



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Laboratório de Neurofarmacologia



Programa de Pós-Graduação em Biologia Básica e Translacional

Lilian dos Anjos Carneiro

Atividade antiepiléptica e neuroprotetora do peptídeo neurovespina em um modelo crônico de Epilepsia do Lobo Temporal e avaliação da sua toxicidade aguda em camundongos *Swiss*

Brasília, DF

Março de 2017



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Laboratório de Neurofarmacologia
Programa de Pós-Graduação em Biologia Básica e Translacional



Lilian dos Anjos Carneiro

Atividade antiepiléptica e neuroprotetora do peptídeo neurovespina em um modelo crônico de Epilepsia do Lobo Temporal e avaliação da sua toxicidade aguda em camundongos *Swiss*

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Básica e Translacional da Universidade de Brasília, (Área de concentração: Neurociências), como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Prof^a Dr^a Márcia Renata Mortari

Brasília, DF

Março de 2017

Comissão Examinadora

Nome Orientador: Márcia Renata Mortari

Nome do Membro VINCULADO ao Programa: Cesar Koppe Grisolia

Nome do Membro externo NÃO VINCULADO ao Programa: Octavio Luis Franco

Nome do Membro NÃO VINCULADO ao Programa: Gustavo Adolfo Argañaraz

Nome do Membro: Valdir Filgueiras Pessoa

Nome do Membro: Fábio Viegas Caixeta

Dedicatória

*Aos meus amados pais, José e Leidi,
aos meus irmãos, Aline e Thiago
e ao amor da minha vida André
pelo amor, incentivo e apoio
todos os dias da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus que tem me capacitado e me sustentado. A Ele a glória.

Aos meus pais, José e Leidi pelo amor incondicional e pelo apoio pleno.

Aos meus irmãos, Aline e Thiago pela amizade e incentivo.

Aos meus sobrinhos Arthur e Estela por alegrar e encher de amor os meus dias.

Ao meu amor, André, pelo carinho, paciência, cuidado, e por estar ao meu lado em todos os momentos.

À minha orientadora Márcia pela acolhida na sua equipe da qual posso dizer que sou pioneira. Obrigada pela credibilidade, carinho, confiança, apoio, momentos de discussão científica e compartilhamento da vida cotidiana. Acima de tudo, obrigada pela amizade.

À minha família, que me apoiou, torceu e se orgulhou dessa conquista.

Aos amigos e irmãos pelas orações.

As meus amigos do laboratório de Neurofarmacologia: Andréia, Flávia, Gabriel, Jacqueline, Juliana, Kamila, Luana, Priscilla e Victória pelo apoio e companhia.

Ao técnico Danilo Oliveira pela ajuda na secção dos encéfalos.

Ao aluno de PIBIC, Matheus Ferroni Schwartz, pela ajuda na análise das lâminas de toxicidade e vídeos de neuroproteção.

À Flávia e a Maria pela ajuda com a eletroencefalografia.

Aos amigos e colegas do NeuropharmaLab pelos momentos de aprendizagem e confraternizações.

Aos professores Doutores Elisabeth Ferroni, Carlos Schwartz e Antonio Sebben pelos ensinamentos.

Ao professor Dr. Cesar Koppe Grisolia pela colaboração com a minha pesquisa nos testes de toxicidade.

Ao Jivago e Adriana pelo cuidado com os animais do biotério.

Ao DPP-UNB, FAPDF e CNPq pelo apoio financeiro.



LISTA DE PUBLICAÇÕES

Anjos, Lilian Carneiro dos; GOMES, FLÁVIA MARIA MEDEIROS; DO COUTO, LUCIANNA LOPES; MOURÃO, CECÍLIA ALVES ; MOREIRA, KARLA GRAZIELA; SILVA, LUCIANO PAULINO; MORTARI, MÁRCIA RENATA. Anxiolytic activity and evaluation of potentially adverse effects of a bradykinin-related peptide isolated from a social wasp venom. *Life Sciences* (1973), v. 149, p. 1-2, 2016.

RANGEL, M.; SANTANA, C.; PINHEIRO, A.; **Dos Anjos, L. C.**; BARTH, T.; PIRES JUNIOR, O. R.; FONTES, W.; CASTRO, M. S. Marine Depsipeptides as Promising Pharmacotherapeutic Agents. *Marine Depsipeptides as Promising Pharmacotherapeutic Agents*, v. 17, p. 1-12, 2016.

MONGE-FUENTES, VICTORIA; GOMES, FLÁVIA MARIA MEDEIROS; CAMPOS, GABRIEL AVOHAY ALVES; SILVA, JULIANA DE CASTRO; BIOLCHI, ANDRÉIA MAYER; **DOS ANJOS, LILIAN CARNEIRO**; GONÇALVES, JACQUELINE COIMBRA; LOPES, KAMILA SOARES; MORTARI, MÁRCIA RENATA. Neuroactive compounds obtained from arthropod venoms as new therapeutic platforms for the treatment of neurological disorders. *The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases* (Online), v. 21, p. 1-9, 2015.

SILVA, JULIANA; MONGE-FUENTES, VICTORIA; GOMES, FLÁVIA; LOPES, KAMILA; **ANJOS, LILIAN**; CAMPOS, GABRIEL; ARENAS, CLAUDIA; BIOLCHI, ANDRÉIA; GONÇALVES, JACQUELINE; GALANTE, PRISCILLA; CAMPOS, LEANDRO; MORTARI, MÁRCIA. Pharmacological Alternatives for the Treatment of Neurodegenerative Disorders: Wasp and Bee Venoms and Their Components as New Neuroactive Tools. *Toxins JCR*, v. 7, p. 3179-3209, 2015.

DOS ANJOS, LILIAN CARNEIRO; ARAUJO, MAÍRA DE AZEVEDO FEITOSA; JUNIOR, MILTON REGO DE PAULA. Púrpura trombocitopênica trombótica: dois relatos de casos. *Universitas. Ciências da Saúde* (UNICEUB. Impresso), v. 11, p. 71-74, 2013.

