

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS

GABRIELA ALICE FIAIS

**Avaliação dos efeitos tóxicos do levetiracetam nos
parâmetros bioquímicos, funcionais e redox das glândulas
salivares em ratos machos Wistar**

**Araçatuba
2023**

GABRIELA ALICE FIAIS

**Avaliação dos efeitos tóxicos do levetiracetam nos
parâmetros bioquímicos, funcionais e redox das glândulas
salivares em ratos machos Wistar**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Hernandez Chaves Neto

**Araçatuba
2023**

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

F438a Fiais, Gabriela Alice.
Avaliação dos efeitos tóxicos do levetiracetam nos parâmetros bioquímicos, funcionais e redox das glândulas salivares em ratos machos Wistar. - Araçatuba, 2023
59 f. il. ; tab., graf.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba
Orientador: Prof. Antonio Hernandes Chaves Neto

1. Levetiracetam 2. Anticonvulsivante 3. Saliva
4. Glândulas salivares 5. Estresse oxidativo I. T.

CDD 612

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE GABRIELA ALICE FIAIS, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MULTICÊNTRICO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS, DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA - CÂMPUS DE ARAÇATUBA.

Aos 26 dias do mês de setembro do ano de 2023, às 14:00 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de GABRIELA ALICE FIAIS, intitulada **Avaliação dos efeitos tóxicos do levetiracetam nos parâmetros bioquímicos, funcionais e redox das glândulas salivares em ratos machos Wistar**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. ANTONIO HERNANDES CHAVES NETO (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Departamento de Ciências Básicas / Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, Profa. Dra. GRACIELI PRADO ELIAS (Participação Virtual) do(a) Departamento de Odontologia Social e Infantil / Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF, Prof. Dr. FERNANDO NEVES NOGUEIRA (Participação Virtual) do(a) Departamento de Biomateriais e Biologia Oral / Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo - USP. Após a exposição pela mestrande e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: APROVADA. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.



Prof. Dr. ANTONIO HERNANDES CHAVES NETO

À minha família, que sempre esteve ao meu lado com amor incondicional e apoio, dedicando-se a incentivar cada passo que dei. Este trabalho é dedicado a vocês, que foram minha fonte de força e inspiração.

Ao meu orientador, cuja orientação, ensino, paciência e sabedoria foram essenciais para moldar este trabalho.

Aos meus amigos, que caminharam comigo nesta jornada, compartilhando risadas e desafios.

AGRADECIMENTOS

À minha família amada, cujo apoio constante, amor incondicional e encorajamento foram meu alicerce ao longo desta jornada. Agradeço do fundo do meu coração por serem a minha base sólida e meu refúgio seguro. Vocês são a razão pela qual cheguei até aqui.

A Deus, por ter permitido que eu tivesse saúde e forças durante a realização deste trabalho.

Ao grupo meu querido e excelente grupo de pesquisa: Rayara, Douglas, Lucas e Marcelo, por trabalharem incansavelmente em prol de objetivos comuns e por cultivarem um ambiente de aprendizado mútuo e crescimento, cuja colaboração e dedicação foram pilares indispensáveis ao longo desta minha jornada acadêmica. Este trabalho é uma homenagem ao espírito de equipe que nos uniu e à contribuição inestimável de cada um de vocês para o sucesso deste projeto.

Aos mestrandos e amigos de laboratório, Larissa, Arieli e Renan, cuja presença e amizade transformaram cada dia de pesquisa em uma experiência memorável. Cada momento compartilhado no laboratório foi uma oportunidade para aprender, crescer e colaborar de maneiras que transcendem as palavras.

Aos demais membros do grupo de pesquisa do Laboratório de Bioquímica: Lívia, Heloísa, Pedro, José Vitor e Lauani.

Aos alunos do Laboratório Experimental de Biologia do Exercício, em especial a Allice, e a coordenadora Prof. Dra. Giovana Rampazzo Teixeira, pelo suporte essencial na análise histológica desta dissertação. O compromisso com a precisão e qualidade dos resultados foi notável. Esta pesquisa não teria alcançado seu potencial sem a valiosa assistência de vocês.

Aos discentes do Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, pela amizade e companheirismo.

Aos Professores do Departamento de Ciências Básicas da FOA - UNESP, Cristina Antoniali, Rita Dornelles, Sandra, Dóris e João.

A todos os demais funcionários do Departamento de Ciências Básicas da FOA - UNESP, cujos trabalhos são essenciais para o bom funcionamento desta universidade.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Código de Financiamento 001, pela concessão da bolsa de mestrado.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP processo no. 2021/10604-7), pelo financiamento em parte desta pesquisa.

A Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP e ao Programa de Pós Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas pela oportunidade de poder realizar e concluir o Mestrado.

Ao Dr. Walid D. Fakhouri, professor na School of Dentistry - University of Texas Health Science Center at Houston, pelo valioso auxílio prestado na escrita, elaboração e correção do artigo científico.

A Professora Ana Cláudia de Melo Stevanato Nakamune, sua dedicação à educação e sua paixão pelo ensino deixaram uma marca duradoura em minha jornada. Agradeço por compartilhar sua sabedoria e conhecimento.

Ao meu orientador, Professor Antonio Hernandes Chaves Neto, cuja orientação marcou profundamente minha jornada acadêmica. Suas valiosas contribuições, paciência e apoio constante foram essenciais para minha formação. Expresso minha profunda gratidão pela oportunidade de aprender com sua visão e conhecimento, e por me guiar com sabedoria e compreensão.

“Na vida, não existe nada a temer, mas a entender”

Marie Curie

Fiais, G. A. **Avaliação dos efeitos tóxicos do levetiracetam nos parâmetros bioquímicos, funcionais e redox das glândulas salivares em ratos machos Wistar**. 2023. 59 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

RESUMO

Levetiracetam (LEV) é um anticonvulsivante usado para o tratamento da epilepsia. Os efeitos tóxicos deste medicamento nos tecidos têm sido associados ao desequilíbrio do estado redox, que pode levar à disfunção das glândulas salivares. Portanto, o presente trabalho investigou os efeitos do LEV nos parâmetros bioquímicos, funcionais e redox das glândulas parótidas e submandibulares em ratos. Para isso, ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus albinus*) foram divididos aleatoriamente em 3 grupos (n=10/grupo): Controle (soro fisiológico 0,9%), LEV100 (100 mg/kg) e LEV300 (300 mg/kg). Após 21 dias consecutivos de tratamentos com gavagem intragástrica, a secreção de saliva estimulada pela pilocarpina foi coletada para análise bioquímica salivar. As glândulas salivares extraídas foram utilizadas para histomorfometria e análises do estado redox. Nossos resultados mostraram que o LEV300 aumentou os marcadores de hepatotoxicidade plasmática e reduziu a atividade da amilase salivar e a área de superfície acinar da glândula parótida. A capacidade oxidante total e o dano oxidativo a lipídios e proteínas foram maiores na glândula parótida, enquanto a capacidade antioxidante total e os níveis de ácido úrico foram reduzidos na glândula submandibular do grupo LEV100 em comparação ao controle. Por outro lado, a capacidade oxidante total, o dano oxidativo a lipídios e proteínas, a capacidade antioxidante total e os níveis de ácido úrico foram menores em ambas as glândulas salivares do grupo LEV300 em comparação ao controle. As atividades da superóxido dismutase e da glutathione peroxidase foram menores nas glândulas salivares dos animais tratados em comparação ao controle. Concluindo, nossos dados sugerem que o tratamento com LEV representa um agente potencialmente tóxico, que contribui para a disfunção das glândulas salivares induzida por drogas.

Palavras-chave: Levetiracetam. Anticonvulsivante. Saliva. Glândulas salivares. Estresse oxidativo.

Fiais, G. A. **Assessment of the toxic effects of levetiracetam on biochemical, functional, and redox parameters of salivary glands in male Wistar rats.** 2023. 59 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

ABSTRACT

Levetiracetam (LEV) is an anticonvulsant for epilepsy. The toxic effects of this medication in tissues have been associated with redox state imbalance, which can lead to salivary gland dysfunction. Therefore, the current work investigated the effects of LEV on the biochemical, functional, and redox parameters of the parotid and submandibular glands in rats. For this, male Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*) were randomly divided into 3 groups (n=10/group): Control (0.9% saline solution), LEV100 (100 mg/kg), and LEV300 (300 mg/kg). After 21 consecutive days of intragastric gavage treatments, pilocarpine stimulated saliva secretion was collected for salivary biochemical analysis. The extracted salivary glands were utilized for histomorphometry and redox state analyses. Our results showed that LEV300 increased plasma hepatotoxicity markers and reduced salivary amylase activity and the acinar surface area of the parotid gland. Total oxidant capacity and oxidative damage to lipids and proteins were higher in the parotid gland, while total antioxidant capacity and uric acid levels were reduced in the submandibular gland of the LEV100 group compared to Control. On the other hand, total oxidant capacity, oxidative damage to lipids and proteins, total antioxidant capacity, and uric acid levels were lower in both salivary glands of the LEV300 group compared to Control. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities were lower in the salivary glands of treated animals compared to Control. In conclusion our data suggest that treatment with LEV represents a potentially toxic agent, that contributes to drug-induced salivary gland dysfunction.

Keywords: Levetiracetam. Anticonvulsant. Saliva. Salivary glands. Oxidative stress.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Mecanismo de ação de medicamentos anticonvulsivantes clinicamente aprovados.....	14
Figura 2	Fluxograma esquemático do estudo.....	19
Figura 3	Efeitos do LEV nos parâmetros histomorfométricos das glândulas salivares.....	28
Figura 4	Efeitos do LEV no fluxo salivar e parâmetros bioquímicos salivares.....	30
Figura 5	Efeitos do tratamento com LEV na capacidade oxidante total, dano oxidativo lipídico e proteico nas glândulas salivares.....	32
Figura 6	Efeitos do LEV na defesa antioxidante não enzimática das glândulas salivares.....	34
Figura 7	Efeitos do LEV na defesa antioxidante enzimática das glândulas salivares.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Efeitos do LEV nas transaminases, peso corporal, consumo de ração e água, massa e index das glândulas salivares.....	26
----------	--	----

LISTA DE SIGLAS

ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de Variância
ARRIVE	Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments
AST	Aspartato aminotransferase
CAT	Catalase
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Animais Experimentação
DNPH	2,4-dinitrofenil-hidrazina
DTNB	5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoato)
DTPA	Ácido dietilenotriaminopentacético
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
g	Grama
GSH	Glutationa reduzida
GSSG	Glutationa oxidada
GPx	Glutationa peroxidase
GR	Glutationa redutase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IM	Intramuscular
IP	Intraperitoneal
L	Litro
LEV	Levetiracetam
M1	Receptor muscarínico 1
M3	Receptor muscarínico 3
mc	Massa corpórea
mg	Miligrama
mL	Mililitro
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
PMSF	Fluoreto de fenilmetanossulfonil
SOD	Superóxido dismutase
SV2A	Vesícula sináptica 2A

TBARs	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TC	Tecido conjuntivo
TCA	Ácido tricloroacético
TCG	Túbulo convoluto granular
U	Unidade de atividade enzimática

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo geral	17
2.1.1 Objetivos específicos	17
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3.1 Animais e aspectos éticos	18
3.2 Delineamento experimental.....	18
3.3 Coleta da saliva, fluxo, pH e capacidade tamponante salivar	19
3.4 Coleta e armazenamento de amostras de tecido e plasma	20
3.5 Parâmetros bioquímicos.....	20
3.5.1 Análise das atividades de aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase.....	21
3.5.2 Análises bioquímicas salivares	21
3.6 Processamento histológico e análise histomorfométrica	21
3.7 Análises bioquímicas das glândulas salivares	22
3.7.1 Preparação do homogenato das glândulas salivares	22
3.7.2 Determinação do dano oxidativo	23
3.7.3 Efeitos do LEV na defesa antioxidante tecidual não enzimática.....	23
3.7.3.1 Capacidade antioxidante total não enzimática.....	23
3.7.3.2 Determinação da concentração de ácido úrico	23
3.7.3.3 Determinação da concentração de GSH.....	23
3.7.4 Efeitos do LEV na defesa antioxidante tecidual enzimática.....	24
3.7.4.1 Determinação da atividade da SOD.....	24
3.7.4.2 Determinação da atividade da CAT	24
3.7.4.3 Determinação da atividade da GPx.....	24
3.9 Análise estatística	24
4 RESULTADOS	26
4.1 Atividade plasmática da ALT e AST, massa corpórea, ingestão de ração e água, peso e index das glândulas salivares.....	26
4.2 Efeitos do tratamento com LEV nos parâmetros histomorfométricos das glândulas salivares.....	27
4.3 Efeitos do tratamento com LEV nos parâmetros bioquímicos salivares	29
4.4 Efeitos do tratamento com LEV nos marcadores de dano oxidativo.....	31
4.5 Efeitos do tratamento com LEV na defesa antioxidante não enzimática	33

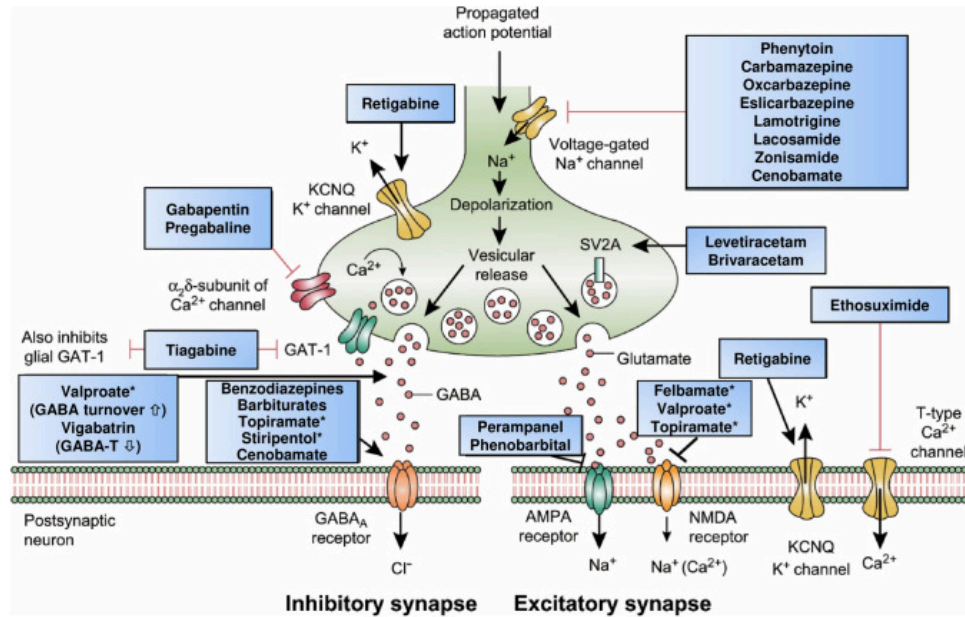
4.6 Efeitos do tratamento com LEV na defesa antioxidante enzimática	35
5 DISCUSSÃO	38
6 CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS	47
ANEXO A – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	57

1 INTRODUÇÃO

A epilepsia é uma doença neurológica crônica caracterizada por crises epiléticas recorrentes não provocadas (espontâneas), que podem ser de natureza focal ou generalizada (LOSCHER; POTSCHKA; SISODIYA; VEZZANI, 2020). Afeta cerca de 50 milhões de pessoas da população mundial (OMS., 2023), o que a torna uma das doenças neurológicas mais comuns em todo o mundo (SPICIARICH; VON GAUDECKER; JURASEK; CLARKE et al., 2019) e um grande problema de saúde pública (OMS., 2023) por afetar a qualidade de vida, aumentar a morbidade e o risco de mortalidade prematura, e diversas consequências físicas e psicológicas (THIJS; SURGES; O'BRIEN; SANDER, 2019). No Brasil, estima-se que tenha 340 mil casos novos ao ano, apresentando incidência anual de 190/100.000, com 1,8 milhões de pessoas com epilepsia ativa e 9 milhões de pessoas que já apresentaram crises epiléticas alguma vez nas suas vidas (GALLUCCI NETO; MARCHETTI, 2005). Contudo, dados gerais sobre o número de casos de epilepsias no Brasil ainda são escassos.

