**. 19ed.2016.

KILINC, E.; FIRAT, T.; TORE, F.; KIYAN, A.; KUKNER, A.; TUNÇEL, N. Vasoactive Intestinal peptide modulates c-Fos activity in the trigeminal nucleus and dura mater mast cells in sympathectomized rats. **Journal of Neuroscience Research**, v. 93, p. 644-650, 2015.

KOÇER, A.; MEMISOGULLARI, R.; DOMAC, M.F.; ILHAN, A.; KOÇER, E.; OKUYUCU, S.; OZDEMIR, B. IL-6 Levels in Migraine Patient Receiving Topiramate. **Pain Practice**, v. 9, n. 5, p. 375-379, 2009.

KOLDRO H. A.; KUMAR, B. D.; OLESEN, J.; JENSEN, L. J.; JANSEN-OLESEN, I. Effect of TRPA1 activator allyl isothiocyanate (AITC) on rat dural and pial arteries. **Pharmacological Reports**, 2019.

LASHLEY, K.S. Patterns of cerebral integration indicated by the scotomas of migraine. **Archives of Neurology and Psychiatry**, v. 46, p. 259-264, 1941.

LAURITZEN, M.; DREIER, J.P.; FABRICIUS M.; HARTINGS, J.A.; GRAF, R.; STRONG, J.A. Clinical relevance of cortical spreading depression in neurological disorders: Migraine, malignant stroke, subarachnoid and intracranial hemorrhage, and traumatic brain injury. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 31, p. 17-35, 2011.

LEAO, A.A. Spreading depression of activity in the cerebral cortex. **Journal of Neurophysiology**, v. 7, p. 359-390, 1944.

LEVY, D.; BURSTEIN, R.; KAINZ, V.; JAKUBOWSKI, M.; STRASSMAN, A.M: Mast cell degranulation activates a pain pathway underlying migraine headache. **Pain** v. 130, p. 166-176, 2007.

LEVY, D.; KAINZ, V.; BURSTEIN, R.; STRASSMAN, A.M. Mast cell degranulation distinctly activates trigemino-cervical and lumbosacral pain pathways and elicits widespread tactile pain hypersensitivity. **Brain, Behavior and Immunology**, v. 26, n.2, p. 311-317, 2012.

LUKÁCS, M.; HAANES, K.; MAJLÁTH, Z.; TAJTI, J.; VÉCSEI, L.; WARFVINGE, K.; EDVINSSON, L. Dural administration of inflammatory soup or Complete Freund's Adjuvant induces activation and inflammatory response in the rat trigeminal ganglion. **Journal of Headache Pain**, v. 16, p. 79, 2015.

KILINC, E.; FIRAT, T.; TORE, F.; KIYAN, A.; KUKNER, A.; TUNÇEL, N. Vasoactive Intestinal peptide modulates c-Fos activity in the trigeminal nucleus and dura mater mast cells in sympathectomized rats. **Journal of Neuroscience Research**, v. 93, p. 644-650, 2015.

MACIEL- JR, J. A. O uso de antiepilépticos na profilaxia da enxaqueca (migrânea). **Porque só alguns? Migrêneas cefaléias**, v. 9, n. 2, p. 50-54, 2006.

MALHOTRA, R. Understanding migraine: Potential role of neurogenic inflammation. **Annals of Indian Academy of Neurology**, v. 19, p. 175, 2016.

MARTELLA, G.; COSTA, C.; PISANI, A.; CUPINI, L. M.; BERNARDI, G.; CALABRESI, P. Antiepileptic drugs on calcium currents recorded from cortical and PAG neurons: therapeutic implications for migraine. **Cephalalgia**, v.28, p.1315-1326,

2008.

MILNER, P.M. Note on a possible correspondence between the scotomas of migraine and spreading depression of Leao. **Electroencephalography and Clinical Neurophysiology**, v. 10, p. 705, 1958.

MOULTON, E.A.; BECERRA, L.; JOHNSON, A.; BURSTEIN, R.; BORSOOK, R. Altered hypothalamic functional connectivity with autonomic circuits and the locuscoeruleus in migraine. **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. e95508, 2014.