MORTARI, MÁRCIA RENATA; DO COUTO, LUCIANNA LOPES; **Carneiro, Lilian dos Anjos**; MOURÃO, CAROLINE BARBOSA FARIAS; CAMARGO, THALITA SOARES; VARGAS, JIMMY ALEXANDER GUERRERO; OLIVEIRA, FAGNER NEVES; GATI, CHRISTIANO DEL CANTONI; SCHWARTZ, CARLOS ALBERTO; SCHWARTZ, ELISABETH FERRONI. Pharmacological characterization of *Synoeca cyanea* venom: An aggressive social wasp widely distributed in the Neotropical region. *Toxicon* (Oxford), v. 59, p. 163-170, 2012.

MORTARI, MÁRCIA RENATA; DO COUTO, LUCIANNA LOPES ; **Dos Anjos, Lilian Carneiro**; ARAUJO, MAÍRA DE AZEVEDO FEITOSA; MOURÃO, CECÍLIA ALVES; SCHWARTZ, CARLOS ALBERTO; FERREIRA, LUZITANO BRANDÃO. Anticonvulsant and anxiolytic activity of the peptide fraction isolated

from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. *Pharmacognosy Magazine*, v. 8, p. 292, 2012.

Dos Anjos, L. C. Fernanda dos Santos, Patrícia. Avaliação microbiológica de carne moída comercializada em açougues de Brasília, DF. *Universitas Ciências da Saúde*, v. 8, p. 33-43, 201.

PATENTE

MORTARI, M. R.; **Dos Anjos, L. C.** 'PEPTÍDEO MODIFICADO DA PEÇONHA DE VESPA SOCIAL E SEU USO COMO ANTIEPILÉPTICO E NEUROPROTETOR. 2014, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020140047280, título: "'PEPTÍDEO MODIFICADO DA PEÇONHA DE VESPA SOCIAL E SEU USO COMO ANTIEPILÉPTICO E NEUROPROTETOR"', Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 27/02/2014; Concessão: 27/02/2014.

LISTA DE ABREVIações

ANOVA: Análise de variância

AVE: Acidente vascular encefálico

CA1-4: Áreas 1 a 4 do Corno de Ammon

CE: Córtex entorrinal

CEUA: Comissão de Ética no Uso Animal do IB/UnB

CGEN: Conselho de gestão do patrimônio genético

CHCM: Concentração de hemoglobina corpuscular média

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

CER: Crises espontâneas e recorrentes

CONCEA: Conselho nacional de controle de experimentação animal

DO: Densidade óptica

DZP: Diazepam

DMSO: Dimetilsulfóxido

EEG: Eletroencefalografia

EH: Esclerose Hipocampal

EANS: Associação de Epilepsia da Nova Escócia

ELT: Epilepsia do Lobo Temporal

ELTM: Epilepsia do Lobo Temporal Mesial

EPC: Eritrócito policromático

ENC: Eritrócito normocromático

FAE: Fármacos antiepilépticos

GABA: Ácido γ -aminobutírico

GABA A: Receptor de GABA do tipo A

GD: Giro denteado

HGD: Hilus do Giro denteado

HCM: Hemoglobina corpuscular média

IBE: International Bureau of Epilepsy

I.C.V.: Administração intracerebroventricular

ILAE: International League Against Epilepsy

I.P.: Administração intraperitoneal

LVF: Low-Voltage Fast Onset Pattern

MALDI-TOF/TOF: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight/Time Of Flight

MN: Micronúcleo

OcTx-1202: Ocidentalina-1202

PBS: Solução tampão fosfato de sódio

PILO: Pilocarpina

PTZ: Pentilenotetrazol

SE: Status Epilepticus

SNC: Sistema nervoso central

VCM: Volume corpuscular médio

WHO: *World Health Organization*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Comparação da formação hipocampal com o cavalo marinho (Fonte: google.com).

Figura 2. A seta indica a representação do chifre do deus egípcio Ammon Kneph, referente à região mesial do hipocampo (modificado de Brain Physiology Lab, 2015), chamada de corno de Ammon (CA) em sua homenagem.

Figura 3. Conectividade básica na formação hipocampal em camundongo. Circuitaria trissináptica: A primeira sinapse é realizada por axônios da via perforante, que transmitem informações dos neurônios da camada II do córtex entorrinal ao giro dentado. As fibras musgosas do giro dentado fazem a segunda sinapse com as células piramidais de CA3, que fazem a terceira sinapse com as colaterais de Schaffer na CA1 (modificado de Neves *et al.*, 2008).

Figura 4. Estrutura química da pilocarpina ($C_{11}H_{16}N_2O_2$, Massa: 208.12). Disponível em: <http://www.basinc.om/library/presentations/biochem/sawyers03/>

Figura 5. *Pilocarpus jaborandi*. Disponível em: <http://www.engenhariadaSEsSEncias.com.br/site/modules.php?name=Conteudo&pid=1593>

Figura 6: Etapas de efeitos patofisiológicos na epileptogênese envolvida no modelo de ELT em camundongos induzido por pilocarpina.

Figura 7. Exemplar da vespa social *Polybia occidentalis*. Disponível em: <http://biogeodb.stri.si.edu/bioinformatics/dfm/metas/view/30677>.

Figura 8. Fórmula estrutural da Occidentalina-1202. Massa molecular de 1202 Da e nove resíduos de aminoácidos: E-Q-Y-M-V-A-F-W-M. (Representação estabelecida por Solange Rego, 2012).

Figura 9. Desenho esquemático ilustrando cada etapa do modelo crônico de ELT induzida por pilocarpina.

Figura 10. Câmera filmadora instalada acima da caixa dos sujeitos experimentais, no próprio biotério, para observação de CERs, no período crônico do modelo.

Figura 11. Desenho esquemático ilustrando cada etapa do modelo crônico de ELT induzida por pilocarpina para obtenção dos registros eletroencefalográficos.

Figura 12. Etapas da implantação dos eletrodos para registro de vídeo-EEGs. (A) Superfície dorsal com os eletrodos corticais implantados. (B) Eletrodos

corticais e intrahipocampais implantados. (C) Conector posicionado para conexão aos fios dos eletrodos. (D) Conector acoplado aos eletrodos e selado com resina acrílica.