Entre as opções terapêuticas disponíveis, a farmacoterapia com anticonvulsivantes é uma parte essencial no controle das convulsões e na estabilização da epilepsia. No Brasil, são aprovados quinze fármacos anticonvulsivantes disponibilizados pelo Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Epilepsia do Ministério da Saúde (BRASIL, 2018) com diversos mecanismos de ação, dentre os principais, com ação na modulação de canais iônicos (exemplo da fenitoína, carbamazepina, lacosamida e ácido valproico), aumento da neurotransmissão inibitória (exemplo do fenobarbital, benzodiazepínicos e topiramato) e ligação à glicoproteína 2A de vesícula sináptica (SV2A), como é o caso do levetiracetam (LEV) (Figura 1) (LOSCHER; GILLARD; SANDS; KAMINSKI et al., 2016).

Figura 1 - Mecanismo de ação de medicamentos anticonvulsivantes clinicamente aprovados



Fonte: LÖSCHER et al. 2016

Entre essas opções, destaca-se o LEV, aprovado em 2015 pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária e disponibilizado a partir de 2017 pelo Sistema Único de Saúde tanto na forma de solução oral, como em comprimidos. É um anticonvulsivante de nova geração comumente prescrito (MARINO; VITALITI; MARINO; PAVONE et al., 2018) para tratar diferentes tipos de epilepsia em adultos e crianças (LI; WANG; ZHU; JIAO, 2021) devido ao seu amplo espectro de ação e um perfil farmacocinético favorável (TRINKA, 2011). Seu mecanismo de ação ainda não é totalmente esclarecido, mas evidências mostram que o principal alvo do LEV é atuar sobre os receptores de proteína da SV2A (LYNCH; LAMBENG; NOCKA; KENSEL-HAMMES et al., 2004; TAN; PAQUETTE; LEVINE; ENSOM, 2017), de forma a inibir a liberação de neurotransmissores excitatórios e, assim, reduzir a excitabilidade sináptica (HAKAMI, 2021) e promover proteção contra convulsões (DESHPANDE; DELORENZO, 2014). Além do mais, LEV também pode modular a sinalização de cálcio (CONTRERAS-GARCIA; CARDENAS-RODRIGUEZ; ROMO-MANCILLAS; BANDALA et al., 2022) e inibir os canais sinápticos dependentes de voltagem de cálcio (VOGL; MOCHIDA; WOLFF; WHALLEY et al., 2012) e canais controlados por potássio (MADEJA; MARGINEANU; GORJI; SIEP et al., 2003).

Contudo, estudos experimentais em roedores demonstraram que a administração crônica de LEV pode induzir a danos hepáticos (SABBAH; HANAFY; ARAFA, 2019), toxicidade reprodutiva em ratos (BAYSAL; ILGIN; KILIC; KILIC et al., 2017) e ratas (SVALHEIM; TAUBOLL; SURDOVA; ORMEL et al., 2008), disfunção

renal em ratas prenhas (SABBAH; HANAFY; ARAFA, 2019), diminuição da densidade mineral óssea (FEKETE; SIMKO; GRADOSOVA; MALAKOVA et al., 2013) e ao prejuízo na capacidade de memória e aprendizado (SARANGI; PATTNAIK; KATYAL; KALEEKAL et al., 2020). Além disso, o tratamento com LEV está associado ao aumento do dano oxidativo no cérebro de ratos (SARANGI; KAKKAR; KUMAR; GUPTA, 2016) e no plasma de crianças (HAZNEDAR; DOGAN; ALBAYRAK; OZ TUNCER et al., 2019). Portanto, considerando o risco de toxicidade tecidual deste medicamento, além do fato do LEV ser captado e secretado pelas glândulas salivares (KARAS-RUSZCZYK; KUCZYNSKA; SIENKIEWICZ-JAROSZ; KURKOWSKA-JASTRZEBSKA et al., 2017), é importante avaliar se este anticonvulsivante pode ter efeitos adversos na glândula salivar funções.

Em relação a saúde bucal, a xerostomia (GHAFOOR; RAFEEQ; DUBEY, 2014) e o aumento gengival (JOSHI; DESHPANDE; DESHPANDE; RATHORE, 2017) são os efeitos colaterais mais comuns dos anticonvulsivantes. Além do mais, alguns anticonvulsivantes são responsáveis pelo acúmulo do biofilme (MODEER; DAHLLOF; THEORELL, 1986), redução do fluxo e capacidade tamponante da saliva (KAMALI; THOMAS, 1994; LUNDSTROM; EEG-OLOFSSON; HAMP, 1982) e diminuição das concentrações de imunoglobulina A e cistatinas, componentes salivares com funções antimicrobianas (HENSKENS; STROOKER; VAN DEN KEIJBUS; VEERMAN et al., 1996), de modo a aumentar o risco de cárie (RAJAVAARA; VAINIONPAA; RATTYA; KNIP et al., 2003). Portanto, apesar da relevância da saliva na manutenção da homeostase bucal, por meio da capacidade tamponante, lubrificação, formação da película adquirida e atuação na remineralização (FAROOQ; BUGSHAN, 2020; MARSH; DO; BEIGHTON; DEVINE, 2016; PEDERSEN; SORENSEN; PROCTOR; CARPENTER et al., 2018; PROCTOR, 2016) ainda não está claro os efeitos dos anticonvulsivantes na secreção e composição salivar.

A saliva é composta em sua grande parte por água e uma pequena porção por proteínas e substâncias orgânicas (mucina, amilase, lipases, fatores de crescimento, peroxidases, etc.) e inorgânicas (cálcio, sódio, cloreto, potássio, fosfato, etc.) (CHIAPPIN; ANTONELLI; GATTI; DE PALO, 2007; LIU; DUAN, 2012) que desempenham funções biológicas na digestão, atividades antimicrobianas, sensação gustatória, proteção, lubrificação e na manutenção da saúde bucal e geral (ILEA; ANDREI; FEURDEAN; BABTAN et al., 2019). É secretada majoritariamente pelas glândulas salivares maiores: parótidas, submandibulares e sublinguais, e por

pequenas glândulas salivares submucosas (PROCTOR; SHAALAN, 2021). Além disso, a saliva é composta de antioxidantes que servem para contrabalançar o efeito dos radicais livres na cavidade oral, incluindo agentes enzimáticas: superóxido dismutase (SOD), peroxidases, catalase (CAT), e não enzimáticas: ácido úrico, glutathione reduzida (GSH), vitamina A, C e E, albumina, lactoferrina (AVEZOV; REZNICK; AIZENBUD, 2015; SCHWARTZ; NEIERS; FERON; CANON, 2020; ZUKOWSKI; MACIEJCZYK; WASZKIEL, 2018). Entretanto, a instabilidade deste sistema de defesa antioxidante está associada com as disfunções das glândulas salivares após o tratamento com fármacos, como o metronidazol (ONOPIUK; ONOPIUK; DABROWSKA; DABROWSKA et al., 2018), sibutramina (DOS SANTOS; FIAIS; OLIVEIRA; RIBAS et al., 2022), ciclosporina e tacrolimo (SPOLIDORIO; HERRERA; COIMBRA; DE ANDRADE et al., 2015).

Portanto, considerando a associação dos anticonvulsivantes com a deterioração da saúde bucal e evidências ligando o potencial efeito tóxico tecidual do LEV por meio o desequilíbrio do estado redox, o propósito do trabalho foi investigar os efeitos do tratamento com LEV nos parâmetros bioquímicos, funcionais e redox das glândulas parótidas e submandibulares de ratos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do tratamento com o LEV nos parâmetros bioquímicos, funcionais e redox das glândulas parótidas e submandibulares de ratos.

2.1.1 Objetivos específicos

Para responder a proposição e cumprir nosso objetivo geral, foram propostas as seguintes estratégias:

Avaliar o efeito das duas doses do LEV nas atividades das transaminases;

Avaliar o efeito do LEV na massa corpórea, consumo alimentar e de água, massa relativa das glândulas salivares;

Avaliar os aspectos histomorfométricos das glândulas parótidas e submandibulares por meio da coloração de hematoxilina e eosina;

Avaliar o fluxo salivar, capacidade tamponante, pH, concentração de proteína total, atividade da amilase, concentração de cálcio, fosfato, cloreto e potássio da saliva;

Avaliar a capacidade oxidante total, dano oxidativo lipídico e proteico no homogenato das glândulas salivares;

Avaliar a defesa antioxidante não enzimática das glândulas salivares por meio da capacidade antioxidante total, ácido úrico e GSH no homogenato;

Avaliar a defesa antioxidante enzimática das glândulas salivares por meio a atividade enzimática de SOD, CAT e GPx no homogenato.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e aspectos éticos

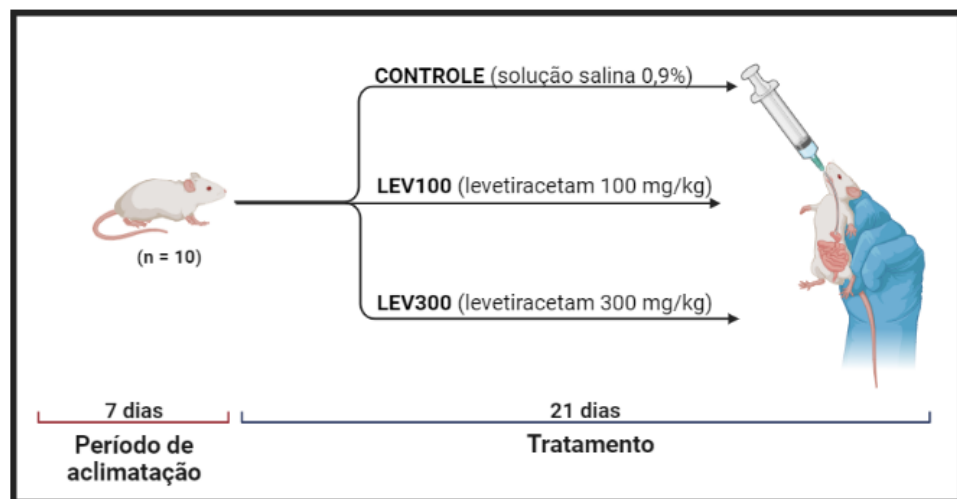
O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, São Paulo (Certificado de Autorização nº 0251-2021), seguindo as diretrizes brasileiras do Conselho Nacional de Controle de Animais Experimentação (CONCEA) e de acordo com a Diretiva da UE (2010/63/UE). Todos os experimentos cumpriram as diretrizes da ARRIVE. Foram utilizados trinta ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus albinus*) pesando aproximadamente 150 gramas, com 5 semanas de idade, foram obtidos no biotério local para este estudo. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas em ambiente com temperatura controlada de 21 ± 3 °C, ciclo claro/escuro de 12 horas e umidade relativa de $55 \pm 5\%$. Água e ração comercial padrão (Neovia Nutrição e Saúde Animal LTDA, Paulínia, SP, Brasil) foram fornecidas ad libitum durante todo o período de tratamento e também durante a adaptação ao biotério do Departamento de Ciências Básicas - Prédio 31 (7 dias). A massa corpórea, consumo de ração e água foram avaliados duas vezes por semana.

3.2 Delineamento experimental

O fluxograma esquemático do delineamento experimental do estudo pode ser observado na Figura 2. Os ratos foram divididos aleatoriamente em três grupos experimentais (n=10/grupo): Controle, LEV100 e LEV300. A randomização dos animais para distribuição dos grupos foi realizada utilizando o método de sorteio. O tratamento com LEV (solução de xarope de 100 mg/mL, Keppra®, UCB Biopharma Ltda, Limay, França) ocorreu por 21 dias consecutivos (DHANDE; GONARKAR; SANGHAVI; PANDIT, 2015; ERBAS; YILMAZ; TASKIRAN, 2016; LOSCHER; HONACK, 2000) e a administração foi por gavagem via intragástrica na forma de xarope nas doses de 100 mg/kg e 300 mg/kg, que equivale aproximadamente à dose terapêutica inicial e a dose máxima diária em humanos (Keppra, 2016), respectivamente, com base na fórmula para dose translacional baseada na superfície de área corpórea (mg/m^2) (REAGAN-SHAW; NIHAL; AHMAD, 2008). Essas doses também foram selecionadas com base nos resultados obtidos em diferentes estudos de toxicidade (MARGINEANU; MATAGNE; KAMINSKI; KLITGAARD, 2008; SARANGI; PATTNAIK; KATYAL; KALEEKAL et al., 2020; ZWIERZYNSKA;

PIETRZAK, 2022). O grupo controle recebeu solução salina a 0,9 % (m/v) por gavagem intragástrica no mesmo volume equivalente a dose máxima (JIA; LIU; LUAN; LI et al., 2011). O tamanho amostral foi calculado usando OpenEpi (www.openepi.com/Menu/OE_Menu.html) e foi realizado antes do estudo usando a atividade da amilase salivar obtida em um estudo piloto. De acordo com o cálculo do poder, a inclusão de 7 animais por grupo seria suficiente para detectar uma diferença estatisticamente significativa de 120.000 U/g de proteína total na atividade da amilase salivar entre os grupos controle e LEV300, com poder de 80% em nível de significância de 5%. Considerando possíveis mortes de animais durante a anestesia e coleta de saliva, foram acrescentados mais três animais a cada grupo, resultando em 10 ratos por grupo, totalizando 30 animais.

Figura 2. Fluxograma esquemático do estudo



Fonte: Elaborado pelo Autor (2023)

3.3 Coleta da saliva, fluxo, pH e capacidade tamponante salivar

Todos os animais, em estado de jejum, foram anestesiados com cloridrato de xilazina (10 mg/kg, IM) e cloridrato de cetamina (75 mg/kg, IM). Após anestesia, o fluxo salivar foi estimulado com nitrato de pilocarpina (5 mg/kg de mc, IP, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA). Os animais foram colocados em uma prancha inclinada, e a saliva coletada em frascos previamente pesados e mantidos em gelo por 10 minutos, contados desde a primeira gota de saliva. O volume de saliva foi calculado pela diferença de peso entre o frasco cheio e vazio, considerando a densidade da saliva como 1 g/mL (CYPRIANO; DOS SANTOS RAMOS; DE OLIVEIRA; DOS SANTOS et al., 2021). O fluxo salivar foi expresso em mL de saliva por minuto por 100

g de massa corpórea. A saliva foi fracionada e armazenada (-80 °C) até o dia da análise laboratorial (1-2 semanas). O pH e a capacidade tamponante foram avaliados imediatamente após a coleta. O pH salivar foi medido em amostras de saliva com eletrodo específico (Analyzer, São Paulo, SP, Brasil) conectado a um pHmetro (Thermo Fischer, Orion 720A, MA, EUA), previamente calibrado. A capacidade tamponante foi calculada pelo método titulométrico, de acordo com o volume de ácido láctico (0,1 mol/L) utilizado para reduzir o pH salivar para 4,0 e foi expresso em mL de ácido láctico (DOS SANTOS; FIAIS; DE OLIVEIRA PASSOS; DOS SANTOS et al., 2022).