NEEB, L.; HELLEN, P.; BOEHNKE, C.; HOFFMANN, J.; SCHUH-HOFER, S.; DIRNAGL, U.; ET AL. IL-1 $\beta$  stimulates COX-2 dependent PGE2 synthesis and CGRP release in rat trigeminal ganglia cells. **PLoS One**, v. 6, n. 3, p. e17360, 2011.

PETERSEN, K.; DYRBY, L.; WILLIAMSON, D.; EDVINSSON, L.; OLESEN, J. Effect of Hypotension and Carbon Dioxide Changes in an Improved Genuine Closed Cranial Window Rat Model. **Cephalalgia**, v. 25, n.1, p. 23-29, 2005.

RICE, F.L.; XIE, J.Y.; ALBRECHT, P.J.; ACKER, E.; BOURGEOIS, J.; NAVRATILOVA, E.; DODICK, D. W.; PORREXA, F. Anatomy and immunochemical characterization of the non-arterial peptidergic diffuse dural innervation of the rat and Rhesus monkey: Implications for functional regulation and treatment in migraine **Cephalalgia**, v. 37, n. 14, p. 1350-1372, 2017.

RIZZOLI, P. Preventive Pharmacotherapy in Migraine. *Headache*, v. 54, p. 364-369, 2014.

ROSA, A. C.; FANTOZZI, R. The role of histamine in neurogenic inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v. 170, p. 38-45, 2013.

ROSAS, E. P.; COSTA, R. F.; PAZ, S. T.; SILVA, A. P. F.; FREITAS, M. F. L, VALENÇA, M.M. Pharmacological mechanism of topiramate in the prophylaxis and treatment of migraine: a review. **Headache Medicine**, v.9, n.4, p.190-195, 2018.

ROZNIECKI, J.J.; DIMITRIADOU, V.; LAMBRACHT-HALL, M.; PANG, X.; THEOHARIDES, T.C. Morphological and functional demonstration of rat dura mater mast cell-neuron interactions in vitro and in vivo. **Brain Research**, v. 849, p. :1-15, 1999.

SCHUELER M, MESSLINGER K, DUX M, NEUHUBER, W.L.; DE COL, R. Extracranial projections of meningeal afferents and their impact on meningeal nociception and headache. **Pain**, v. 154, p. 1622-1631, 2013. SHANK, R.P.; GARDOCKI, J.F.;

STREETER, A.J.; MARYANOFF, B.E. An overview of the preclinical aspects of topiramate: Pharmacology, pharmacokinetics, and mechanism of action. **Epilepsia**, v. 41, n.1, p. S3-S9, 2000.

SHELUKHINA, I.; MIKHAILOV, N.; ABUSHIK, P.; NURULLIN, L.; NIKOLSKY, E. E.; GINIATULLIN, R. Cholinergic Nociceptive Mechanism in Rat Meninges and Trigeminal Ganglia: Potential Implications for Migraine Pain. **Frontiers in Neurology**, v. 8, p.163, 2017.

SILBERSTEIN, S.D. Preventive treatment of Migraine. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 27, n.8, p. 410-415, 2006.

SILBERSTEIN, S. D.; HOLLAND, S.; FREITAG, F.; DODICK, D.W.; ARGOFF, C.; ASHMAN, E.; QUALITY STANDARDS SUBCOMMITTEE OF THE AMERICAN ACADEMY OF NEUROLOGY AND THE AMERICAN HEADACHE SOCIETY.

Evidence-based guideline update: pharmacologic treatment for episodic migraine prevention in adults: report of the quality standards subcommittee of the American Academy of Neurology and the American Headache Society. **Neurology**, v. 78, p. 1337-1345, 2012.

SILBERSTEIN, S.D. Topiramate in migraine prevention: a 2016 perspective. **Headache: The Journal of Head and Face Pain**, v. 57, p. 165-78, 2017.

SPRITZER, S.D.; BRAVO, T. P.; DRAZKOWSKI, J. F. Topiramate for Treatment in Patients with Migraine and Epilepsy. **Headache**, v. 56, n. 6, p. 1081-1085, 2016.

STORER, R.J.; GOADSBY, P.J. Topiramate inhibits trigeminovascular neurons in the cat. **Cephalalgia**, v. 4, p. 1049-1056, 2004.