Figura 13. (A) Eletrodos corticais. (B) Conector de oito pinos com fios de prata soldados aos pinos visando garantir melhor contato com os eletrodos. Esses componentes foram adquiridos da Pinnacle Technologies para aquisição do vídeo-EEG.

Figura 14. Delineamento esquemático do posicionamento dos eletrodos e do conector para os registros de vídeo-EEGs em camundongos (modificado de Gomes, 2015). (A) Protótipo de configuração do conector a ser acoplado aos eletrodos para obtenção dos registros EEGs. (B) Superfície dorsal do crânio de camundongo com indicação dos locais de implante. (C) Local de implantação dos eletrodos intrahipocampais nas CA1, modificada do Atlas Estereotáxico de Paxinos & Franklin (2001).

Figura 15. Sistema de aquisição de vídeo-EEG para camundongos. (a) Conector adjunto ao cabo blindado (8413-M, Pinnacle Technologies, EUA): permite que o animal efetue giros de 360° com liberdade de movimento. Sistema de condicionamento e aquisição de dados 8401-HS amplifica secundariamente, filtra os dados e bloqueia os ruídos eletromagnéticos externos, principalmente, na frequência de 60 Hz.

Figura 16. Desenho esquemático ilustrando cada etapa do modelo crônico de ELT induzida por pilocarpina para avaliação do efeito neuroprotetor.

Figura 17. Posicionamento do tecido cerebral para iniciar as secções utilizando o Vibrátomo KD-400.

Figura 18. Cubas contendo as soluções utilizadas na técnica de coloração de Nissl (em capela de fluxo laminar).

Figura 19. Microscópio óptico com câmera de vídeo digital, conectados a um computador equipado com o software (Leica, Las V4.1.0, Leica Microsystems, São Paulo).

Figura 20. Esquema dos testes de toxicidade aguda em camundongos.

Figura 21. Hematímetro automatizado utilizado para as análises quantitativas do sangue dos camundongos tratados com o peptídeo neurovespina.

Figura 22. Tempo (segundos) da somatória das CERs durante o período crônico. Os valores representam médias \pm EPM. Todos os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste Tukey-Kramer, [$F_{(7,49)} = 12.45$; $p < 0,01$].

(*) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo epiléptico ($p < 0,001$).

Figura 23. Tempo (segundos) de CERs em cada dia do período crônico após tratamento durante o período crônico do modelo de ELT. Os valores representam médias \pm EPM. Todos os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste Tukey-Kramer, sendo considerado $p < 0,05$.

(*) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo epiléptico .

(#) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo sadio.

(A). 15º dia: $[F_{(7,49)} = 6.348]$. **(B).** 16º dia: $[F_{(7,49)} = 7.714]$. **(C).** 17º dia: $[F_{(7,49)} = 5.226]$. **(D).** 18º dia: $[F_{(7,49)} = 4.637]$. **(E).** 19º dia: $[F_{(7,49)} = 4.564]$. **(F).** 20º dia: $[F_{(7,49)} = 4.802]$. **(G).** 21º dia: $[F_{(7,49)} = 9.924]$. **(H).** 22º dia: $[F_{(7,49)} = 4.900]$. **(I).** 23º dia: $[F_{(7,49)} = 3.976]$. **(J).** 24º dia: $[F_{(7,49)} = 4.975]$. **(K).** 25º dia: $[F_{(7,49)} = 3.915]$. **(L).** 26º dia: $[F_{(7,49)} = 8.925]$. **(M).** 27º dia: $[F_{(7,49)} = 6.401]$. **(N).** 28º dia: $[F_{(7,49)} = 4.547]$. **(O).** 29º dia: $[F_{(7,49)} = 6.331]$.

Figura 24. Duração total das CERs (segundos) em cada fase de todo o período crônico no modelo de ELT. Fase I: primeiras cinco horas logo após o tratamento. Fase II: quatro horas restantes de observação. Os dados passaram pelo teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov e foram submetidos à análise de variância ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste Tukey-Kramer

(*) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo epiléptico na fase I ($p < 0,01$).

(#) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo sadio na fase I ($p < 0,01$).

(!) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo epiléptico na fase II ($p < 0,01$).

Figura 25. Duração das CERs (segundos) em cada fase de todo o período crônico. Fase I: primeiras cinco horas logo após o tratamento. Fase II: quatro horas restantes de observação. Os dados passaram pelo teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov e foram submetidos à análise de variância ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste Tukey-Kramer, considerando-se $p < 0,05$.

(*) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo epiléptico na fase I.

(#) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo sadio na fase I.

(!) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo epiléptico na fase II.

(\$) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo sadio na fase I.

(A). 15º dia: $[F_{(7,49)} = 13.95]$. **(B).** 16º dia: $[F_{(7,49)} = 8.056]$. **(C).** 17º dia: $[F_{(7,49)} = 7.320]$. **(D).** 18º dia: $[F_{(7,49)} = 14.09]$. **(E).** 19º dia: $[F_{(7,49)} = 8.010]$. **(F).** 20º dia: $[F_{(7,49)} = 6.406]$. **(G).** 21º dia: $[F_{(7,49)} = 6.824]$. **(H).** 22º dia: $[F_{(7,49)} = 10.82]$. **(I).** 23º dia: $[F_{(7,49)} = 4.328]$. **(J).** 24º dia: $[F_{(7,49)} = 5.357]$. **(K).** 25º dia: $[F_{(7,49)} = 7.753]$. **(L).** 26º dia: $[F_{(7,49)} = 9.335]$. **(M).** 27º dia: $[F_{(7,49)} = 3.944]$. **(N).** 28º dia: $[F_{(7,49)} = 3.547]$. **(O).** 29º dia: $[F_{(7,49)} = 15.00]$.

Figura 26. Número de crises espontâneas e recorrentes durante todo período crônico no modelo de ELT. Os valores representam médias \pm EPM. Todos os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste Tukey-Kramer, $[F_{(7,49)} = 32.90; p < 0,0001]$.