3.4 Coleta e armazenamento de amostras de tecido e plasma

Posteriormente, os animais foram submetidos à eutanásia por exsanguinação por punção cardíaca, sempre pela manhã (9h às 11h) para minimizar os efeitos do ritmo circadiano. Na sequência, as glândulas salivares foram removidas, limpas e pesadas. As glândulas salivares do lado direito foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C para análises do estado redox, enquanto as glândulas do lado esquerdo foram processadas histologicamente para análise histomorfométrica. Amostras de sangue foram coletadas durante a punção cardíaca e o plasma foi obtido após centrifugação por 10 minutos a 4 °C e armazenado a -80 °C.

3.5 Parâmetros bioquímicos

Todos os reagentes dos ensaios bioquímicos foram obtidos da Sigma-Aldrich (Alemanha/EUA) e da Bioclin (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil). Um espectrofotômetro UV-Vis (U-2000, Hitachi, Japão) e um espectrofotômetro leitor de microplacas foram utilizados para medir a absorvância (PowerWave 340, BioTek, EUA). Nenhuma mortalidade relacionada ao tratamento foi observada nos ratos; portanto, todas as análises bioquímicas da saliva e do homogeneizado das glândulas salivares foram baseadas em um tamanho de amostra final de 10 ratos por grupo. Todas as medidas foram realizadas em duplicata técnica e padronizadas pelo teor de proteína total. As comparações das quantidades de analitos bioquímicos presentes na saliva e nos homogeneizados de tecidos foram possíveis pela normalização da proteína total.

3.5.1 Análise das atividades de aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase

Para avaliar possíveis danos hepáticos causados pelo LEV, as atividades plasmáticas das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) foram determinadas utilizando kits comerciais (Bioclin, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil) baseados no método cinético ultravioleta contínuo realizado em espectrofotômetro (Bio-Plus® Analisador Bioquímico; Bioplus Produtos para Laboratórios Ltda.; Barueri-SP, Brasil). Os valores foram expressos em U/L.

3.5.2 Análises bioquímicas salivares

A concentração de proteína total foi determinada usando o método de Hartree-Lowry (HARTREE, 1972), usando albumina de soro bovino como padrão. A atividade da amilase foi determinada pela reação de coloração amido-iodo conforme descrito anteriormente (NAGY; BARTA; VARGA; ZELLES, 2001) utilizando um kit comercial (Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brasil). A mistura de reação contendo sobrenadante de uma amostra e 0,04% (p/v) de amido solúvel como substrato em tampão fosfato 0,2 mol/L a pH 7,0 foi incubada durante 7,5 min a 37°C. A reação foi interrompida com a adição de uma solução contendo iodo/iodeto de potássio e ácido clorídrico. As amostras e as absorvâncias do branco foram lidas a 660 nm. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 10 mg de amido em 30 min de reação nas condições de ensaio descritas. As atividades da amilase foram avaliadas e normalizadas pela quantidade total de proteína.

Kits colorimétricos comerciais foram usados para quantificar cálcio, fósforo e cloreto (Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brasil) seguindo as recomendações dos fabricantes para cada teste. O sódio e o potássio foram determinados por analisador de eletrólitos íon seletivo (9180, Electrolyte Analyzer, Roche®). Os valores de eletrólitos foram expressos em mmol/L.

3.6 Processamento histológico e análise histomorfométrica

As glândulas salivares ressecadas foram fixadas com solução de Bouin por 24 horas, desidratadas em etanol, clarificadas em xilol e incluídas em parafina. Para avaliar a morfologia das glândulas salivares, cortes de cinco micrômetros foram

corados com hematoxilina e eosina. Um histologista certificado, calibrado e cego para os tratamentos, realizou a análise histomorfométrica. As imagens foram capturadas por uma câmera digital (Olympus, XC50, Tóquio, Japão) acoplada a um microscópio de luz (Olympus, BX53, Tóquio, Japão) com ampliação original de 400x e salvas em computador. Seis fotomicrografias de dois cortes histológicos de cada glândula foram obtidas. A área total das glândulas salivares foi medida (μm^2) com o software Image J, (ImageJ, National Institutes of Health, EUA, versão 1.50i) utilizando a ferramenta “mãos livres” para delimitar as áreas ocupadas por estruturas parenquimatosas (ductos e ácinos). A área do tecido conjuntivo foi considerada como a área total da imagem menos a área do parênquima. A área total da imagem foi quantificada em 100% e após a média da área das seis imagens, os valores resultantes foram submetidos a uma regra de três para calcular a porcentagem de cada estrutura analisada. Esta análise foi realizada com cinco animais por grupo (DOS SANTOS; FIAIS; DE OLIVEIRA PASSOS; DOS SANTOS et al., 2022).

3.7 Análises bioquímicas das glândulas salivares

3.7.1 Preparação do homogenato das glândulas salivares

No dia da análise bioquímica, as glândulas salivares foram descongeladas em gelo e lavadas em solução salina gelada (NaCl 0,9%, m/v). O homogeneizador Potter-Elvehjem (modelo MA 099; Marconi, Piracicaba, SP, Brasil) foi usado para preparar os homogenatos das glândulas a 5% em tampão fosfato de sódio 50 mmol/L (pH 7,4) contendo 0,2% (v/v) de Triton X-100, ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA) 10 mmol/L e fluoreto de fenilmetanossulfonil (PMSF) 2 mmol/L. Os homogenatos foram centrifugados a 10.000 rpm por 10 min a 4 °C usando uma centrífuga Eppendorf R 5810 (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). O sobrenadante foi coletado, fracionado e armazenado a 80 °C por menos de 2 semanas para posterior análise de proteína total, capacidade oxidante total, dano oxidativo lipídico e proteico, capacidade antioxidante total, ácido úrico, SOD, CAT e GPx. Os sobrenadantes para serem usados para determinação da GSH foram preparados em 5% (m/v) de ácido tricloroacético (TCA) contendo 2 mmol/L de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), centrifugado a 4000 rpm por 10 min a 4 °C.

3.7.2 Determinação do dano oxidativo

A capacidade oxidativa total foi avaliada de acordo com o método Erel (EREL, 2005). O método é baseado nos oxidantes presentes na amostra que oxidam o complexo íon ferroso-o-dianisidina em íon férrico. O íon férrico produz um complexo colorido com laranja xilenol em meio ácido. A intensidade da cor foi medida espectrofotometricamente a 560 nm. O ensaio foi calibrado com peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e os resultados são expressos em termos de H_2O_2 micromolar por grama de proteína. A peroxidação lipídica foi avaliada por meio da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (BUEGE; AUST, 1978). A quantidade de aldeídos formados foi calculada pelo coeficiente de extinção molar ($\epsilon_{532} = 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A concentração de proteína carbonilada foi quantificada usando o método alcalino 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) (MESQUITA; OLIVEIRA; BENTO; GERALDO et al., 2014). O conteúdo de carbonil foi calculado, usando o coeficiente de extinção molar ($\epsilon_{450} = 22.308 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

3.7.3 Efeitos do LEV na defesa antioxidante tecidual não enzimática

3.7.3.1 Capacidade antioxidante total não enzimática

A capacidade antioxidante total foi determinada espectrofotometricamente por meio do método de redução do ferro, conforme descrito anteriormente por Benzie e Strain (BENZIE; STRAIN, 1996). Os resultados foram calculados utilizando uma curva padrão com diferentes concentrações de soluções de FeSO_4 .

3.7.3.2 Determinação da concentração de ácido úrico

A concentração de ácido úrico foi mensurada com um kit comercial (Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brasil). A uricase foi usada no ensaio para transformar o ácido úrico em alantoína e H_2O_2 (TRIVEDI; REBAR; BERTA; STONG, 1978).

3.7.3.3 Determinação da concentração de GSH

A concentração de GSH foi medida usando 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoato) (DTNB) de acordo com o método espectrofotométrico descrito por Beutler (BEUTLER; DURON; KELLY, 1963). A quantidade de GSH foi determinada pelo coeficiente de extinção molar de GSH ($1,36 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Os níveis de GSH foram expressos por grama de proteína total.

3.7.4 Efeitos do LEV na defesa antioxidante tecidual enzimática

3.7.4.1 Determinação da atividade da SOD

A atividade da SOD foi determinada espectrofotometricamente (420 nm) mensurando a taxa de inibição da autooxidação do pirogalol em 50 mmol/L de tampão Tris-HCl (pH 8,2), contendo 1 mmol/L de DTPA. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir a taxa de autooxidação do pirogalol em 50% (MARKLUND; MARKLUND, 1974).

3.7.4.2 Determinação da atividade da CAT

A atividade da CAT foi determinada espectrofotometricamente (240 nm) medindo a taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio em tampão fosfato de potássio 50 mmol/L (pH 7,0) (AEBI, 1984). As unidades da atividade da enzima foram determinadas usando o coeficiente de extinção molar de H_2O_2 ($\epsilon_{240} = 0,0394 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Uma unidade de atividade da CAT foi definida como a quantidade de enzima necessária para decompor 1 mmol de H_2O_2 por 1 minuto.

3.7.4.3 Determinação da atividade da GPx

A atividade da GPx foi determinada pelo método que utiliza o peróxido de di-terc-butila como substrato da reação, ocorrendo oxidação da GSH pela GPx gerando glutathiona oxidada (GSSG), que é convertido em GSH pela glutathiona redutase (GR), consumindo nessa reação uma molécula de NADPH (WENDEL, 1981). A atividade da enzima foi determinada espectrofotometricamente monitorando o consumo de NADPH a 340 nm em meio contendo 50 mmol/L de tampão fosfato de sódio (pH 7,5), 1 mmol/L de EDTA, 0,1 mmol/L de NADPH, 0,4 mmol/L de azida de sódio, 0,1 U/mL de GR, 1 mmol/L de GSH, 0,5 mmol/L de peróxido de terc-butila e amostras. A azida de sódio foi usada para bloquear a atividade da catalase. Uma unidade da atividade da GPx foi definida como 1 mmol de NADPH consumido por minuto, usando o coeficiente de extinção molar ($\epsilon_{340} = 6,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

3.9 Análise estatística

Todos os dados foram analisados em duplicata, expressos como média \pm desvio padrão, e analisados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. A análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida pelo teste post hoc de Tukey

também foi utilizada para significância estatística. Para todas as análises, os valores de probabilidade $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. As análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc.; La Jolla, CA, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 Atividade plasmática da ALT e AST, massa corpórea, ingestão de ração e água, peso e index das glândulas salivares

Ao final do período experimental, LEV300 foi hepatotóxica devido ao aumento das atividades das transaminases em relação aos grupos Controle (ALT, $p < 0,01$; AST, $p < 0,05$) e LEV100 (ALT, $p < 0,01$; AST, $p < 0,01$) (Tabela 1). Apesar da hepatotoxicidade, não encontramos alterações significativas na massa corpórea final, ingestão de ração, ingestão de água, o peso e o índice das glândulas salivares foram entre os grupos (Tabela 1).

Tabela 1. Efeitos do LEV nas transaminases, peso corporal, consumo de ração e água, massa e index das glândulas salivares

Parâmetros	Controle	LEV100	LEV300
Atividade da ALT (U/L)	76,48 ± 7,26	76,48 ± 8,06	88,82 ± 7,92**##
Atividade da AST (U/L)	156,6 ± 13,82	152,9 ± 23,24	203,1 ± 53,03**##
Massa corpórea inicial (g)	210,2 ± 9,81	205,5 ± 7,98	214,6 ± 14,33
Massa corpórea final (g)	372,4 ± 13,98	382,0 ± 17,74	372,8 ± 31,82
Ingestão de ração (g/semana/grupo)	751,6 ± 97,24	832,4 ± 98,05	741,3 ± 27,67
Ingestão de água (L/semana/grupo)	1,56 ± 0,17	1,71 ± 0,30	1,59 ± 0,32
Massa parótida (mg)	290,8 ± 29,02	300,4 ± 31,80	304,3 ± 21,78
Massa submandibular (mg)	239,1 ± 12,08	261,5 ± 21,97	260,2 ± 26,96
Index parótida	0,825 ± 0,07	0,768 ± 0,04	0,830 ± 0,08
Index submandibular	0,664 ± 0,04	0,695 ± 0,06	0,692 ± 0,04

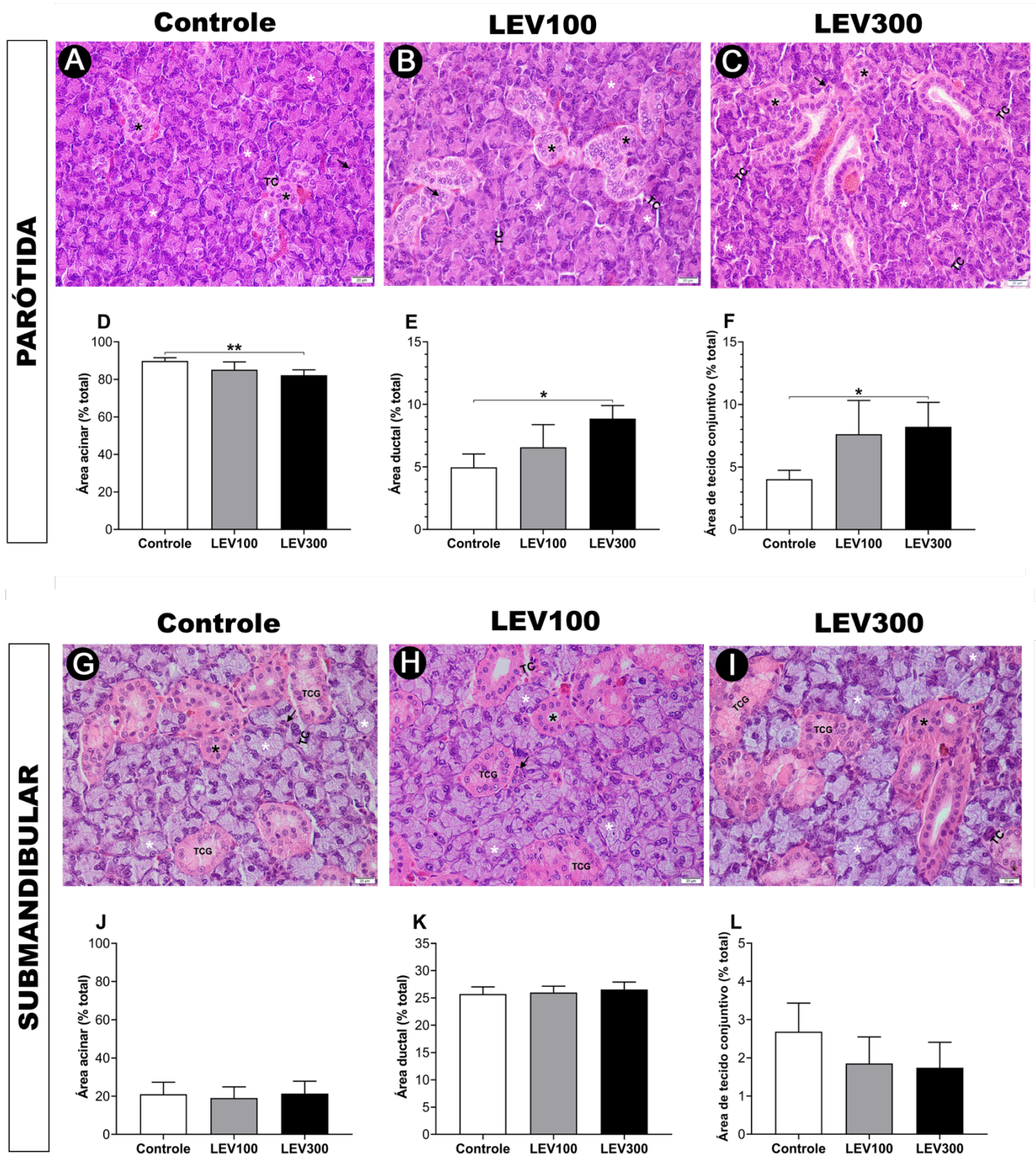
Fonte: Elaborado pelo Autor (2023)

Os dados foram expressos como média ± desvio padrão, n = 10 ratos/grupo. Os resultados foram analisados por ANOVA one-way seguido do pós-teste de Tukey. Para todas as análises (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ versus grupo controle; ## $p < 0,01$ versus LEV100).