SULLIVAN MN, GONZALES AL, PIRES PW, BRUHL A, LEO MD, LI W, OULIDI, A.; BOOP, F. A.; FENG, Y.; JAGGAR, J. H.; WELSH, D. G.; EARLEY, S. (2015) Localized TRPA1 channel Ca<sup>2+</sup> signals stimulated by reactive oxygen species promote cerebral artery dilation. **Science Signaling**, v. 8, n. 358, p. ra2, 2015.

SUZUKI, N.; HARDEBO, J. E.; OWMAN, C. Origins and pathways of cerebrovascular vasoactive intestinal polypeptide-positive nerves in rat. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 8, p.697-712, 1988.

SZOLCSANYI, J. Capsaicin, irritation and desensitization. **Neurophysiological basis and future perspectives**. In: Green BG, Mason JR, Kare MR. eds. Chemical senses; New York: Marcel Dekker, p. 141-70, 1990.

TFELT-HANSEN, P.; BLOCK, G.; DAHLOF, C.; DIENER, H-C.; FERRARI, M. D.; GOADSBY, P. J.; GUIDETTI, V.; JONES, B.; LIPTON, R. B.; MASSIOU, H.; MEINERT, C.; SANDRINI, G.; STEINER, T.; WINTER, P. B. O. Guidelines for controlled trials of drugs in migraine: Second edition. **Cephalalgia**, v. 20, p. 765-786, 2000.

THEOHARIDES, T. C.; DONELAN, J.; KANDERE-GRZYBOWSKA, K.; KONSTANTINIDOU, A. The role of mast cells in migraine pathophysiology. **Brain Research Reviews**, v. 49, p. 65-76, 2005.

TORE, F.; KORKMAZ, O. T.; DOGRUKOL-AK, D.; TUNÇEL, N. The effects of vasoactive intestinal peptide on dura mater nitric oxide levels and vessel-contraction responses in sympathectomized rats. **Journal of Molecular Neuroscience**, v.41, p. 288-293, 2010.

TUNALI, S.; CIMEN, E. S.; YANARDAG, R. The effects of chard on brain damage in valproic acid-induced toxicity. **Journal of Food Biochemistry**, p. 1-7, 2020.

< <http://doi:10.1111/jfbc.13382>>.

VALENÇA, M. M.; MEDEIROS, F. L.; MARTINS, H. A.; MASSAUD, R. M.; PERES, M. F. P. Neuroendocrine dysfunction in fibromyalgia and migraine. **Current Pain and Headache Reports**, v. 13, n.5, p.358-364, 2009.

- WALLENGREN, J.; HAKÁNSON, R. Effects of substance P, neurokinin A and calcitonin gene-related peptide in human skin and their involvement in sensory-mediated responses. **European Journal of Pharmacology**, v.143, p. 267-73, 1987.
- WEATHERALL, M.W. **The diagnosis and treatment of chronic migraine**, Sage UK: London, England, SAGE Publications. 2015
- WHITE, H.S. Molecular pharmacology of topiramate: managing seizures and preventing migraine. **Headache**, v. 45, p. S48-56, 2005.
- WU, X.; ZHANG, M.; HUANG, H. Effect of Qilongtutong granule on calcitonin gene-related peptide, beta-endorphin, serotonin, dopamine, and noradrenalin in migraine model rats and mice. **Journal of Traditional Chinese Medicine**, v. 34,n.2, p.188-193, 2014.
- ZHOU, N.; GORDON, G.R.; FEIGHAN, D.; MACVICAR, B.A. Transient swelling, acidification, and mitochondrial depolarization occurs in neurons but not astrocytes during spreading depression. **Cerebral Cortex**, v. 20, p. 2614-2624, 2010.