(*) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Epiléptico ($p < 0,001$).

Figura 27. Número de CERs em cada dia após tratamento durante o período crônico no modelo de ELT. Os valores representam médias \pm EPM. Todos os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste Tukey-Kramer, considerando $p < 0,05$.

(*) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo epiléptico.

(#) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo sadio.

(A). 15^o dia: $[F_{(7,49)} = 18.31]$. **(B).** 16^o dia: $[F_{(7,49)} = 17.94]$. **(C).** 17^o dia: $[F_{(7,49)} = 27.42]$. **(D).** 18^o dia: $[F_{(7,49)} = 56.83]$. **(E).** 19^o dia: $[F_{(7,49)} = 40.98]$. **(F).** 20^o dia: $[F_{(7,49)} = 5.242]$. **(G).** 21^o dia: $[F_{(7,49)} = 24.98]$. **(H).** 22^o dia: $[F_{(7,49)} = 15.29]$. **(I).** 23^o dia: $[F_{(7,49)} = 17.05]$. **(J).** 24^o dia: $[F_{(7,49)} = 12.70]$. **(K).** 25^o dia: $[F_{(7,49)} = 18.04]$. **(L).** 26^o dia: $[F_{(7,49)} = 16.18]$. **(M).** 27^o dia: $[F_{(7,49)} = 17.83]$. **(N).** 28^o dia: $[F_{(7,49)} = 7.729]$. **(O).** 29^o dia: $[F_{(7,49)} = 17.52]$.

Figura 28. Número de CERs (segundos) em cada fase de todo o período crônico. Fase I: primeiras cinco horas logo após o tratamento. Fase II: quatro horas restantes de observação. Os dados passaram pelo teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov e foram submetidos à análise de variância ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste Tukey-Kramer, sendo considerado $p < 0,05$.

(*) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo epiléptico na fase I.

(#) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo sadio na fase I.

(!) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo epiléptico na fase II.

(\$) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo sadio na fase II.

Figura 29. Quantidade de CERs (n) em cada fase do período crônico. Fase I: primeiras cinco horas logo após o tratamento. Fase II: quatro horas restantes de observação. Os dados passaram pelo teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov e foram submetidos à análise de variância ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste Tukey-Kramer, considerando-se $p < 0,05$.

(*) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo epiléptico na fase I.

(#) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo sadio na fase I.

(!) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo epiléptico na fase II.

(\$) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo sadio na fase I.

(A). 15^o dia: $[F_{(7,49)} = 16.94]$. **(B).** 16^o dia: $[F_{(7,49)} = 13.15]$. **(C).** 17^o dia: $[F_{(7,49)} = 19.82]$. **(D).** 18^o dia: $[F_{(7,49)} = 27.91]$. **(E).** 19^o dia: $[F_{(7,49)} = 22.33]$. **(F).** 20^o dia: $[F_{(7,49)} = 15.17]$. **(G).** 21^o dia: $[F_{(7,49)} = 10.94]$. **(H).** 22^o dia: $[F_{(7,49)} = 7.468]$. **(I).** 23^o dia: $[F_{(7,49)} = 10.57]$. **(J).** 24^o dia: $[F_{(7,49)} = 10.99]$. **(K).** 25^o dia: $[F_{(7,49)} = 19.47]$. **(L).** 26^o dia: $[F_{(7,49)} = 10.61 p < 0,05]$. **(M).** 27^o dia: $[F_{(7,49)} = 13.11]$. **(N).** 28^o dia: $[F_{(7,49)} = 6.416]$. **(O).** 29^o dia: $[F_{(7,49)} = 10.57]$.

Figura 30. Classe das CERs, de acordo com a classificação de crises límbicas de Racine (1972) modificada por Shibley e Smith (2002), observadas durante todo período crônico. Os valores representam **medianas**. Todos os dados foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn, sendo considerado $p < 0,05$.

(*) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo epiléptico ($p < 0,001$).

(#) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo sadio ($p < 0,001$).

Figura 31. Classes máximas das CERs de acordo com a classificação de crises límbicas de Racine (1972) modificada por Shibley e Smith (2002), observadas em cada dia do período crônico. Os valores representam **medianas**. Todos os dados foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn, sendo considerado $p < 0,05$.

(*) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo epiléptico.

(#) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo sadio.

(A). 15º dia: (K = 40.96). **(B).** 16º dia: (K = 40.57). **(C).** 17º dia: (K = 41.15). **(D).** 18º dia: (K = 37.42). **(E).** 19º dia: (K = 35.09). **(F).** 20º dia: (K = 31.28). **(G).** 21º dia: (K = 35.79). **(H).** 22º dia: (K = 34.22). **(I).** 23º dia: (K = 27,19). **(J).** 24º dia: (K = 31.46). **(K).** 25º dia: (K = 23.22). **(L).** 26º dia: (K = 24.98). **(M).** 27º dia: (K = 28.38). **(N).** 28º dia: (K = 23.75). **(O).** 29º dia: (K = 27.92).

Figura 32. Classe máxima das CERs apresentadas pelos animais em cada fase do período crônico. Fase I: primeiras cinco horas logo após o tratamento. Fase II: quatro horas restantes de observação. considerando-se $p < 0,05$. Os valores representam **medianas**. Os dados passaram pelo teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov e foram submetidos à análise de variância ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste Tukey-Kramer (K = 152.9).

(*) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo epiléptico na fase I.

(#) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo sadio na fase I.

(!) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo epiléptico na fase II.

(\$) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo sadio na fase II.

Figura 33. Classe máxima das CERs apresentadas pelos animais em cada dia do período crônico, dividido em duas fases. Fase I: primeiras cinco horas logo após o tratamento. Fase II: quatro horas restantes de observação. Os valores representam **medianas**. Os dados passaram pelo teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov e foram submetidos à análise de variância ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste Tukey-Kramer, considerando-se $p < 0,05$.

(*) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo epiléptico na fase I.

(#) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo sadio na fase I.

(!) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo epiléptico na fase II.

(\$) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo sadio na fase II.