4.2 Efeitos do tratamento com LEV nos parâmetros histomorfométricos das glândulas salivares

As análises histomorfométricas das micrografias não evidenciaram diferenças significativas nas estruturas das glândulas parótidas entre os grupos Controle (Figura 3A) e LEV100 (Figura 3B). Por outro lado, LEV300 (Figura 3C) provocou alterações morfológicas na glândula parótida, ao diminuir a área de ácinos ($p < 0,01$) (Figura 3D), que foram compensados pelo aumento na área de tecido conjuntivo ($p < 0,5$; Figura 3F) e área de ductos ($p < 0,5$; Figura 3E) em relação ao grupo Controle. Por sua vez, não detectamos mudanças significantes nas áreas de ductos (Figura 3J), ácinos (Figura 3L), e tecido conjuntivo (Figura 3L) nas micrografias das glândulas submandibulares após o tratamento com ambas as doses (Figura 3G, H e I).

Figura 3. Efeitos do LEV nos parâmetros histomorfométricos das glândulas salivares



Fonte: Elaborado pelo Autor (2023)

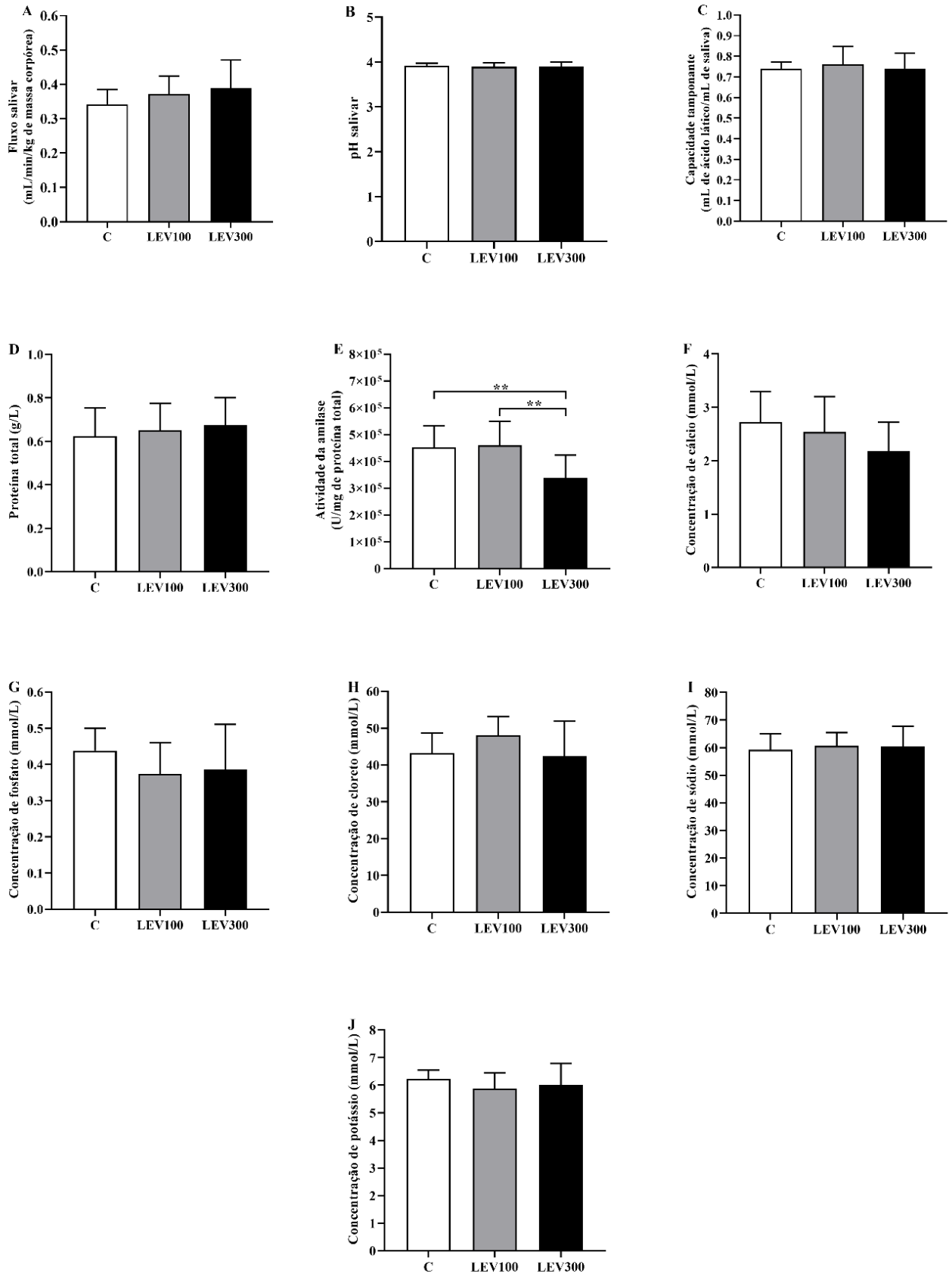
Efeitos do LEV nos parâmetros histomorfométricos das glândulas salivares. Fotomicrografias da glândula parótida (A, B e C) e da glândula submandibular (G, H e I) e análises histomorfométricas da área acinar (D e J), área do ducto (E e K) e tecido conjuntivo (F e L). Os resultados foram analisados por ANOVA unidirecional seguida de pós-teste de Tukey. Para todas as análises ($*p < 0,05$, $**p < 0,01$). Barra de escala 40 μ m. Abreviaturas: TC, tecido conjuntivo; TCG, túbulos convolutos granulares.

Símbolos: asterisco branco indica ácinos; asterisco preto indica ducto estriado; seta preta indica ducto intercalado.

4.3 Efeitos do tratamento com LEV nos parâmetros bioquímicos salivares

A taxa de fluxo salivar (Figura 4A), o pH (Figura 4B) e a capacidade tamponante (Figura 4C) foram similares entre o Controle e ambos os grupos tratados com LEV. Nenhuma diferença significativa na composição salivar foi observada entre os grupos com relação a proteína total (Figura 4D), cálcio (Figura 4F), fosfato (Figura 4G), cloreto (Figura 4H), sódio (Figura 4I), e potássio (Figura 4J). Na contramão desses resultados, a atividade da amilase salivar reduziu apenas nos animais tratados com LEV300 em comparação aos grupos Controle e LEV100 (Figura 4E, $p < 0,01$ para ambos).

Figura 4. Efeitos do LEV no fluxo salivar e parâmetros bioquímicos salivares



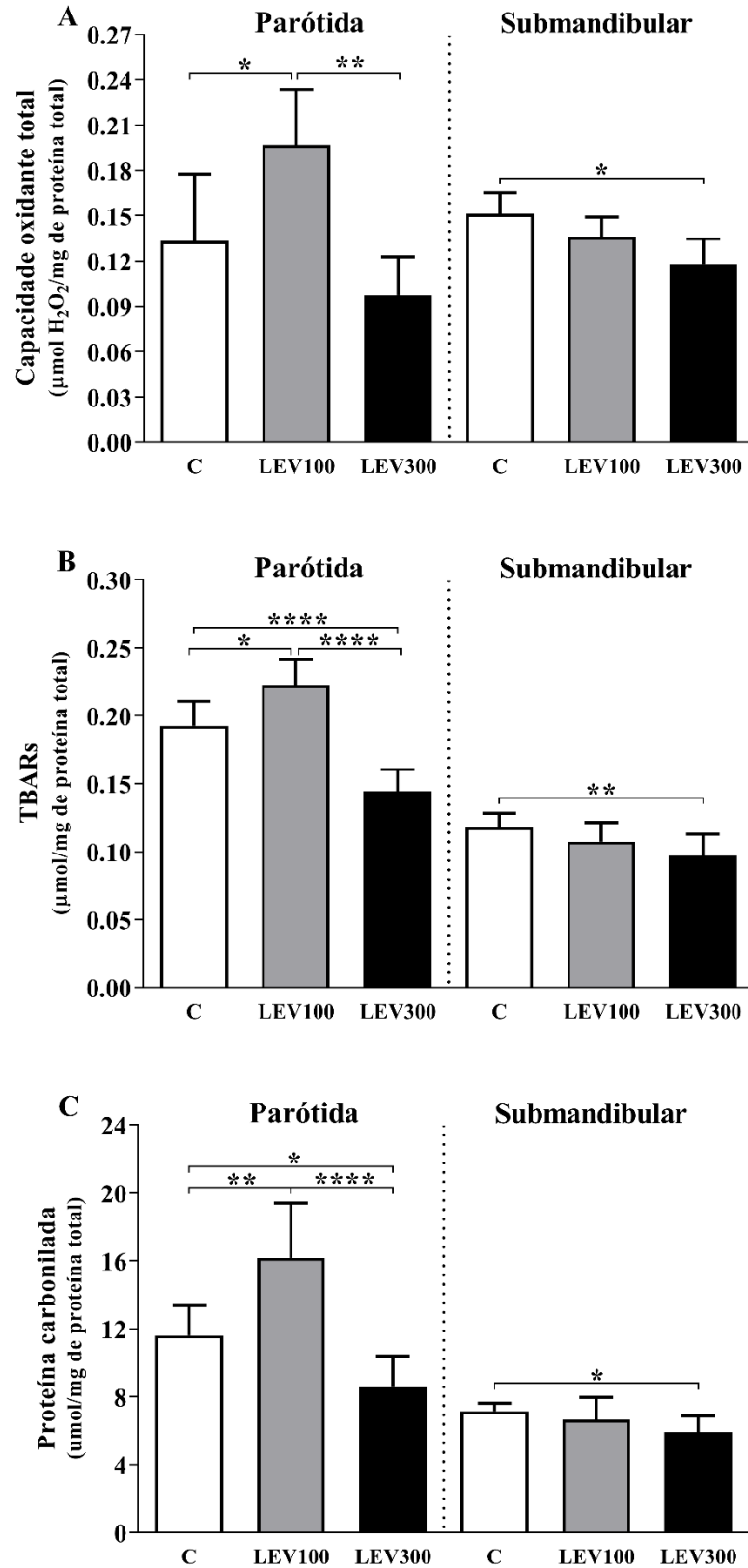
Fonte: Elaborado pelo Autor (2023)

Determinação do fluxo salivar (A), pH (B), capacidade tamponante (C), proteína total (D), atividade da amilase (E), cálcio (F), fosfato (G), cloreto (H), sódio (I) e potássio (J) de ratos Wistar tratados com LEV por 21 dias consecutivos. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão, $n = 10$ ratos/grupo. Os resultados foram analisados por ANOVA one-way seguido do pós-teste de Tukey. Para todas as análises (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

4.4 Efeitos do tratamento com LEV nos marcadores de dano oxidativo

Ao final de 21 dias, a capacidade oxidante total da glândula parótida foi maior no grupo LEV100 em comparação ao grupo Controle ($p < 0,05$) e grupo LEV300 ($p < 0,01$) (Figura 5A). Da mesma maneira, a peroxidação lipídica na glândula parótida foi maior no grupo LEV100 em relação ao Controle ($p < 0,01$) e LEV300 ($p < 0,0001$), enquanto LEV300 apresentou concentração inferior ao grupo Controle ($p < 0,0001$) (Figura 5B). De forma semelhante, a concentração de proteína carbonilada na glândula parótida foi maior no grupo LEV100 em relação ao Controle ($p < 0,01$) e LEV300 ($p < 0,0001$), enquanto LEV300 apresentou concentração inferior ao grupo Controle ($p < 0,05$) (Figura 5C). Por sua vez, na glândula submandibular, o grupo LEV300 diminuiu a capacidade oxidante total ($p < 0,05$) (Figura 5A), peroxidação lipídica ($p < 0,01$) (Fig. 5B) e o dano oxidativo proteico ($p < 0,05$) (Figura 5C) em relação ao grupo Controle.

Figura 5. Efeitos do tratamento com LEV na capacidade oxidante total, dano oxidativo lipídico e proteico nas glândulas salivares



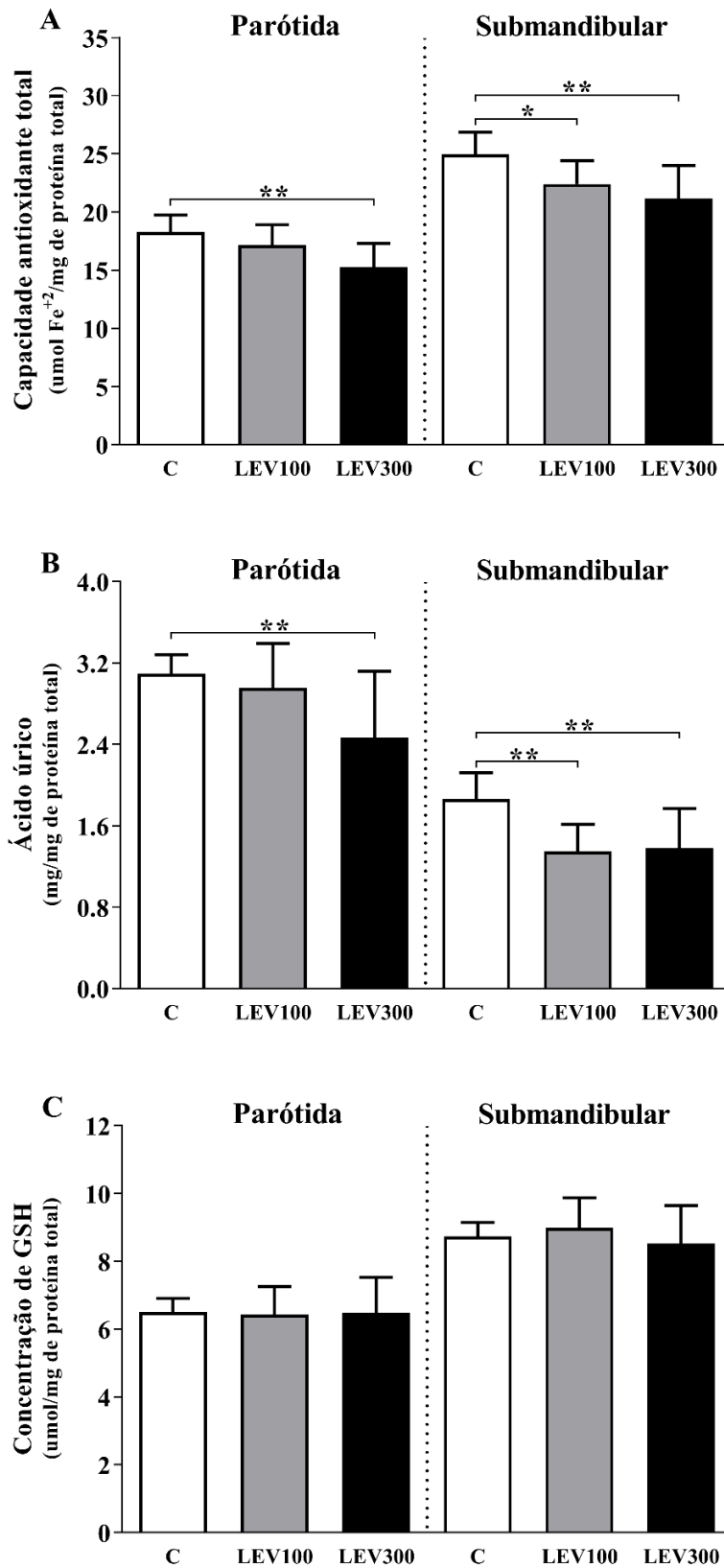
Fonte: Elaborado pelo Autor (2023)

Determinação da capacidade oxidante total (A), dano oxidativo lipídico (B) e dano oxidativo proteico (C) nas glândulas salivares de ratos Wistar tratados com LEV por 21 dias consecutivos. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão, $n = 10$ ratos/grupo. Os resultados foram analisados por ANOVA one-way seguido do pós-teste de Tukey. Para todas as análises ($*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$ e $****p < 0,0001$).