## APÊNDICE A- QUANTIFICAÇÃO DE MASTÓCITOS POR AMOSTRAS DE DURA-MÁTER EM RATOS.

	Femea							Média DP		Macho										
Control Gr	157	170	82	200	153	108	115	140,7143	40,75829											
Control D	34	34	20	35	29	34	28	30,57143	5,411628	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	Média DP			
Caps Gr	65	62	41	38	48	37	39	47,14286	11,76759	Control Gr	198	174	15	15	140	9	15	152,8571	30,5200	
CapsDg	147	147	120	110	120	124	120	126,8571	14,40403	Control D	80	6	6	4	55	4	6	58,42857	12,6076	
Porcentagem																				
	Controle	GR	DR				Caps	GR	DG		CapsDg	200	157	13	16	180	120	14	156,4286	27,0915
R1	82,20%	17,80%					30,60%	69,30%												105,1786
R2	83,30%	16,70%					29,60%	70,40%			Porcentagem					Porcentagem				
R3	80,40%	19,60%					25,40%	74,60%		Controle	GR	DR			Caps	GR	DG			
R4	85,10%	14,90%					25,60%	74,40%		R1	74%	26,11%				23,08%	76,92%			
R5	84,00%	16%					28,50%	71,50%		R2	74,35%	25,64%				25,94%	74,05%			
R6	76%	24%					22,90%	76,10%		R3	69,76%	30,23%				21,59%	78,40%			
R7	80%	20%					24,5	75,50%		R4	75,50%	24,50%				28,57%	71,42%			
		18,43%	3%					73,11%	3%	R5	71,79%	28%				24,05%	75,94%			
										R6	71%	28%				27,71%	72,28%			
	Gavagem controle									R7	72%	28%				26,70%	73,29%			
R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	média DP				27,21%	2					74,61%	3%		
Control Gr	160	122	145	134	200	180	193	162	30,01666											
Control D	59	40	57	47	60	50	60	53,28571	7,782765	TOP GAVAGEM										
Cap Gr	52	42	49	56	35	58	53	49,28571	8,159132	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	Média DP			
Cap Dg	141	120	182	173	174	180	196	166,5714	26,46921	Control Gr	129	168	26	25	200	221	17	201,7143	48,3484	
										Control D	35	4	7	5	48	7	6	56,14286	15,5287	
										Cap Gr	189	119	24	28	153	220	20	201,5714	55,4342	
										Cap Dg	50	3	6	6	43	8	6	58,85714	17,4301	
Porcentagem																				
Control Gr	DG				Cap	GR	DG			Porcentagem										
R1	73,05%	26,94%				26,94%	73,05%													
R2	75,30%	24,69%				25,92%	74,07%			Control GR	DG				Cap	Gr	DG			
R3	74,25%	25,75%				21,21%	78,78%			R1	77,30%	22,69%				79,07%	20,92%			
R4	74,03%	25,96%				24,45%	75,54%			R2	79,62%	20,37%				76,77%	23,22%			
R5	76,92%	23,07%				16,74%	83,25%			R3	81,08%	18,91%				79,34%	20,65%			
R6	76,59%	23,40%				24,36%	75,63%			R4	83,22%	16,77%				80,57%	19,43%			
R7	76,28%	23,71%				21,28%	78,71%			R5	80,64%	19,35%				78,07%	21,93%			
		24,79%	1%				77,00%	1%		R6	74,91%	25,08%				71,43%	28,57%			
										R7	72,13%	27,86%				75,10%	24,90%			

TOP AGUDO								21,58%	4%	22,80%	1%
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	Média	DP		
Control Gr	175	300	228	260	170	190	162	212,1429	52,31452		
Control D	64	180	125	160	86	115	107	119,5714	40,22792		
Cap-Top G	215	200	298	183	131	126	100	179	67,41414		
Cap-Top D	204	168	240	140	100	100	72	146,2857	61,13841		

Porcentagem					
Controle	GR	DG	Cap+TOP	GR	DG
R1	73,22%	26,77%		51,31%	48,68%
R2	62,50%	37,50%		54,34%	45,65%
R3	64,58%	35,41%		55,39%	44,60%
R4	62%	38,09%		56,65%	43,34%
R5	66,40%	33,59%		56,70%	43,29%
R6	61,01%	38,98%		55,75%	44,24%
R7	60,22%	39,78%		58,13%	41,86%
	35,73%	1%		44,52%	1%

**GR-Granulado; DG-Degranulado.**

# ANEXO A-

## PHARMACOLOGICAL MECHANISM OF TOPIRAMATE IN THE PROPHYLAXIS OF AND TREATMENT OF MIGRAINE: A REVIEW

VIEW AND REVIEW

### Mecanismos farmacológicos do topiramato na profilaxia e tratamento da enxaqueca: uma revisão

Pharmacological mechanism of topiramate in the prophylaxis and treatment of migraine: a review