(A). 15º dia: (K = 79.35). **(B).** 16º dia: (K = 80.30). **(C).** 17º dia: (K = 82.55). **(D).** 18º dia: (K = 78.84). **(E).** 19º dia: (K = 77.46). **(F).** 20º dia: (K = 73.46). **(G).** 21º dia: (K = 77.67). **(H).** 22º dia: (K = 64.83). **(I).** 23º dia: (K = 72.70). **(J).** 24º dia: (K = 59.48). **(K).** 25º dia: (K = 52.42). **(L).** 26º dia: (K = 64.32). **(M).** 27º dia: (K = 60.75). **(N).** 28º dia: (K = 63.44). **(O).** 29º dia: (K = 65.43).

Figura 34. Massa corporal (gramas) dos sujeitos experimentais no primeiro e último dia de tratamento durante o período crônico. Os valores representam médias \pm EPM. Todos os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste Tukey-Kramer, [$F_{(7,49)} = 2.691$; $P = 0,0059$].

Figura 35: Curva de porcentagem de proteção do peptídeo neurovespina contra CERs durante o período crônico do modelo de ELT induzido por pilocarpina. Regressão não-linear sigmoideal; $R^2 = 0,9808$.

Figura 36. Tempo (segundos) de CERs nos dias 15^o, 18^o, 21^o, 24^o, 27^o e 30^o do período crônico do modelo de ELT induzido por pilocarpina após o tratamento com a DE₉₀ do peptídeo neurovespina. Os valores representam médias \pm EPM. Todos os dados foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis e o pós teste de Dunn, sendo considerado $p < 0,05$.

(*) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo epiléptico.

(A): [$K = 9.831$; $p < 0,05$]; (B): [$K = 10.18$; $p < 0,05$]; (C): [$K = 9,831$; $p < 0,05$]; (D): [$K = 10.18$; $p < 0,05$]; (E): [$K = 9.732$; $p < 0,05$]; (F): [$K = 9.732$; $p < 0,05$].

Figura 37. Quantidade (N) de CERs nos dias 15^o, 18^o, 21^o, 24^o, 27^o e 30^o do período crônico do modelo de ELT induzido por pilocarpina após o tratamento com a DE₉₀ do peptídeo neurovespina. Os valores representam médias \pm EPM. Todos os dados foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis e o pós teste de Dunn, sendo considerado $p < 0,05$.

(*) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo epiléptico.

(A): [$K = 9.504$; $p < 0,05$]; (B): [$K = 10.24$; $p < 0,05$]; (C): [$K = 9,831$; $p < 0,05$]; (D): [$K = 9.588$; $p < 0,05$]; (E): [$K = 9.401$; $p < 0,05$]; (F): [$K = 10.75$; $p < 0,05$].

Figura 38. Representação ilustrativa do perfil eletroencefalográfico de um sujeito experimental sadio sem detecção de descargas epileptiformes sincronizadas (Pinnacle Technologies). EEG 1 e 2: A montagem referencial dos eletrodos intrahipocampais bilaterais e bipolar dos eletrodos corticais; EEG 3 e 4: gera as derivações observadas separadamente em cada um dos quatro canais de aquisição.

Figura 39. Representação ilustrativa do perfil eletroencefalográfico de um sujeito experimental epiléptico (tratado com salina) com detecção de descargas epileptiformes sincronizadas (Pinnacle Technologies). EEG 1 e 2: A montagem referencial dos eletrodos intrahipocampais bilaterais e bipolar dos eletrodos corticais; EEG 3 e 4: gera as derivações observadas separadamente em cada um dos quatro canais de aquisição.

Figura 40. Representação ilustrativa do perfil eletroencefalográfico de um sujeito experimental epiléptico (tratado com DZP) com detecção de descargas epileptiformes sincronizadas (Pinnacle Technologies). EEG 1 e 2: A montagem referencial dos eletrodos intrahipocampais bilaterais e bipolar dos eletrodos corticais; EEG 3 e 4: gera as derivações observadas separadamente em cada um dos quatro canais de aquisição.

Figura 41. Representação ilustrativa do perfil eletroencefalográfico de um sujeito experimental epilético (tratado com a De_{90} do peptídeo neurovespina) sem detecção de descargas epileptiformes sincronizadas (Pinnacle Technologies). EEG 1 e 2: A montagem referencial dos eletrodos intrahipocampais bilaterais e bipolar dos eletrodos corticais; EEG 3 e 4: gera as derivações observadas separadamente em cada um dos quatro canais de aquisição.

Figura 42. Densidade óptica obtida nos dois hemisférios cerebrais, em três regiões da formação hipocampal: (A) Camada de células piramidais de CA3 [$F_{(6,42)} = 28.35$; $P < 0,0001$]. (B) Camada de células piramidais de CA1 [$F_{(6,42)} = 21.86$; $P < 0,0001$]. (C) Camada de células granulares do Hilus do Giro Denteado [$F_{(6,42)} = 48.43$; $P < 0,0001$].

Figura 43. Imagens das secções coronais da formação hipocampal de camundongos (aumento de 40x), submetidas à técnica de coloração de Nissl. (A) Epilético. (B) Sadio. (C) DZP. (D) 1 mg/Kg do peptídeo neurovespina. (E) 2 mg/Kg do peptídeo neurovespina. (F) 4 mg/Kg do peptídeo neurovespina.

Os dados passaram pelo teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov e foram submetidos à análise de variância ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste Tukey-Kramer, considerando-se $p < 0,05$.

(*) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo epilético no hemisfério direito.

(#) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo sadio no hemisfério direito.

(\$) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo epilético no hemisfério esquerdo.

(!) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo sadio no hemisfério esquerdo.

Figura 44. Imagens das secções coronais da camada CA3 da formação hipocampal de camundongos (aumento de 400x), submetidas à técnica de coloração de Nissl. (A) Epilético. (B) Sadio. (C) DZP. (D) 1 mg/Kg do peptídeo neurovespina. (E) 2 mg/Kg do peptídeo neurovespina. (F) 4 mg/Kg do peptídeo neurovespina.