4.5 Efeitos do tratamento com LEV na defesa antioxidante não enzimática

Não encontramos nas glândulas parótidas diferenças significantes na concentração da capacidade antioxidante total (Figura 6A), ácido úrico (Figura 6B) e GSH (Figura 6C) entre os grupos LEV100 e Controle, enquanto LEV300 reduziu a capacidade antioxidante total (Figura 6A; $p < 0,01$) e de ácido úrico (Figura 6B; $p < 0,05$) em relação ao Controle. Ambas as doses de LEV diminuíram a capacidade antioxidante total (LEV100, $p < 0,05$; LEV300, $p < 0,01$; Figura 6A) e níveis de ácido úrico ($p < 0,01$ para ambas as doses; Figura 6B) na glândula submandibular em relação ao Controle. O tratamento com LEV não alterou as concentrações de GSH na glândula submandibular (Figura 6C).

Figura 6. Efeitos do LEV na defesa antioxidante não enzimática das glândulas salivares



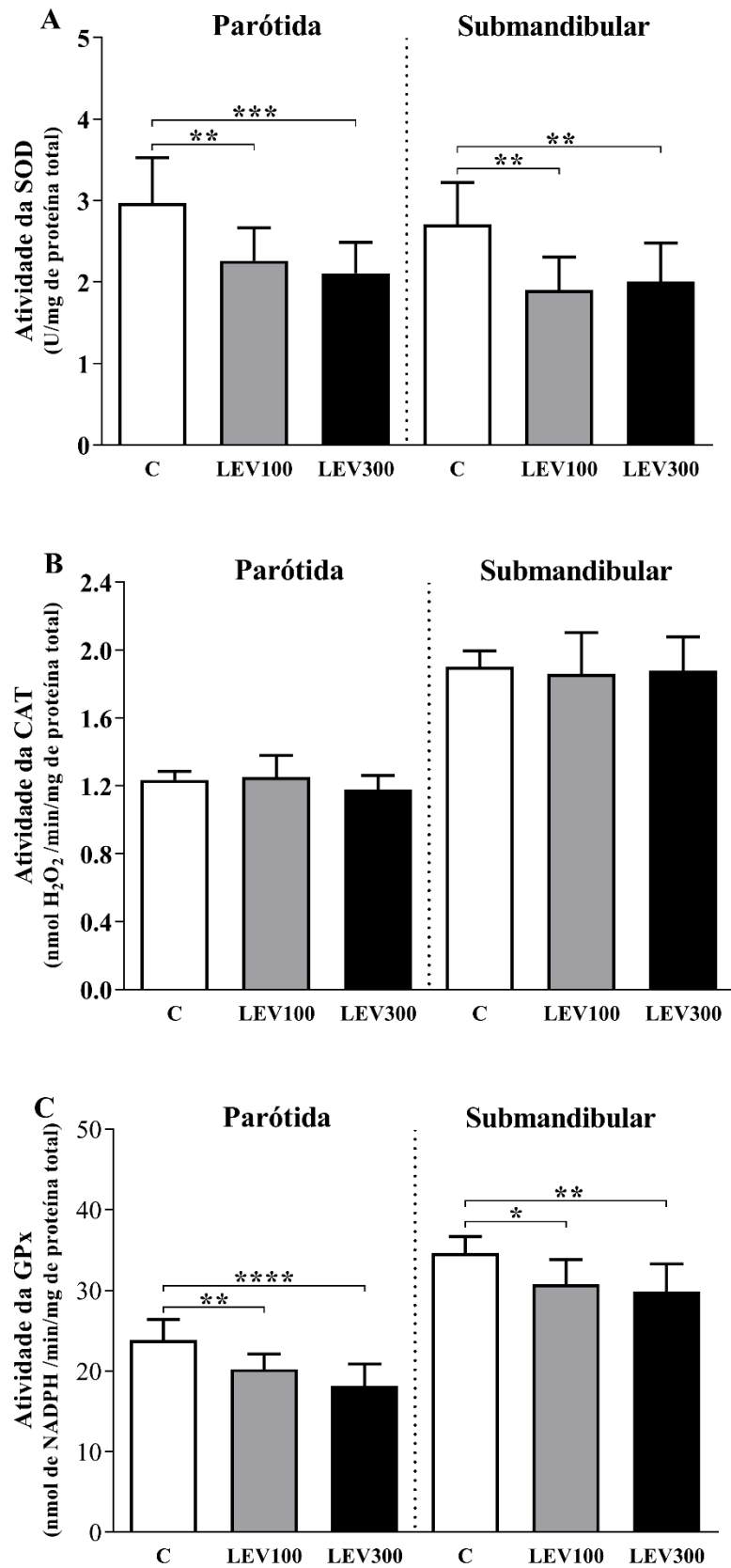
Fonte: Elaborado pelo Autor (2023)

Determinação da capacidade antioxidante total (A), ácido úrico (B) e GSH (C) nas glândulas salivares de ratos Wistar tratados com LEV por 21 dias consecutivos. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão, n = 10 ratos/grupo. Os resultados foram analisados por ANOVA one-way seguido do pós-teste de Tukey. Para todas as análises (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

4.6 Efeitos do tratamento com LEV na defesa antioxidante enzimática

As enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx, atuam como a primeira linha de defesa na neutralização e eliminação das espécies reativas de oxigênio. A SOD atua reduzindo o ânion superóxido a peróxido de hidrogênio, enquanto a CAT e GPx catalisa a redução do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. Ambas as doses de LEV diminuíram a atividade da SOD (LEV100 $p < 0,01$; LEV300 $p < 0,001$; Figura 7A) e GPx (LEV100 $p < 0,01$; LEV300 $p < 0,0001$; Figura 7C) após 21 dias de tratamento na glândula parótida. Por sua vez, na glândula submandibular os tratamentos com LEV também diminuíram a atividade da SOD (LEV100 $p < 0,01$; LEV300 $p < 0,001$; Figura 7A) e GPx ($p < 0,01$ para ambas as doses; Figura 7C). Apesar dos resultados acima, o tratamento com LEV não afetou a atividade da CAT em ambas as glândulas salivares (Figura 7B).

Figura 7. Efeitos do LEV na defesa antioxidante enzimática das glândulas salivares



Fonte: Elaborado pelo Autor (2023)

Determinação da atividade da SOD (A), CAT (B) e GPx (C) nas glândulas salivares de ratos Wistar tratados com LEV por 21 dias consecutivos. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão, n = 10 ratos/grupo. Os resultados foram analisados por ANOVA one-way seguido do pós-teste de Tukey. Para todas as análises (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

5 DISCUSSÃO

O presente estudo investigou os efeitos farmacológicos do LEV, um modular específico da proteína de vesícula sináptica 2A, nos parâmetros bioquímicos, funcionais e redox das glândulas parótidas e submandibulares de ratos Wistar machos após 21 dias de tratamento. Os principais achados do nosso estudo foram: 1. LEV300, que correspondente a dose máxima diária, aumentou os marcadores plasmáticos de hepatotoxicidade; 2. LEV não influenciou o peso e o índice das glândulas parótidas e submandibulares; 3. LEV não alterou a taxa de fluxo salivar, pH, capacidade tamponante e proteína total; 4. LEV300 reduziu a atividade da amilase salivar; 5. LEV não modificou a secreção de eletrólitos salivares; 6. LEV300 reduziu área de ácinos, enquanto aumentou ductos e tecido conjuntivo na glândula parótida; 7. LEV não influencia nas estruturas teciduais das glândulas submandibulares; 8. LEV100 aumentou a capacidade oxidante total, o dano oxidativo lipídico e proteico na glândula parótida; 9. LEV300 diminuiu a capacidade antioxidante total e o ácido úrico na parótida; LEV diminuiu a capacidade antioxidante total e o ácido úrico na glândula submandibular; 10. Ambas as doses de LEV reduziram a atividade enzimática da SOD e GPx nas glândulas parótida e submandibular.

O aumento da atividade plasmática de AST e ALT evidenciaram a hepatotoxicidade do LEV na dose máxima. Esses dados confirmam os resultados em modelo experimental que constataram o aumento dessas enzimas em ratos após o tratamento diário com LEV por três semanas na dose de 150 mg/kg por via oral (ABD-AL-HALEEM; ELDEEN-HUSSEIN; FAHMY; MAHMOUD-TAHA, 2019) e de ratas fêmeas que receberam LEV na dose de 36 mg/kg por via oral durante a prenhez (SABBAH; HANAFY; ARAFA, 2019). Portanto, embora o LEV seja considerado medicamento de escolha para pacientes com doença hepática por não interagir com o sistema citocromo P450 (VIDAURRE; GEDELA; YAROSZ, 2017), estudos com animais evidenciam a necessidade de cautela quanto ao risco de danos hepáticos, principalmente quando doses maiores forem usadas.

O peso do órgão e o peso corpóreo são parâmetros a serem considerados ao testar o efeito geral de drogas, uma vez que podem indicar efeitos tóxicos (ANDERSEN; LARSEN; SPLIID; CHRISTENSEN, 1999). Em nosso modelo experimental, a análise do peso corpóreo, do consumo de ração e água, além do peso e índice das glândulas salivares não podem ser considerados preditores dos efeitos

tóxicos do LEV, uma vez que tais parâmetros não diferiram entre os grupos, a despeito das alterações identificadas na saliva e glândulas salivares. Não há um consenso sobre o efeito do LEV no ganho de peso corpóreo em roedores devido as diferenças dos protocolos experimentais com relação as doses, vias de administração e tempo de tratamento, porém, nosso estudo corrobora com achados no qual o tratamento com LEV não exerce efeito nesse parâmetro (FEKETE; SIMKO; GRADOSOVA; MALAKOVA et al., 2013; KARESOVA; SIMKO; FEKETE; ZIMCIKOVA et al., 2018; OSUNTOKUN; BABATUNDE; OLAYIWOLA; ATERE et al., 2021). A literatura é escassa sobre o efeito do LEV no consumo de ração e água em roedores. Estudo com ratos tratados com LEV 50 mg/kg demonstrou menor consumo de ração após 21 dias de tratamento, contudo tal alteração não foi suficiente para alterar o ganho de peso corpóreo (OSUNTOKUN; BABATUNDE; OLAYIWOLA; ATERE et al., 2021). Os achados relacionados ao peso e o index das glândulas salivares também não podem ser considerados como indicativos dos efeitos tóxicos do LEV, tão logo esses parâmetros foram similares entre os grupos, em relação as alterações do estado redox e histológicas encontradas nessa pesquisa. Nossos dados suportam os achados no fígado (OSUNTOKUN; BABATUNDE; OLAYIWOLA; ATERE et al., 2021), testículos e epidídimo (BAYSAL; ILGIN; KILIC; KILIC et al., 2017; OSUNTOKUN; OLAYIWOLA; ATERE; ADEKOMI et al., 2020), onde os efeitos tóxicos do LEV ocorreram de forma inerente às alterações no peso dos órgãos.

As glândulas salivares são compostas por dois tipos principais de células: os ácinos, que sintetizam e secretam a saliva, e as células ductais, que modificam e transportam a saliva para a cavidade oral (PORCHERI; MITSIADIS, 2019). Estudos com roedores associaram as disfunções das glândulas salivares induzidas por medicamentos com as alterações morfológicas, como constatado após tratamento com ansiolíticos (RINALDI; JOHANN; ROCHA; IGNACIO et al., 2015), antidepressivos (DA SILVA; DE AZEVEDO; DE LIMA; IGNACIO et al., 2009) e corticoide (BIGHETTI; D ASSIS; VIEIRA; VIOLATO et al., 2014). Neste contexto, o anticonvulsivante LEV não influenciou na proporção das estruturas de ácinos e ductos das glândulas submandibulares, enquanto LEV300 reduziu a área de ácinos, que foi compensado pelo aumento da área de ductos e tecido conjuntivo na glândula parótida. Esse perfil de resultado, sugere que a suscetibilidade aos efeitos tóxicos do LEV varia de acordo com as glândulas salivares. Levando-se em conta que amilase é sintetizada predominantemente nas células acinares da glândula parótida (DE FELICE;

TOMBOLINI; MUSELLA; MARAMPON et al., 2017), a redução da área acinar dessa glândula coincide com a redução da atividade dessa enzima na saliva. Por sua vez, os demais parâmetros bioquímicos salivares permaneceram inalterados entre os grupos, o que provavelmente pode estar associado a manutenção da integridade das estruturas celulares da glândula submandibular. LEV também demonstrou efeitos teciduais deletérios em roedores por meio distorções na arquitetura tecidual de fígado e rins de ratas (SABBAH; HANAFY; ARAFA, 2019), aumento do corpo lúteo e folículo secundários no ovário (SVALHEIM; TAUBOLL; SURDOVA; ORMEL et al., 2008), injúrias testiculares associadas a degeneração testicular e prejuízo na espermatogênese (BAYSAL; ILGIN; KILIC; KILIC et al., 2017; OSUNTOKUN; BABATUNDE; OLAYIWOLA; ATERE et al., 2021). Em contrapartida, LEV afetou discretamente a estrutura e a biomecânica óssea em ratos (FEKETE; SIMKO; GRADOSOVA; MALAKOVA et al., 2013; KARESOVA; SIMKO; FEKETE; ZIMCIKOVA et al., 2018), o que nos sugere maior suscetibilidade dos tecidos moles aos efeitos tóxicos deste anticonvulsivante.