Emanuela Paz Rizzo<sup>1</sup>, Raiza Ferreira Costa<sup>1</sup>, Silvana Ivoares Paz<sup>1</sup>, Ana Paula Fernandes da Silva<sup>1</sup>,  
Manuela Freitas Lyra de Freitas<sup>1</sup>, Marcelo Moraes Valença<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LKA) Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Brasil

<sup>2</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, UFPE, Brasil

<sup>3</sup>Programa de Pós-graduação em Saúde Translacional, UFPE, Brasil

<sup>4</sup>Departamento de Anatomia, UFPE, Brasil

Rizzo EP, Costa RF, Paz SI, Silva APF, Freitas MFL, Valença MM. Mecanismos farmacológicos do topiramato na profilaxia e tratamento da enxaqueca: uma revisão. *Headache Medicine*. 2018;9(4): 190-95

#### RESUMO

**Objetivo:** Esta revisão busca trazer evidências de estudos que abordam os mecanismos de ação do topiramato na prevenção e tratamento da enxaqueca. **Introdução:** A enxaqueca é um distúrbio neurovascular que acomete grande parte da população mundial. O uso de profilaxia contribui para a diminuição da frequência e gravidade desta doença. Dentre os fármacos neuromoduladores utilizados, o topiramato vem se mostrando como um das mais eficazes para o tratamento preventivo de enxaqueca. Apesar dos mecanismos de ação desta droga ainda não estarem bem elucidados na literatura, existem diversas hipóteses moleculares propostas. **Metodologia:** Foi realizada um levantamento na literatura, no período de fevereiro a março de 2018, em diferentes bases de dados, utilizando os seguintes termos: topiramato, enxaqueca e mecanismos de ação. Após uma seleção criteriosa, 25 artigos foram selecionados para esta revisão. **Resultados:** Estudos apontaram que os principais mecanismos de ação os quais o topiramato atua está relacionado a uma modulação dos canais iônicos de sódio e cálcio voltagem-dependentes, a bloqueio da transmissão excitatória do glutamato e inibição através dos receptores Ácido gama-aminobutírico (GABA), AMPA/kainato e de algumas isoenzimas da anidrase carbônica. Além disso, o topiramato está envolvido na supressão da depressão alastrante cortical, na influência da atividade trigemino-vascular e na excitabilidade neuronal. **Conclusão:** Sendo assim, o topiramato poderia estar envolvido na prevenção dos principais eventos da fisiopatologia da enxaqueca. Atuando diretamente na depressão alastrante cortical (DAC), na sinalização trigemino-vascular e na diminuição da sensibilização central da dor da enxaqueca.

**Palavras-chave:** Topiramato; transtornos de enxaqueca; farmacologia

#### ABSTRACT

**Objective:** This review sought to bring evidence of studies addressing the mechanisms of action of topiramate in the prevention and treatment of migraine. **Background:** Migraine is a neurovascular disorder that affects a large part of the world population. The use of prophylaxis contributes to the decrease in the frequency and severity of this disease. Among the antiepileptic drugs, the topiramate, has proven to be the most effective for the treatment of migraine. Although the mechanism of action of this drug is still not well elucidated in the literature, there are several molecular mechanisms proposed. **Methodology:** A survey was carried out in the literature, from February to March 2018, in different databases, using the descriptors: topiramate, migraine and mechanisms of action. After a careful selection, 25 manuscripts were chosen for this review. **Results:** Evidence from a number of studies has indicated that the main mechanisms of action of topiramate are related to the modulation of voltage-dependent sodium and calcium ion channels, blockade of excitatory glutamate transmission and inhibition by gamma-aminobutyric acid receptors (GABA), AMPA/kainate and some isoenzymes of carbonic anhydrase. In addition, topiramate is involved in the suppression of cortical spreading depression, besides influencing trigemino-vascular activity, and neuronal excitability. **Conclusion:** Thus, topiramate could be involved in the prevention of major events of the pathophysiology of migraine. Acting directly on cortical spreading depression (DAC), trigemino-vascular signal and decreased central sensitization of migraine pain.