Figura 45. Imagens das secções coronais da camada CA1 da formação hipocampal de camundongos (aumento de 400x), submetidas à técnica de coloração de Nissl. (A) Epilético. (B) Sadio. (C) DZP. (D) 1 mg/Kg do peptídeo neurovespina. (E) 2 mg/Kg do peptídeo neurovespina. (F) 4 mg/Kg do peptídeo neurovespina.

Figura 46. Imagens das secções coronais da camada de células granulares do *Hilus* do giro denteado da formação hipocampal de camundongos (aumento de 400x), submetidas à técnica de coloração de Nissl. (A) Epilético. (B) Sadio. (C) DZP. (D) 1 mg/Kg do peptídeo neurovespina. (E) 2 mg/Kg do peptídeo neurovespina. (F) 4 mg/Kg do peptídeo neurovespina.

Figura 47. Tempo (segundos) de CERs durante todo período crônico após o tratamento durante a epileptogênese. Os valores representam médias \pm EPM.

Todos os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste Tukey-Kramer, [$F_{(5,33)} = 7.787$; $P = 0,0002$].

(*) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo epiléptico ($p < 0,001$).

Figura 48. Número de CERs durante todo período crônico após o tratamento durante a epileptogênese. Os valores representam médias \pm EPM. Todos os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste Tukey-Kramer, [$F_{(5,33)} = 13.41$; $P = <0,0001$].

(*) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo epiléptico ($p < 0,001$).

Figura 49. Classe de severidade das CERs após o tratamento durante a epileptogênese, de acordo com a classificação de crises límbicas de Racine (1972) modificada por Shibley e Smith (2002), observadas durante o período crônico. Os valores representam **medianas**. Todos os dados foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn, sendo considerado $p < 0,05$.

(*) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo epiléptico ($p < 0,001$).

(#) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo sadio ($p < 0,001$).

Figura 50. Densidade óptica obtida dos dois hemisférios cerebrais, em três regiões da formação hipocampal: (A) Camada de células piramidais de CA3 [$F_{(5,25)} = 30.59$; $P < 0,0001$]. (B) Camada de células piramidais de CA1 [$F_{(5,25)} = 5.37$; $P < 0,0001$]. (C) Camada de células granulares do Hilus do Giro Denteado [$F_{(5,25)} = 27.21$; $P < 0,0001$].

Os dados passaram pelo teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov e foram submetidos à análise de variância ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste Tukey-Kramer, considerando-se $p < 0,05$.

(*) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo epiléptico no hemisfério direito.

(#) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo sadio no hemisfério direito.

(\$) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo epiléptico no hemisfério esquerdo.

(!) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo sadio no hemisfério esquerdo.

Figura 51. Imagens das secções coronais da formação hipocampal de camundongos (aumento de 40x), submetidas à técnica de coloração de Nissl. (A) Epiléptico. (B) Sadio. (C) 2.5 mg/Kg do peptídeo neurovespina. (D) 4 mg/Kg do peptídeo neurovespina. (E) 8 mg/Kg do peptídeo neurovespina.

Figura 52. Imagens das secções coronais da camada CA3 da formação hipocampal de camundongos (aumento de 400x), submetidas à técnica de coloração de Nissl. (A) Epiléptico. (B) Sadio. (C) 2.5 mg/Kg do peptídeo neurovespina. (D) 4 mg/Kg do peptídeo neurovespina. (E) 8 mg/Kg do peptídeo neurovespina.

Figura 53. Imagens das secções coronais da camada CA1 da formação hipocampal de camundongos (aumento de 400x), submetidas à técnica de coloração de Nissl. (A) Epiléptico. (B) Sadio. (C) 2.5 mg/Kg do peptídeo neurovespina. (D) 4 mg/Kg do peptídeo neurovespina. (E) 8 mg/Kg do peptídeo neurovespina.

Figura 54. Imagens das secções coronais do HGD da formação hipocampal de camundongos (aumento de 400x), submetidas à técnica de coloração de Nissl. (A) Epiléptico. (B) Sadio. (C) 2.5 mg/Kg do peptídeo neurovespina. (D) 4 mg/Kg do peptídeo neurovespina. (E) 8 mg/Kg do peptídeo neurovespina.

Figura 55. Micronúcleos (n) em eritrócitos PCE ou NCE. Os dados correspondem a **medianas**. PCE = eritrócito policromático; NCE = eritrócito normocromático. Os dados passaram pelo teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov e foram submetidos à análise de variância ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste Tukey-Kramer, considerando-se $p < 0,05$. (K = 3.560).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Síndromes eletroclínicas e outras epilepsias.

Tabela 2. Descrição de crises focais de acordo com o grau de comprometimento durante as crises.

Tabela 3. Classificação atual das crises epiléticas.

Tabela 4. Classificação das crises límbicas induzidas por pilocarpina de acordo com o índice de Racine (1972), modificado por Shibley e Smith (2002).

Tabela 5. Medidas de referência para posicionamento dos eletrodos corticais e intrahipocampais em camundongos (*Swiss*) segundo o Atlas Estereotáxico de Paxinos & Franklin (2001).

Tabela 6. Correlação entre os locais dos eletrodos, a derivação (diferença de potencial entre dois eletrodos) e os canais de registro do sistema de vídeo-EEG (Pinnacle technologies, EUA) em camundongos.

Tabela 7. Resultado do teste de citotoxicidade (relação EPC/NCE) em células de medula óssea de camundongo *Swiss* tratados com o peptídeo neurovespina nas doses de 4, 8 e 12 mg/Kg, administrado via i.p 24 horas antes da eutanásia. O grupo Sadio recebeu solução salina (NaCl 150mM).

Tabela 8. Parâmetros hematológicos para camundongos machos.

RESUMO

dos Anjos, LC. **Atividade antiepiléptica e neuroprotetora do peptídeo neurovespina em um modelo crônico de Epilepsia do Lobo Temporal e avaliação da sua toxicidade aguda em camundongos swiss.** Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Biologia Básica e Translacional, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, 2017.