Para analisar os efeitos do LEV na secreção e composição salivar, nós conduzimos a coleta da saliva induzida pela pilocarpina, agonista colinérgico parasimpaticomimético que se liga aos receptores M1 e M3, principais receptores muscarínicos envolvidos na secreção de fluidos das glândulas salivares (AMBUDKAR, 2012; NARITA; QI; MURAKAMI; SUGIYA, 2019). Nossos achados demonstraram que o LEV não apresentou efeito anticolinérgico. A preservação dos valores de fluxo salivar, pH, capacidade tamponante e das concentrações de eletrólitos evidencia que o LEV não influencia nos mecanismos que levam a formação da saliva induzida pela pilocarpina. A saliva primária isotônica é formada pelo aumento do gradiente eletroquímico de cloreto, potássio e sódio no lúmen acinar, o qual direciona o transporte de água por osmose (CATALAN; KONDO; PENA-MUNZENMAYER; JARAMILLO et al., 2015; NARITA; QI; MURAKAMI; SUGIYA, 2019; TANIGUCHI; SUSU; KOGO; IIZUKA-KOGO et al., 2019) pelas via paracelular e através da aquaporina-5 localizada na membrana apical acinar (MATSUZAKI; SUSU; SHIMIZU; SAWAI et al., 2012; MATSUZAKI; SUZUKI; KOYAMA; TANAKA et al., 1999; SUSU; SAWAI; AOKI; IIZUKA-KOGO et al., 2013). Nesse mesmo contexto, LEV também não interferiu nos mecanismos de transportes dos sistemas de ductos, os quais modificam a saliva por meio da secreção de potássio e bicarbonato, e reabsorção sódio, cloreto e fosfato, tornando a saliva final secretada hipotônica (HOMANN; ROSIN-STEINER;

STRATMANN; ARNOLD et al., 2005; PATTERSON; CATALAN; MELVIN; YULE et al., 2012; ROUSSA, 2011).

O mediador colinérgico pilocarpina é caracterizado por induzir a secreção de proteínas e amilase pelas glândulas parótidas (DEHPOUR; GHAFOURIFAR; MASSOUDI; ABDOLLAHI et al., 1995; INANAGA; HABU; TANAKA; TANIGUCHI et al., 1988; SANDBORG; SIEGEL, 1990) e submandibulares (ABDOLLAHI; DEHPOUR; KAZEMIAN, 2000; BABA; TANIGUCHI; MOTOKAWA; ABE, 1994; OMORI; ASARI; MARUYAMA; KUSAMA et al., 2003) de roedores. A redução da atividade da amilase salivar no grupo LEV300 e a manutenção da concentração de proteína total, nos leva a sugerir que o anticonvulsivante causou um prejuízo parcial na sinalização colinérgica nas glândulas salivares. Os resultados da pesquisa não nos permitem discernir se a dose mais elevada de LEV prejudicou a síntese e/ou a secreção da amilase. Contudo, as análises histológicas nos levam a indicar que a redução dos ácinos nas glândulas parótidas seria o principal fator associado com a redução da amilase salivar. Além do mais, a redução da amilase salivar e manutenção da concentração de proteína total na saliva, poderia ser compensada pela manutenção da secreção das mucinas pelas glândulas submandibulares e sublinguais que também são estimuladas pela pilocarpina (BUSCH; BORDA, 2007; DENNY; DENNY; YIM, 1987). A redução da atividade da amilase pode ser considerada um fator que contribui para o desequilíbrio da homeostase bucal, predispondo a cárie e doença periodontal (SAMARANAYAKE; MATSUBARA, 2017), tão logo é bem caracterizada suas importantes funções na imunidade da mucosa bucal (GRIGOLEIT; KULLMANN; OBERBECK; SCHEDLOWSKI et al., 2013) e antibiofilme (KALPANA; AARTHY; PANDIAN, 2012).

As glândulas salivares são inervadas pelo sistema nervoso autonômico responsável por controlar a secreção salivar. O núcleo salivar superior localizado na ponte do tronco encefálico é responsável pelas fibras parassimpáticas que inervam as glândulas submandibulares e sublinguais, enquanto os neurônios parassimpáticos que inervam as glândulas parótidas partem do núcleo salivar inferior localizado na medula do tronco encefálico (FERREIRA; HOFFMAN, 2013). Por sua vez, os centros salivares simpáticos primários responsáveis pela inervação simpática das três glândulas salivares maiores estão localizados nos segmentos torácicos superiores da medula espinhal (FERREIRA; HOFFMAN, 2013). Evidências genéricas demonstraram por meio de diferentes experimentos que as regiões do sistema nervoso central envolvidas no controle da salivação como o cérebro (BAJJALIEH;

FRANTZ; WEIMANN; MCCONNELL et al., 1994; CREVECOEUR; FOERCH; DOUPAGNE; THIELEN et al., 2013; FUKS; GILLARD; MICHEL; LYNCH et al., 2003), medula espinhal (LAMBENG; GILLARD; VERTONGEN; FUKS et al., 2005) e tronco cerebral (CREVECOEUR; FOERCH; DOUPAGNE; THIELEN et al., 2013; HASSEL; TAUBOLL; SHAW; GJERSTAD et al., 2010) apresentam a expressão da glicoproteína SV2A, o principal alvo do LEV. Esse fato poderia justificar pelo menos em parte os resultados encontrados em nosso estudo, todavia não podemos descartar os efeitos tóxicos periféricos do LEV, uma vez que são captados e secretados pelas glândulas salivares (PATRICK; PARMITER; MAHMOUD, 2021; PATSALOS; BERRY, 2013).

O volume e a composição da saliva secretada pelas glândulas salivares dependem da frequência, intensidade e integração de estímulos nervosos mediados pelos sistemas simpático e parassimpático (PROCTOR; SHAALAN, 2021). Nossos parâmetros experimentais representam os efeitos do LEV sobre o perfil farmacológico da pilocarpina, um agonista muscarínico que, ao se ligar aos receptores M1 e M3 expressos nos três pares de glândulas salivares de ratos (RYBERG; WARFVINGE; AXELSSON; SOUKUP et al., 2008), provoca uma abundante secreção de fluido salivar e um aumento concomitante na secreção de proteínas (OMORI; ASARI; MARUYAMA; KUSAMA et al., 2003) e eletrólitos (IZUTSU; JOHNSON, 1986; IZUTSU; JOHNSON; GODDARD, 1987). Por sua vez, os receptores adrenérgicos alfa e beta expressos e funcionais nas glândulas salivares de ratos (HUMPHREYS-BEHER; SCHNEYER, 1986; NISHIURA; GAO; NAN; ABE, 2001) também desempenham um papel importante na secreção das glândulas salivares de ratos. Em particular, o uso de agonistas adrenérgicos demonstrou que a estimulação desses receptores induz a síntese e secreção de proteínas (ABE; DAWES, 1980; PROCTOR; GARRETT; CARPENTER; EBERSOLE, 2003) assim como um aumento no cálcio salivar (YU; SCHNEYER, 1984). Portanto, seria interessante para futuras pesquisas determinar se os efeitos do LEV sobre a função das glândulas salivares ocorrem de maneira semelhante após estimulação adrenérgica.

O desequilíbrio do estado redox pode participar como parte dos mecanismos responsáveis pelo prejuízo da função secretória das glândulas salivares sob diferentes condições patológicas e toxicológicas. Embora existam contradições entre a relação do LEV e os sistemas antioxidantes e oxidantes, é conhecido o efeito pró-oxidante do LEV devido ao aumento do dano oxidativo lipídico no plasma (HAZNEDAR; DOGAN; ALBAYRAK; OZ TUNCER et al., 2019), testículos (BAYSAL;

ILGIN; KILIC; KILIC et al., 2017) e cérebro (SARANGI; KAKKAR; KUMAR; GUPTA, 2016). Essa propriedade do LEV pode estar associada a sua habilidade em aumentar a geração de espécies reativas de oxigênio (PAVONE; CARDILE, 2003). Neste contexto, nós analisamos a influência do LEV na concentração dos marcadores do dano oxidativo. No caso do LEV100, o conjunto dos resultados sugere que a elevação dos níveis da capacidade oxidante total e o concomitante aumento da peroxidação lipídica e a carbonilação de proteínas nas glândulas parótidas pode ser o reflexo de uma resposta tardia decorrente da dose terapêutica mínima diária, tendo-se em vista que não constatamos mudanças na função e estrutura das glândulas salivares após os 21 dias de tratamento. Surpreendentemente, a despeito da redução da atividade da amilase salivar e da área de ácinos nas glândulas parótidas, o dano oxidativo lipídico e proteico foram inferiores no grupo LEV300. Nossos achados divergem de outros modelos experimentais no qual a redução da atividade da amilase salivar foi correlacionada com o aumento do dano oxidativo nas glândulas salivares em condições como quimioterapia (BACHMEIER; MIGUELES GOITEA; LINARES; WIETZ et al., 2021), diabetes (CHEN; WANG; ZHANG; YANG, 2020), orquiectomia (DOS SANTOS; FIAIS; DE OLIVEIRA PASSOS; DOS SANTOS et al., 2022) e dieta com alto teor de sacarose (MACIEJCZYK; MATCZUK; ZENDZIAN-PIOTROWSKA; NIKLINSKA et al., 2018). No entanto, nós entendemos que a dose máxima diária de LEV exigiu uma resposta adaptativa precoce ao estresse oxidativo das glândulas salivares, o qual foi capaz de amenizar o dano oxidativo, especialmente na glândula submandibular, resultante da diminuição dos níveis da capacidade oxidante total e consequente atenuação do dano oxidativo e proteico, contudo, não o suficiente para restaurar a amilase e a estrutura da glândula parótida neste grupo. Esse resultado deve ser analisado com cautela, uma vez que o tratamento a longo prazo com LEV pode predispor ao risco do aumento transitório dos níveis de espécies reativas de oxigênios, que podem gerar danos acumulativos nas macromoléculas culminando em disfunções das glândulas salivares mais severas.

Estudos correlacionam o aumento do dano oxidativo resultante do desequilíbrio redox com a diminuição da defesa antioxidante não-enzimáticas das glândulas salivares (DOS SANTOS; FIAIS; OLIVEIRA; RIBAS et al., 2022; FERREIRA; ARAGAO; BITTENCOURT; FERNANDES et al., 2021). Nossos resultados mostraram que o tratamento com LEV prejudicou a defesa antioxidante não enzimática de ambas as glândulas salivares. As duas doses de LEV diminuíram

concomitantemente a capacidade antioxidante total e os níveis de ácido úrico na submandibular, enquanto que apenas a dose máxima diária reduziu a defesa antioxidante total e os níveis de ácido úrico na parótida. A redução da capacidade antioxidante total também é observada no soro de pacientes sob o tratamento com LEV (MAHDAVI; NAEINI; NAJAFI; MARACY et al., 2020; VAROGLU; YILDIRIM; AYGUL; GUNDOGDU et al., 2010) e com outros anticonvulsivantes (FICHSEL; FICHSEL; LIAPPIS, 1993; MAHLE; DASGUPTA, 1997; TUTANC; ARAS; DOKUYUCU; ALTAS et al., 2015). Contudo, a concentração de GSH, um antioxidante não enzimático endógeno, que atua como um eliminador de radicais livres e agente desintoxicante nas células (BANSAL; SIMON, 2018), não apresentou diferenças em ambos os grupos tratados. Portanto, o prejuízo da defesa antioxidante não enzimática nas glândulas salivares coincide com aumento do dano oxidativo e o decréscimo da atividade enzimática de SOD e GPx, sugerindo um aumento moderado na produção de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio provocado pelo tratamento com LEV.

As enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx, atuam como a primeira linha de defesa na neutralização e eliminação das espécies reativas de oxigênio (PISOSCHI; POP, 2015), no entanto, sob a situação de estresse oxidativo, no qual os níveis de espécies reativas de oxigênio excedem a capacidade do sistema de defesa antioxidante, as atividades dessas enzimas são alteradas (SCHIEBER; CHANDEL, 2014), acarretando em danos aos ácidos nucleicos, proteínas e lipídios (CHEN; XING; LI; ZHANG et al., 2021). A administração do LEV prejudicou a atividade enzimática da SOD em ambas as glândulas salivares. Do mesmo modo, o tratamento com LEV reduziu a atividade da SOD no cérebro (SARANGI; KAKKAR; KUMAR; GUPTA, 2016) e fígado (OSUNTOKUN; BABATUNDE; OLAYIWOLA; ATERE et al., 2021) em ratos. Enquanto a CAT e GPx são responsáveis pela neutralização do peróxido de hidrogênio, o tratamento não prejudicou a atividade da CAT nas glândulas salivares, apenas a atividade enzimática da GPx, o que poderia ser explicado pelo fato do peróxido de hidrogênio ser degradado principalmente pela GPx em situações no qual o estresse oxidativo é leve ou moderado (MICHIELS; RAES; TOUSSAINT; REMACLE, 1994). Nossos resultados demonstraram que ambas as doses de LEV diminuíram a atividade da GPx tanto na glândula parótida como na submandibular. Desta forma, esses achados indicam que o desequilíbrio redox decorrente da diminuição da defesa antioxidante enzimática após o tratamento com LEV pode estar associado a alterações morfológicas na glândula parótida, diminuição da defesa

antioxidante não enzimática em ambas as glândulas salivares e redução da atividade da amilase salivar.

6 CONCLUSÃO

Portanto, o presente estudo indica que o tratamento com LEV representa um agente potencialmente tóxico, contribuindo para a disfunção das glândulas salivares induzida por medicamentos. De acordo com os resultados do estudo, sugere-se que o mecanismo de toxicidade do LEV está associado ao desequilíbrio do estado redox por meio do comprometimento do sistema de defesa antioxidante enzimático e não enzimático das glândulas parótidas e submandibulares.

REFERÊNCIAS

ABD-AL-HALEEM, E. N.; ELDEEN-HUSSEIN, S. S.; FAHMY, H. A.; MAHMOUD-TAHA, R. A. Effect of gamma radiation on combination therapy of certain antiepileptic drugs in rats. **Pak J Pharm Sci**, 32, n. 4, p. 1589-1597, Jul 2019.

ABDOLLAHI, M.; DEHPOUR, A.; KAZEMIAN, P. Alteration by cadmium of rat submandibular gland secretory function and the role of the l-arginine/nitric oxide pathway. **Pharmacol Res**, 42, n. 6, p. 591-597, Dec 2000.

ABE, K.; DAWES, C. The secretion of protein and of some electrolytes in response to alpha- and beta- adrenergic agonists by rat parotid and submandibular salivary glands enlarged by chronic treatment with isoproterenol. **J Dent Res**, 59, n. 6, p. 1081-1089, Jun 1980.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**, 105, p. 121-126, 1984.

AMBUDKAR, I. S. Polarization of calcium signaling and fluid secretion in salivary gland cells. **Curr Med Chem**, 19, n. 34, p. 5774-5781, 2012.

ANDERSEN, H.; LARSEN, S.; SPLIID, H.; CHRISTENSEN, N. D. Multivariate statistical analysis of organ weights in toxicity studies. **Toxicology**, 136, n. 2-3, p. 67-77, Aug 31 1999.

AVEZOV, K.; REZNICK, A. Z.; AIZENBUD, D. Oxidative stress in the oral cavity: sources and pathological outcomes. **Respir Physiol Neurobiol**, 209, p. 91-94, Apr 2015.