**Keywords:** Topiramate; Migraine disorder; Pharmacology

## ANEXO B-

### OF THE AVAILABLE TRIPTANS, WHICH SHOULD BE CHOSEN AND HOW SHOULD THEY BE USED?

VIEW AND REVIEW

### Of the available triptans, which should be chosen and how should they be used?

#### Dos triptanos disponíveis, quais devem ser escolhidos e como devem ser usados?

Marcelo Moraes Valença<sup>1</sup>  
 Emanuella Paz Rosa<sup>1</sup>  
 Raissa Ferreira Costa<sup>1</sup>  
 Amanda Araújo da Silva<sup>1</sup>  
 Maria Rosana de Souza Ferreira<sup>1</sup>  
 Rita Santana dos Reis<sup>1</sup>  
 Marcelo Andrade Valença<sup>1</sup>  
 Luciana Patrícia Alves de Andrade-Valença<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Neurology and Neurosurgery Unit, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil.

**ABSTRACT**

There is a plethora of articles dealing with the use of triptans to treat migraine, but so far no unanimity exists regarding the optimal form of using this group of drugs in a patient with recurrent attacks of migraine. Although all of them may exert their pharmacological effects through a known specific mechanism of action, ie, agonist effects on serotonin 5-HT<sub>1B/1D</sub> receptors, distinct differences exist. The author comments a few facts on the prescription of triptans and possible adverse effects, depending on the clinical scenario. Thus, even though an enormous amount of information has accumulated over the last few decades on triptans, several questions remain to be answered, and research priorities need to be addressed.

**Keywords:** Triptans, Adverse Effect, Migraine, Prescription.

**\*Correspondence**  
 Marcelo M. Valença  
 E-mail: mmvalenca@ufpe.br

Received: October 2, 2018  
 Accepted: December 10, 2018  
 DOI: 10.5935/2176-7468.20180021

**RESUMO**

Há uma infinidade de artigos que tratam do uso de triptanos no tratamento da enxaqueca, mas até agora não existe unanimidade em relação à forma ideal de usar esse grupo de medicamentos em um paciente com ataques recorrentes de enxaqueca. Embora todos eles possuam efeitos e seus efeitos farmacológicos através de um mecanismo de ação específico conhecido, isto é, efeitos agonistas nos receptores da serotonina 5-HT<sub>1B/1D</sub>, existem diferenças distintas. Os autores comentam alguns fatos sobre a prescrição de triptanos e possíveis efeitos adversos, dependendo do cenário clínico. Assim, embora uma quantidade enorme de informações tenha se acumulado nas últimas décadas sobre triptanos, várias questões ainda precisam ser respondidas e as prioridades de pesquisa precisam ser abordadas.

**Descritores:** Triptanos, Efeito Adverso, Enxaqueca, Prescrição.

Headache Medicine, v.10, n.1, p.29-31, 2019

29

## ANEXO C-

# HISTOMORPHOMETRIC ANALYSIS OF MAST CELLS IN DIFFERENT REGIONS OF HUMAN INTRACRANIAL DURA MATER

SHORT COMMUNICATION

### Histomorphometric analysis of mast cells in different regions of human intracranial dura mater

Análise histomorfométrica de mastócitos em diferentes regiões da dura-máter intracraniana humana

Emanuela Paz Rossi<sup>1</sup>  
 Silvanie Tavares Paz<sup>2</sup>  
 Ana Clara de Souza Neto<sup>3</sup>  
 Raísa Ferreira Costa<sup>4</sup>  
 Ana Paula Fernandes de Sá<sup>5</sup>  
 Maruella Figueira Lyra de Freitas<sup>6</sup>  
 Marcelo Moraes Valença<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde - UNIAFOP;  
<sup>2</sup>Programa de Pós-graduação em Saúde Translacional - CCSA/UFPE;  
<sup>3</sup>Departamento de Nutrição - CCSA/UFPE;  
<sup>4</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas - CCSA/UFPE;  
<sup>5</sup>Oncoterapias de Anestesia - CCSA/UFPE;  
<sup>6</sup>Rede de Neurologia, Brasil