A epilepsia do lobo temporal (ELT) é o subtipo mais comum de epilepsia focal em adultos. O tratamento da ELT é feito com fármacos antiepilépticos (FAE), no entanto, os efeitos adversos, os altos custos e uma baixa taxa de controle total das crises alcançando apenas 11% dos pacientes geram restrições severas ao seu uso. Desde 1937, modelos animais tem sido o alicerce para a identificação de novas terapias para a epilepsia. Um dos modelos mais amplamente utilizados no estudo da ELT é o modelo crônico pós indução de *status epilepticus* (SE) através da injeção intraperitoneal (i.p.) de pilocarpina, que provoca crises espontâneas e recorrentes (CERs) e uma esclerose hipocampal similar à observada em pacientes com ELT e por isso tem sido extensamente utilizado no estudo e na busca por novos tratamentos. Nos últimos anos, diversos compostos isolados da peçonha de vespas com atividade no SNC de mamíferos têm sido descritas, especialmente os peptídeos. Com base nisso, o objetivo do nosso estudo foi avaliar a capacidade do peptídeo neurovespina (um novo peptídeo similar ao encontrado na vespa social *Polybia occidentalis*) em prevenir CERs e a perda neuronal na formação hipocampal em duas fases distintas do modelo crônico de ELT: neuroprotetora e epiléptica; avaliar o perfil de toxicidade aguda do peptídeo e avaliar os padrões epileptiformes por Vídeo-EEG. Para avaliar a atividade antiepiléptica, os sujeitos experimentais receberam injeções intraperitoneais (i.p.) do peptídeo neurovespina (doses: 4, 2 ou 1 mg /Kg), do fármaco Diazepam -DZP- (4 mg/Kg) ou solução salina (grupo controle) durante o período crônico do modelo. Na avaliação da atividade neuroprotetora, os animais receberam injeções i.p. do peptídeo neurovespina (doses: 8, 4 ou 2,5 mg /Kg) ou solução salina (grupo controle) durante o período latente do modelo. Nas duas avaliações, a ocorrência das CERs foi observada durante 15 dias através da filmagem dos animais (9 horas / dia) no período crônico. Ao término desse período, foi feita a avaliação das CERs em cada grupo experimental, onde foram contabilizados o tempo (em segundos), a quantidade (n) e a categorização das crises apresentadas segundo Índice de Racine. Após a avaliação do efeito antiepiléptico, o cálculo da DE_{90} (3.43 mg/Kg) foi estimado a partir da curva dose-resposta, sendo a dose utilizada para a obtenção dos padrões epileptiformes por Vídeo-EEG. Para avaliação da toxicidade aguda, os sujeitos foram submetidos ao protocolo experimental de atividade citotóxica e genotóxica através do teste de proliferação de eritrócitos em medula óssea e para avaliação hematotóxica, o sangue foi obtido através de punção cardíaca e a análise foi realizada em um hematímetro automatizado, calibrado para camundongos. Nossos resultados mostraram que o peptídeo neurovespina, na avaliação da atividade antiepiléptica, foi capaz de reduzir o tempo e o número de CERs em todas as doses avaliadas. Além disso, a neurodegeneração na formação hipocampal também foi diminuída. Na avaliação dos padrões epileptiformes, a DE_{90} do peptídeo foi capaz de proteger os animais contra

CERs nas primeiras 5 horas após o tratamento. Em relação à avaliação da atividade neuroprotetora, o peptídeo foi capaz de reduzir a frequência, a duração e a gravidade das crises. Somado a isso, a neurodegeneração foi diminuída em todas as regiões analisadas da formação hipocampal na dose de 8 mg/Kg. Ademais, nos testes de toxicidade, o peptídeo não apresentou potencial genotóxico, citotóxico ou hematotóxico, demonstrando sua alta segurança farmacológica. Estes dados indicam que o peptídeo neurovespina tem potencial para o desenvolvimento de novos fármacos para doenças neurológicas, tanto por reduzir a frequência das crises como por minimizar os danos neuronais, além disso, pode ser usado como uma ferramenta na pesquisa em neurociência.

Palavras-chave: Epilepsia do Lobo Temporal, antiepiléptico, neuroprotetor neurovespina, pilocarpina, formação hipocampal.

Abstract

dos Anjos, LC. **Antiepileptic and Neuroprotective activity of the peptide neurovespina in the chronic model of Temporal Lobe Epilepsy and evaluation of the acute toxicity in Swiss mice.** PhD thesis – Programa de Pós-Graduação em Biologia Básica e Translacional, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, 2017.

Lobe Temporal Epilepsy (TLE) is the most common subtype of focal Epilepsy in adults. However, adverse effects, high costs and a low rate of total seizure control, reaching only 11% of patients, cause severe restrictions on their use. Since 1937, animal models have been the foundation for the identification of new therapies for epilepsy. Understanding the pathophysiology of TLE largely rests on the use of models of *status epilepticus* (SE), like the pilocarpine model. After several hours of SE, pilocarpine-treated animals remit spontaneously and go into a seizure-free period, known as latent period, before displaying the spontaneous recurrent seizures (SRSs) that characterize the chronic epileptic condition. Based on this, the purpose of our study was to further characterize the capacity of neurovespina (a new peptide similar to one found in a social brazilian wasp *Polybia occidentalis*) to prevent SRSs and hippocampal neuronal loss in two distinct phases of the chronic ELT model: epileptogenic and epileptic; evaluate the acute toxicity profile of the peptide and evaluate the epileptiform patterns by Video-EEG. To evaluate the behavioral effectiveness antiepileptic effect, animals received intraperitoneal (i.p.) injections of neurovespina peptide (doses: 4, 2 or 1 mg/Kg), DZP (4 mg/Kg) or saline (control group) during chronic period. In the evaluation of the neuroprotective activity, animals received i.p. injections of neurovespina (doses: 8, 4 or 2.5 mg/Kg) or saline (control group) during latent period of the model. The occurrence of SRSs was evaluated during 15 days (video recorded 9 hours/day) during chronic period. At the end of this period, the SRSs were evaluated in each experimental group, where the time (in seconds), quantity (n) and categorization of behavioral changes were evaluated based on the Racine's seizure scale. After antiepileptic effect evaluation, the DE₉₀ (3.43 mg/Kg) was estimated from the dose-response curve and this dose was used to obtain epileptiform patterns by Video-EEG. The evaluation of acute toxicity, cytotoxicity and genotoxicity was performed by proliferation rate of the bone marrow erythroid precursors. For hematotoxicity evaluations, blood samples were drawn by cardiac puncture and processed in a automated hematology analyzer. Our results showed that neurovespina reduced the time and number of SRSs in all doses. Morphological analysis of hippocampal formation shows no significant loss of selective populations of interneurons in hippocampal formation. In the evaluation of the epileptiform patterns, the DE₉₀ of the peptide was able to protect the animals against SRSs in the first 5 hours after treatment. On the evaluation of the neuroprotective activity, 4 and 8 mg/Kg doses was able to reduce the frequency, duration and severity of seizures. In addition, neurodegeneration was decreased in all analyzed regions of hippocampal formation in the highest dose (8 mg/Kg). Moreover, evaluation of the acute toxicity demonstrated not cytotoxic, genotoxic or hematotoxic effects. These data indicate that neurovespina has potential for the development of novel drugs for neurological diseases, both to reduce the seizures frequency and to