BABA, A.; TANIGUCHI, K.; MOTOKAWA, W.; ABE, K. Fluid and protein secretion by the submandibular glands of weanling rats in response to various agonists. **Arch Oral Biol**, 39, n. 11, p. 979-984, Nov 1994.

BACHMEIER, E.; MIGUELES GOITEA, M. E.; LINARES, J. A.; WIETZ, F. M. *et al.* [Determination of some oxidative stress, functional and immunological markers in the saliva of patients undergoing bone marrow transplantation (BMT)]. **Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba**, 78, n. 4, p. 384-390, Dec 28 2021.

BAJJALIEH, S. M.; FRANTZ, G. D.; WEIMANN, J. M.; MCCONNELL, S. K. *et al.* Differential expression of synaptic vesicle protein 2 (SV2) isoforms. **J Neurosci**, 14, n. 9, p. 5223-5235, Sep 1994.

BANSAL, A.; SIMON, M. C. Glutathione metabolism in cancer progression and treatment resistance. **J Cell Biol**, 217, n. 7, p. 2291-2298, Jul 2 2018.

BAYSAL, M.; ILGIN, S.; KILIC, G.; KILIC, V. *et al.* Reproductive toxicity after levetiracetam administration in male rats: Evidence for role of hormonal status and oxidative stress. **PLoS One**, 12, n. 4, p. e0175990, 2017.

BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Anal Biochem**, 239, n. 1, p. 70-76, Jul 15 1996.

BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. **J Lab Clin Med**, 61, p. 882-888, May 1963.

BIGHETTI, B. B.; D ASSIS, G. F.; VIEIRA, D. C.; VIOLATO, N. M. *et al.* Long-term dexamethasone treatment alters the histomorphology of acinar cells in rat parotid and submandibular glands. **Int J Exp Pathol**, 95, n. 5, p. 351-363, Oct 2014.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymol**, 52, p. 302-310, 1978.

BUSCH, L.; BORDA, E. Signaling pathways involved in pilocarpine-induced mucin secretion in rat submandibular glands. **Life Sci**, 80, n. 9, p. 842-851, Feb 6 2007.

CATALAN, M. A.; KONDO, Y.; PENA-MUNZENMAYER, G.; JARAMILLO, Y. *et al.* A fluid secretion pathway unmasked by acinar-specific Tmem16A gene ablation in the adult mouse salivary gland. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 112, n. 7, p. 2263-2268, Feb 17 2015.

CHEN, S. Y.; WANG, Y.; ZHANG, C. L.; YANG, Z. M. Decreased basal and stimulated salivary parameters by histopathological lesions and secretory dysfunction of parotid and submandibular glands in rats with type 2 diabetes. **Exp Ther Med**, 19, n. 4, p. 2707-2719, Apr 2020.

CHEN, Z.; XING, T.; LI, J.; ZHANG, L. *et al.* Hydrogen peroxide-induced oxidative stress impairs redox status and damages aerobic metabolism of breast muscle in broilers. **Poult Sci**, 100, n. 2, p. 918-925, Feb 2021.

CHIAPPIN, S.; ANTONELLI, G.; GATTI, R.; DE PALO, E. F. Saliva specimen: a new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. **Clin Chim Acta**, 383, n. 1-2, p. 30-40, Aug 2007.

CONTRERAS-GARCIA, I. J.; CARDENAS-RODRIGUEZ, N.; ROMO-MANCILLAS, A.; BANDALA, C. *et al.* Levetiracetam Mechanisms of Action: From Molecules to Systems. **Pharmaceuticals (Basel)**, 15, n. 4, Apr 13 2022.

CREVECOEUR, J.; FOERCH, P.; DOUPAGNE, M.; THIELEN, C. *et al.* Expression of SV2 isoforms during rodent brain development. **BMC Neurosci**, 14, p. 87, Aug 9 2013.

CYPRIANO, M. L.; DOS SANTOS RAMOS, G. H. A.; DE OLIVEIRA, A. C. F.; DOS SANTOS, D. R. *et al.* Effect of testosterone replacement therapy and mate tea (*Ilex paraguariensis*) on biochemical, functional and redox parameters of saliva in orchietomized rats. **Arch Oral Biol**, 132, p. 105289, Dec 2021.

DA SILVA, S.; DE AZEVEDO, L. R.; DE LIMA, A. A.; IGNACIO, S. A. *et al.* Effects of fluoxetine and venlafaxine and pilocarpine on rat parotid glands. **Med Chem**, 5, n. 5, p. 483-490, Sep 2009.

DE FELICE, F.; TOMBOLINI, M.; MUSELLA, A.; MARAMPON, F. *et al.* Radiation therapy and serum salivary amylase in head and neck cancer. **Oncotarget**, 8, n. 52, p. 90496-90500, Oct 27 2017.

DEHPOUR, A. R.; GHAFOURIFAR, P.; MASSOUDI, S.; ABDOLLAHI, M. *et al.* On the relation of calcium channel blockers to rat parotid and submandibular glands function in vivo. **Gen Pharmacol**, 26, n. 3, p. 619-622, May 1995.

DENNY, P. C.; DENNY, P. A.; YIM, M. S. The effects of various secretagogues on the mucin content of pure submandibular salivas. **J Dent Res**, 66, n. 5, p. 1011-1015, May 1987.

DESHPANDE, L. S.; DELORENZO, R. J. Mechanisms of levetiracetam in the control of status epilepticus and epilepsy. **Front Neurol**, 5, p. 11, 2014.

DHANDE, P.; GONARKAR, S.; SANGHAVI, D.; PANDIT, V. Add-on Effect of Levetiracetam on Cognitive Activity of Carbamazepine and Topiramate Treated Healthy Rats. **J Clin Diagn Res**, 9, n. 6, p. FF01-04, Jun 2015.

DOS SANTOS, D. R.; FIAIS, G. A.; DE OLIVEIRA PASSOS, A.; DOS SANTOS, L. F. G. *et al.* Effects of orchietomy and testosterone replacement therapy on redox balance and salivary gland function in Wistar rats. **J Steroid Biochem Mol Biol**, 218, p. 106048, Apr 2022.

DOS SANTOS, D. R.; FIAIS, G. A.; OLIVEIRA, H. A.; RIBAS, T. B. *et al.* Assessment of redox state and biochemical parameters of salivary glands in rats treated with anti-obesity drug sibutramine hydrochloride. **Clin Oral Investig**, May 13 2022.

ERBAS, O.; YILMAZ, M.; TASKIRAN, D. Levetiracetam attenuates rotenone-induced toxicity: A rat model of Parkinson's disease. **Environ Toxicol Pharmacol**, 42, p. 226-230, Mar 2016.

EREL, O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. **Clin Biochem**, 38, n. 12, p. 1103-1111, Dec 2005.

FAROOQ, I.; BUGSHAN, A. The role of salivary contents and modern technologies in the remineralization of dental enamel: a narrative review. **F1000Res**, 9, p. 171, 2020.

FEKETE, S.; SIMKO, J.; GRADOSOVA, I.; MALAKOVA, J. *et al.* The effect of levetiracetam on rat bone mass, structure and metabolism. **Epilepsy Res**, 107, n. 1-2, p. 56-60, Nov 2013.

FERREIRA, J. N.; HOFFMAN, M. P. Interactions between developing nerves and salivary glands. **Organogenesis**, 9, n. 3, p. 199-205, Jul-Sep 2013.

FERREIRA, R. O.; ARAGAO, W. A. B.; BITTENCOURT, L. O.; FERNANDES, L. P. M. *et al.* Ethanol binge drinking during pregnancy and its effects on salivary glands of offspring rats: oxidative stress, morphometric changes and salivary function impairments. **Biomed Pharmacother**, 133, p. 110979, Jan 2021.

FICHSEL, G.; FICHSEL, H.; LIAPPIS, N. [Serum uric acid concentration and anticonvulsant therapy in childhood]. **Klin Padiatr**, 205, n. 6, p. 429-431, Nov-Dec 1993.

FUKS, B.; GILLARD, M.; MICHEL, P.; LYNCH, B. *et al.* Localization and photoaffinity labelling of the levetiracetam binding site in rat brain and certain cell lines. **Eur J Pharmacol**, 478, n. 1, p. 11-19, Sep 30 2003.

GALLUCCI NETO, J.; MARCHETTI, R. L. [Epidemiologic aspects and relevance of mental disorders associated with epilepsy]. **Braz J Psychiatry**, 27, n. 4, p. 323-328, Dec 2005.

GHAFOOR, P. A.; RAFEEQ, M.; DUBEY, A. Assessment of oral side effects of Antiepileptic drugs and traumatic oro-facial injuries encountered in Epileptic children. **J Int Oral Health**, 6, n. 2, p. 126-128, Apr 2014.

GRIGOLEIT, J. S.; KULLMANN, J. S.; OBERBECK, R.; SCHEDLOWSKI, M. *et al.* Salivary alpha-amylase response to endotoxin administration in humans. **Psychoneuroendocrinology**, 38, n. 9, p. 1819-1823, Sep 2013.

HAKAMI, T. Neuropharmacology of Antiseizure Drugs. **Neuropsychopharmacol Rep**, 41, n. 3, p. 336-351, Sep 2021.

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Anal Biochem**, 48, n. 2, p. 422-427, Aug 1972.

HASSEL, B.; TAUBOLL, E.; SHAW, R.; GJERSTAD, L. *et al.* Region-specific changes in gene expression in rat brain after chronic treatment with levetiracetam or phenytoin. **Epilepsia**, 51, n. 9, p. 1714-1720, Sep 2010.

HAZNEDAR, P.; DOGAN, O.; ALBAYRAK, P.; OZ TUNCER, G. *et al.* Effects of levetiracetam and valproic acid treatment on liver function tests, plasma free carnitine and lipid peroxidation in childhood epilepsies. **Epilepsy Res**, 153, p. 7-13, Jul 2019.

HENSKENS, Y. M.; STROOKER, H.; VAN DEN KEIJBUS, P. A.; VEERMAN, E. C. *et al.* Salivary protein composition in epileptic patients on different medications. **J Oral Pathol Med**, 25, n. 7, p. 360-366, Aug 1996.

HOMANN, V.; ROSIN-STEINER, S.; STRATMANN, T.; ARNOLD, W. H. *et al.* Sodium-phosphate cotransporter in human salivary glands: molecular evidence for the involvement of NPT2b in acinar phosphate secretion and ductal phosphate reabsorption. **Arch Oral Biol**, 50, n. 9, p. 759-768, Sep 2005.

HUMPHREYS-BEHER, M.; SCHNEYER, C. A. Beta-adrenergic receptors and cAMP levels of rat parotid and submandibular glands during chronic isoproterenol treatment. **J Auton Nerv Syst**, 17, n. 4, p. 263-271, Dec 1986.

ILEA, A.; ANDREI, V.; FEURDEAN, C. N.; BABTAN, A. M. *et al.* Saliva, a Magic Biofluid Available for Multilevel Assessment and a Mirror of General Health-A Systematic Review. **Biosensors (Basel)**, 9, n. 1, Feb 14 2019.

INANAGA, A.; HABU, T.; TANAKA, E.; TANIGUCHI, T. *et al.* Age changes in secretory function of male and female rat parotid glands in response to methoxamine and pilocarpine. **J Dent Res**, 67, n. 3, p. 565-573, Mar 1988.

IZUTSU, K. T.; JOHNSON, D. E. Changes in elemental concentrations of rat parotid acinar cells following pilocarpine stimulation. **J Physiol**, 381, p. 297-309, Dec 1986.

IZUTSU, K. T.; JOHNSON, D. E.; GODDARD, M. Intracellular elemental concentrations in resting and secreting rat parotid glands. **J Dent Res**, 66, n. 2, p. 537-540, Feb 1987.

JIA, T. M.; LIU, T.; LUAN, B.; LI, X. L. *et al.* [Effects of levetiracetam on the expression of NCAM and GAP-43 mRNA in the hippocampus of rats with epilepsy]. **Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi**, 13, n. 5, p. 428-431, May 2011.

JOSHI, N. H.; DESHPANDE, A. N.; DESHPANDE, N. C.; RATHORE, A. S. Comparative evaluation of oral hygiene status and gingival enlargement among epileptic and healthy children as related to various antiepileptic drugs. **J Indian Soc Periodontol**, 21, n. 2, p. 125-129, Mar-Apr 2017.

KALPANA, B. J.; AARTHY, S.; PANDIAN, S. K. Antibiofilm activity of alpha-amylase from *Bacillus subtilis* S8-18 against biofilm forming human bacterial pathogens. **Appl Biochem Biotechnol**, 167, n. 6, p. 1778-1794, Jul 2012.

KAMALI, F.; THOMAS, S. H. Effect of saliva flow rate on saliva phenytoin concentrations: implications for therapeutic monitoring. **Eur J Clin Pharmacol**, 46, n. 6, p. 565-567, 1994.

KARAS-RUSZCZYK, K.; KUCZYNSKA, J.; SIENKIEWICZ-JAROSZ, H.; KURKOWSKA-JASTRZEBSKA, I. *et al.* Comparison of Plasma, Saliva, and Hair Levetiracetam Concentrations. **Ther Drug Monit**, 39, n. 3, p. 263-268, Jun 2017.

KARESOVA, I.; SIMKO, J.; FEKETE, S.; ZIMCIKOVA, E. *et al.* The effect of levetiracetam on rat bone mineral density, bone structure and biochemical markers of bone metabolism. **Eur J Pharmacol**, 824, p. 115-119, Apr 5 2018.

LAMBENG, N.; GILLARD, M.; VERTONGEN, P.; FUKS, B. *et al.* Characterization of [(3)H]ucb 30889 binding to synaptic vesicle protein 2A in the rat spinal cord. **Eur J Pharmacol**, 520, n. 1-3, p. 70-76, Sep 27 2005.

LI, Z. R.; WANG, C. Y.; ZHU, X.; JIAO, Z. Population Pharmacokinetics of Levetiracetam: A Systematic Review. **Clin Pharmacokinet**, 60, n. 3, p. 305-318, Mar 2021.

LIU, J.; DUAN, Y. Saliva: a potential media for disease diagnostics and monitoring. **Oral Oncol**, 48, n. 7, p. 569-577, Jul 2012.

LOSCHER, W.; GILLARD, M.; SANDS, Z. A.; KAMINSKI, R. M. *et al.* Synaptic Vesicle Glycoprotein 2A Ligands in the Treatment of Epilepsy and Beyond. **CNS Drugs**, 30, n. 11, p. 1055-1077, Nov 2016.

LOSCHER, W.; HONACK, D. Development of tolerance during chronic treatment of kindled rats with the novel antiepileptic drug levetiracetam. **Epilepsia**, 41, n. 12, p. 1499-1506, Dec 2000.

LOSCHER, W.; POTSCHKA, H.; SISODIYA, S. M.; VEZZANI, A. Drug Resistance in Epilepsy: Clinical Impact, Potential Mechanisms, and New Innovative Treatment Options. **Pharmacol Rev**, 72, n. 3, p. 606-638, Jul 2020.

LUNDSTROM, A.; EEG-OLOFSSON, O.; HAMP, S. E. Effects of anti-epileptic drug treatment with carbamazepine or phenytoin on the oral state of children and adolescents. **J Clin Periodontol**, 9, n. 6, p. 482-488, Nov 1982.

LYNCH, B. A.; LAMBENG, N.; NOCKA, K.; KENSEL-HAMMES, P. *et al.* The synaptic vesicle protein SV2A is the binding site for the antiepileptic drug levetiracetam. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 101, n. 26, p. 9861-9866, Jun 29 2004.