#### ABSTRACT

**Objective:** To analyze mast cell histomorphometry in three different regions of the human intracranial dura mater. **Method:** Three specimens of dura mater were collected after approval by the Ethics Committee (CAAE No. 576022/16.5.0000/5208). Each dura mater was obtained from human cadavers between 7 and 24 hours after death. After collection, the samples were fixed, cut into two fragments and longitudinally placed in the following way: external (periosteum) and internal (meningeal) sides. The fragments (1.5 cm<sup>2</sup>) were taken from three different regions: proximity of the right middle meningeal artery, the proximity of the left middle meningeal artery and superior sagittal sinus. These fragments were submitted to microtomy (10 Qm), stained with 0.1% toluidine blue and analyzed by optical microscopy. The histomorphometric parameters adopted were: the distance from the mast cells to the vessels, the number and if the mast cells were degranulated. Five fields from each case were analyzed. For this analysis, the Image J 1.52a 2019 software was used. **Results:** A higher number of mast cells was observed in the periosteal layer when compared with the meningeal layer ( $p=0.026$ ). When the distribution of the mast cells was evaluated, we observed that the cells were localized in the proximity of the middle meningeal artery ( $p<0.05$ ). **Conclusion:** In human dura mater, the mast cells are localized in the proximity of dual arteries.

**Keywords:** Mast cell; Dura mater; Human; Meningeal artery; Migraine

#### RESUMO

**Objetivo:** Analisar a histomorfometria dos mastócitos em três regiões diferentes da dura-máter intracraniana humana. **Método:** Três amostras de dura-máter foram coletadas após aprovação pelo Comitê de Ética (CAAE nº 576022/16.5.0000/5208). Cada dura-máter foi obtida de cadáveres humanos entre 7 e 24 horas após a morte. Após a coleta, as amostras foram fixadas, cortadas em dois fragmentos e dispostas longitudinalmente da seguinte maneira: face externa (periosteal) e interna (meníngea). Os fragmentos (1,5 cm<sup>2</sup>) foram retirados de três regiões diferentes: proximidade da artéria meníngea média direita, proximidade da artéria meníngea média esquerda e seno sagital superior. Esses fragmentos foram submetidos à microtomia (10 Qm), corados com azul de toluidina a 0,1% e analisados por microscopia óptica. Os parâmetros histomorfométricos adotados foram: distância dos mastócitos aos vasos, número e se os mastócitos estavam desgranulados. Foram analisados cinco campos de cada espécime. Para esta análise, foi utilizado o software Image J 1.52a 2019. **Resultados:** Observou-se maior número de mastócitos na camada periosteal quando comparada à camada meníngea ( $p = 0,026$ ). Quando avaliada a distribuição dos mastócitos, observamos que as células estavam localizadas nas proximidades da artéria meníngea média ( $p < 0,05$ ). **Conclusão:** Na dura-máter humana, os mastócitos estão localizados nas proximidades das artérias duplas.

**Descritores:** Mastócito; Dura-máter; Humano; Artéria meníngea; Enxaqueca.

\*Correspondence:  
 Emanuela Paz Rossi  
 E-mail: manzi\_paz@yahoo.com

Received: April 2, 2019  
 Accepted: May 4, 2019

DOI: 10.5833/2178-2468.20190013

## ANEXO D- COMITÊ DE ÉTICA ANIMA



Universidade Federal de Pernambuco  
 Centro de Biociências  
 Av. Prof. Nelson Sbrana, s/n  
 50670-420 / Recife - PE - Brasil  
 Fones: 2126 8842  
 ceua@ufpe.br

Recife, 11 de julho de 2019

Ofício nº 38/19

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof. Marcelo Moraes Valença**  
 Universidade Federal de Pernambuco  
 Processo nº 23076.041888/2018-90

Certificamos que a proposta intitulada "Liberação in vivo de CGRP e ocitocina de dura- mãe de rato: influência do topiramato da sumatriptana", registrado com o nº 23076.041888/2018-90 sob a responsabilidade de Prof. Marcelo Moraes Valença o que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 02/07/2019

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	10/08/2019 a 11/08/2020
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogenico
Nº de animais	48
Peso/idade	200-250g/ 60 dias
Sexo	Macho ( 48)
Origem: Biotério de Criação	Biotério do Departamento de Anatomia
Destino: Biotério de Experimentação	Biotério do Departamento de Anatomia

Atenciosamente,

Profª D<sup>ª</sup> Isvânia Lopes  
 Vice-Presidente  
 da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE  
 UFPE SIAPE Nº 1903075