MACIEJCZYK, M.; MATCZUK, J.; ZENDZIAN-PIOTROWSKA, M.; NIKLINSKA, W. *et al.* Eight-Week Consumption of High-Sucrose Diet Has a Pro-Oxidant Effect and Alters the Function of the Salivary Glands of Rats. **Nutrients**, 10, n. 10, Oct 17 2018.

MADEJA, M.; MARGINEANU, D. G.; GORJI, A.; SIEP, E. *et al.* Reduction of voltage-operated potassium currents by levetiracetam: a novel antiepileptic mechanism of action? **Neuropharmacology**, 45, n. 5, p. 661-671, Oct 2003.

MAHDAVI, A.; NAEINI, A. A.; NAJAFI, M.; MARACY, M. *et al.* Effect of levetiracetam drug on antioxidant and liver enzymes in epileptic patients: case-control study. **Afr Health Sci**, 20, n. 2, p. 984-990, Jun 2020.

MAHLE, C.; DASGUPTA, A. Decreased total antioxidant capacity and elevated lipid hydroperoxide concentrations in sera of epileptic patients receiving phenytoin. **Life Sci**, 61, n. 4, p. 437-443, 1997.

MARGINEANU, D. G.; MATAGNE, A.; KAMINSKI, R. M.; KLITGAARD, H. Effects of chronic treatment with levetiracetam on hippocampal field responses after pilocarpine-induced status epilepticus in rats. **Brain Res Bull**, 77, n. 5, p. 282-285, Nov 25 2008.

MARINO, S.; VITALITI, G.; MARINO, S. D.; PAVONE, P. *et al.* Pyridoxine Add-On Treatment for the Control of Behavioral Adverse Effects Induced by Levetiracetam in Children: A Case-Control Prospective Study. **Ann Pharmacother**, 52, n. 7, p. 645-649, Jul 2018.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **Eur J Biochem**, 47, n. 3, p. 469-474, Sep 16 1974.

MARSH, P. D.; DO, T.; BEIGHTON, D.; DEVINE, D. A. Influence of saliva on the oral microbiota. **Periodontol** **2000**, 70, n. 1, p. 80-92, Feb 2016.

MATSUZAKI, T.; SUSU, T.; SHIMIZU, K.; SAWAI, N. *et al.* Function of the membrane water channel aquaporin-5 in the salivary gland. **Acta Histochem Cytochem**, 45, n. 5, p. 251-259, Oct 31 2012.

MATSUZAKI, T.; SUZUKI, T.; KOYAMA, H.; TANAKA, S. *et al.* Aquaporin-5 (AQP5), a water channel protein, in the rat salivary and lacrimal glands: immunolocalization and effect of secretory stimulation. **Cell Tissue Res**, 295, n. 3, p. 513-521, Mar 1999.

MESQUITA, C. S.; OLIVEIRA, R.; BENTO, F.; GERALDO, D. *et al.* Simplified 2,4-dinitrophenylhydrazine spectrophotometric assay for quantification of carbonyls in oxidized proteins. **Anal Biochem**, 458, p. 69-71, Aug 1 2014.

MICHIELS, C.; RAES, M.; TOUSSAINT, O.; REMACLE, J. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. **Free Radic Biol Med**, 17, n. 3, p. 235-248, Sep 1994.

MODEER, T.; DAHLLOF, G.; THEORELL, K. Oral health in non-institutionalized epileptic children with special reference to phenytoin medication. **Community Dent Oral Epidemiol**, 14, n. 3, p. 165-168, Jun 1986.

NAGY, A.; BARTA, A.; VARGA, G.; ZELLES, T. Changes of salivary amylase in serum and parotid gland during pharmacological and physiological stimulation. **J Physiol Paris**, 95, n. 1-6, p. 141-145, Jan-Dec 2001.

NARITA, T.; QI, B.; MURAKAMI, M.; SUGIYA, H. Pilocarpine induces the residual secretion of salivary fluid in perfused submandibular glands of rats. **PLoS One**, 14, n. 8, p. e0221832, 2019.

NISHIURA, T.; GAO, C.; NAN, X.; ABE, K. Expression and postnatal changes of adrenergic receptor subtype mRNA in rat submandibular glands. **Arch Oral Biol**, 46, n. 7, p. 573-584, Jul 2001.

OMORI, Y.; ASARI, T.; MARUYAMA, K.; KUSAMA, H. *et al.* Effects of pilocarpine hydrochloride and cevimeline on submandibular/sublingual salivation in rat xerostomia model produced by X-ray irradiation. **Arzneimittelforschung**, 53, n. 5, p. 342-350, 2003.

ONOPIUK, B.; ONOPIUK, P.; DABROWSKA, Z.; DABROWSKA, E. *et al.* Effect of Metronidazole on the Oxidoreductive Processes in the Submandibular and Parotid Glands in Experimental Research. **Oxid Med Cell Longev**, 2018, p. 7083486, 2018.

OSUNTOKUN, O. S.; BABATUNDE, A. A.; OLAYIWOLA, G.; ATERE, T. G. *et al.* Assessment of the biomarkers of hepatotoxicity following carbamazepine, levetiracetam, and carbamazepine-levetiracetam adjunctive treatment in male Wistar rats. **Toxicol Rep**, 8, p. 592-598, 2021.

OSUNTOKUN, O. S.; OLAYIWOLA, G.; ATERE, T. G.; ADEKOMI, D. A. *et al.* Hypothalamic-pituitary-testicular axis derangement following chronic phenytoin-levetiracetam adjunctive treatment in male Wistar rats. **Andrologia**, 52, n. 11, p. e13788, Dec 2020.

PATRICK, M.; PARMITER, S.; MAHMOUD, S. H. Feasibility of Using Oral Fluid for Therapeutic Drug Monitoring of Antiepileptic Drugs. **Eur J Drug Metab Pharmacokinet**, 46, n. 2, p. 205-223, Mar 2021.

PATSALOS, P. N.; BERRY, D. J. Therapeutic drug monitoring of antiepileptic drugs by use of saliva. **Ther Drug Monit**, 35, n. 1, p. 4-29, Feb 2013.

PATTERSON, K.; CATALAN, M. A.; MELVIN, J. E.; YULE, D. I. *et al.* A quantitative analysis of electrolyte exchange in the salivary duct. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, 303, n. 10, p. G1153-1163, Nov 15 2012.

PAVONE, A.; CARDILE, V. An in vitro study of new antiepileptic drugs and astrocytes. **Epilepsia**, 44, n. s10, p. 34-39, 2003.

PEDERSEN, A. M. L.; SORENSEN, C. E.; PROCTOR, G. B.; CARPENTER, G. H. *et al.* Salivary secretion in health and disease. **J Oral Rehabil**, 45, n. 9, p. 730-746, Sep 2018.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **Eur J Med Chem**, 97, p. 55-74, Jun 5 2015.

PORCHERI, C.; MITSIADIS, T. A. Physiology, Pathology and Regeneration of Salivary Glands. **Cells**, 8, n. 9, Aug 26 2019.

PROCTOR, G. B. The physiology of salivary secretion. **Periodontol 2000**, 70, n. 1, p. 11-25, Feb 2016.

PROCTOR, G. B.; GARRETT, J. R.; CARPENTER, G. H.; EBERSOLE, L. E. Salivary secretion of immunoglobulin A by submandibular glands in response to autonomic infusions in anaesthetised rats. **J Neuroimmunol**, 136, n. 1-2, p. 17-24, Mar 2003.

PROCTOR, G. B.; SHAALAN, A. M. Disease-Induced Changes in Salivary Gland Function and the Composition of Saliva. **J Dent Res**, 100, n. 11, p. 1201-1209, Oct 2021.

RAJAVAARA, P.; VAINIONPAA, L.; RATTYA, J.; KNIP, M. *et al.* Tooth by tooth survival analysis of dental health in girls with epilepsy. **Eur J Paediatr Dent**, 4, n. 2, p. 72-77, Jun 2003.

REAGAN-SHAW, S.; NIHAL, M.; AHMAD, N. Dose translation from animal to human studies revisited. **FASEB J**, 22, n. 3, p. 659-661, Mar 2008.

RINALDI, M.; JOHANN, A. C.; ROCHA, F.; IGNACIO, S. A. *et al.* Histomorphometric analysis of salivary gland in wistar rats treated chronically with two benzodiazepines. **Curr Pharm Biotechnol**, 16, n. 6, p. 573-578, 2015.

ROUSSA, E. Channels and transporters in salivary glands. **Cell Tissue Res**, 343, n. 2, p. 263-287, Feb 2011.

RYBERG, A. T.; WARFVINGE, G.; AXELSSON, L.; SOUKUP, O. *et al.* Expression of muscarinic receptor subtypes in salivary glands of rats, sheep and man. **Arch Oral Biol**, 53, n. 1, p. 66-74, Jan 2008.

SABBAH, W. S.; HANAFY, S. M.; ARAFA, M. A. A. Biochemical and histological study on the effect of levetiracetam on the liver and kidney of pregnant albino rats. **Folia Morphol (Warsz)**, 78, n. 4, p. 809-817, 2019.

SAMARANAYAKE, L.; MATSUBARA, V. H. Normal Oral Flora and the Oral Ecosystem. **Dent Clin North Am**, 61, n. 2, p. 199-215, Apr 2017.

SANDBORG, R. R.; SIEGEL, I. A. Effects of 5-fluorouracil on protein synthesis and secretion of the rat parotid gland. **Arch Oral Biol**, 35, n. 12, p. 991-1001, 1990.

SARANGI, S. C.; KAKKAR, A. K.; KUMAR, R.; GUPTA, Y. K. Effect of lamotrigine, levetiracetam & topiramate on neurobehavioural parameters & oxidative stress in comparison with valproate in rats. **Indian J Med Res**, 144, n. 1, p. 104-111, Jul 2016.

SARANGI, S. C.; PATTNAIK, S. S.; KATYAL, J.; KALEEKAL, T. *et al.* An interaction study of *Ocimum sanctum* L. and levetiracetam in pentylenetetrazole kindling model of epilepsy. **J Ethnopharmacol**, 249, p. 112389, Mar 1 2020.

SCHIEBER, M.; CHANDEL, N. S. ROS function in redox signaling and oxidative stress. **Curr Biol**, 24, n. 10, p. R453-462, May 19 2014.

SCHWARTZ, M.; NEIERS, F.; FERON, G.; CANON, F. The Relationship Between Salivary Redox, Diet, and Food Flavor Perception. **Front Nutr**, 7, p. 612735, 2020.

SPICIARICH, M. C.; VON GAUDECKER, J. R.; JURASEK, L.; CLARKE, D. F. *et al.* Global Health and Epilepsy: Update and Future Directions. **Curr Neurol Neurosci Rep**, 19, n. 6, p. 30, May 1 2019.

SPOLIDORIO, L. C.; HERRERA, B. S.; COIMBRA, L. S.; DE ANDRADE, C. R. *et al.* The long-term administration of calcineurin inhibitors decreases antioxidant enzyme activity in the rat parotid and submandibular salivary glands. **Life Sci**, 134, p. 1-8, Aug 1 2015.

SUSA, T.; SAWAI, N.; AOKI, T.; IIZUKA-KOGO, A. *et al.* Effects of repeated administration of pilocarpine and isoproterenol on aquaporin-5 expression in rat salivary glands. **Acta Histochem Cytochem**, 46, n. 6, p. 187-197, Dec 28 2013.

SVALHEIM, S.; TAUBOLL, E.; SURDOVA, K.; ORMEL, L. *et al.* Long-term levetiracetam treatment affects reproductive endocrine function in female Wistar rats. **Seizure**, 17, n. 2, p. 203-209, Mar 2008.

TAN, J.; PAQUETTE, V.; LEVINE, M.; ENSOM, M. H. H. Levetiracetam Clinical Pharmacokinetic Monitoring in Pediatric Patients with Epilepsy. **Clin Pharmacokinet**, 56, n. 11, p. 1267-1285, Nov 2017.

TANIGUCHI, A.; SUSU, T.; KOGO, H.; IIZUKA-KOGO, A. *et al.* Long-term Pilocarpine Treatment Improves Salivary Flow in Irradiated Mice. **Acta Histochem Cytochem**, 52, n. 3, p. 45-58, Jun 25 2019.

THIJS, R. D.; SURGES, R.; O'BRIEN, T. J.; SANDER, J. W. Epilepsy in adults. **Lancet**, 393, n. 10172, p. 689-701, Feb 16 2019.

TRINKA, E. What is the evidence to use new intravenous AEDs in status epilepticus? **Epilepsia**, 52 Suppl 8, p. 35-38, Oct 2011.

TRIVEDI, R. C.; REBAR, L.; BERTA, E.; STONG, L. New enzymatic method for serum uric acid at 500 nm. **Clin Chem**, 24, n. 11, p. 1908-1911, Nov 1978.

TUTANC, M.; ARAS, M.; DOKUYUCU, R.; ALTAS, M. *et al.* Oxidative Status in Epileptic Children Using Carbamazepine. **Iran J Pediatr**, 25, n. 6, p. e3885, Dec 2015.

VAROGLU, A. O.; YILDIRIM, A.; AYGUL, R.; GUNDOGDU, O. L. *et al.* Effects of valproate, carbamazepine, and levetiracetam on the antioxidant and oxidant systems in epileptic patients and their clinical importance. **Clin Neuropharmacol**, 33, n. 3, p. 155-157, May 2010.

VIDAURRE, J.; GEDELA, S.; YAROSZ, S. Antiepileptic Drugs and Liver Disease. **Pediatr Neurol**, 77, p. 23-36, Dec 2017.

VOGL, C.; MOCHIDA, S.; WOLFF, C.; WHALLEY, B. J. *et al.* The synaptic vesicle glycoprotein 2A ligand levetiracetam inhibits presynaptic Ca²⁺ channels through an intracellular pathway. **Mol Pharmacol**, 82, n. 2, p. 199-208, Aug 2012.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods Enzymol**, 77, p. 325-333, 1981.

YU, J. H.; SCHNEYER, C. A. Effect of alpha- and beta-adrenergic agonists on fluid and calcium secretion by rat salivary glands. **Arch Oral Biol**, 29, n. 2, p. 141-146, 1984.

ZUKOWSKI, P.; MACIEJCZYK, M.; WASZKIEL, D. Sources of free radicals and oxidative stress in the oral cavity. **Arch Oral Biol**, 92, p. 8-17, Aug 2018.

ZWIERZYNSKA, E.; PIETRZAK, B. The differential effect of levetiracetam on memory and anxiety in rats. **Epilepsy Behav**, 136, p. 108917, Nov 2022.

ANEXO A – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **“Efeitos do anticonvulsivante levetiracetam no stresse oxidativo e função secretora das glândulas salivares de ratos Wistar”**, Processo FOA nº 0251-2021, sob responsabilidade de Antonio Hernandes Chaves Neto apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 27 de Maio de 2021.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 30 de Novembro de 2023.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 30 de Dezembro de 2023.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **“Effects of levetiracetam anticonvulsant on oxidative stress and secretory function of the salivary glands of Wistar rats”**, Protocol FOA nº 0251-2021, under the supervision of Antonio Hernandes Chaves Neto presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on May 27, 2021.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: November 30, 2023.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: December 30, 2023.

Prof. Associado João Carlos Callera
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua.foa@unesp.br