minimize the neuronal damage associated with seizures and may also be used as a tool in neuroscience research.

Keywords: Temporal Lobe Epilepsy, antiepileptic peptide, neuroprotective, pilocarpine, neurovespina, hippocampal formation.

SUMÁRIO

1. Introdução	1
1.1. Propedêutica da Epilepsia	1
1.2. Princípios farmacológicos para o tratamento da Epilepsia	6
1.3. Epilepsia do lobo temporal (ELT).....	8
1.4. Formação hipocampal na ELTM.....	12
1.5. Epileptogênese na ELTM.....	16
1.6. EEG na ELT	18
1.7. Modelo Experimental de ELT.....	20
1.8. Peptídeos neuroativos identificados na peçonha de vespas sociais	25
1.9. O peptídeo neurovespina no tratamento da Epilepsia.....	28
2. Objetivos	30
2.1. Objetivo Geral.....	30
2.2. Objetivos específicos.....	30
3. Material e Métodos.....	32
3.1. Síntese e avaliação do grau de pureza do peptídeo Neurovespina	32
3.2. Bioensaios	33
3.3. Animais experimentais.....	33
3.4. Avaliação do efeito antiepiléptico do Neurovespina no modelo crônico de ELT pós-insulto por pilocarpina.....	34
3.4.1. Indução do Insulto inicial (SE)	35
3.4.2. Grupos experimentais submetidos ao protocolo experimental para avaliação da atividade antiepiléptica.....	36
3.4.3. Tratamento no período crônico	37
3.4.4. Avaliação das crises espontâneas e recorrentes	38
3.5. Determinação da DE ₉₀	39
3.6. Avaliação dos padrões epileptiformes por Vídeo-EEG.....	39
3.6.1. Procedimento experimental para a implantação dos eletrodos	39
3.6.2. Obtenção dos registros eletroencefalográficos e comportamentais	44
3.7. Avaliação do efeito neuroprotetor no modelo crônico de ELT	48
3.7.1. Grupos experimentais.....	49
3.7.2. Indução do Insulto inicial (SE)	50
3.7.3. Tratamento no período latente.....	50
3.7.4. Período crônico	50

3.7.5.	Avaliação das crises espontâneas e recorrentes	51
3.8.	Análises histológicas	51
3.8.1.	Coloração de Nissl.....	53
3.8.2.	Avaliação da citoarquitetura da formação hipocampal	55
3.8.3.	Análise semiquantitativa do dano neural.....	55
3.9.	Ensaio de toxicidade do peptídeo	56
3.9.1.	Grupos experimentais.....	56
3.9.2.	Hematotoxicidade	58
3.9.3.	Citotoxicidade e genotoxicidade	58
3.10.	Análise estatística.....	60
4.	Resultados	61
4.1.	Determinação da dose de pilocarpina utilizada para a indução do SE	61
4.2.	Efeito antiepiléptico do peptídeo neurovespina durante o período crônico do modelo de ELT	61
4.2.1.	Tempo de duração das crises epiléticas	61
4.2.2.	Número de crises epiléticas	68
4.2.3.	Classe das crises epiléticas	74
4.3.	Medidas da massa corporal dos sujeitos experimentais durante o período crônico	81
4.4.	Cálculo da DE ₉₀	82
4.5.	Avaliação dos padrões epileptiformes por vídeo-EEG	83
4.6.	Avaliação do Dano Neural no modelo Antiepiléptico.....	92
4.7.	Avaliação da atividade neuroprotetora do peptídeo neurovespina	96
4.7.1.	Tempo de duração das crises epiléticas	96
4.7.2.	Número de crises epiléticas	97
4.7.3.	Classe de severidade de crises epiléticas	98
4.8.	Avaliação do Dano Neural no modelo Neuroprotetor	100
4.9.	Avaliação da Toxicidade do peptídeo neurovespina	103
4.9.1.	Citotoxicidade	103
4.9.2.	Genotoxicidade.....	104
4.9.3.	Hematotoxicidade	105
5.	Discussão.....	107
6.	Conclusões	117
7.	Referências Bibliográficas	119
8.	Anexos.....	132

8.1. Anexo 1 - Declaração do CEUA	132
8.2. Anexo 2 - Autorização de Acesso e de Remessa de Componente do Patrimônio Genético.....	133

1. INTRODUÇÃO

1.1. Propedêutica da Epilepsia

A Epilepsia, depois do Acidente vascular encefálico (AVE) e a Doença de Alzheimer, é a terceira doença neurológica mais comum (Faught, 2012; Lo-Castro; Curatolo, 2014; Gravitz, 2014), e tem sido definida conceitualmente como uma predisposição em gerar crises epiléticas persistentes (definidas como sinais e sintomas transitórios decorrentes de uma atividade sincronizada e excessiva dos neurônios). Essas crises causam alterações funcionais e estruturais no cérebro, além de profundas consequências sociais e cognitivas para o paciente (Fisher *et al.*, 2005; Fisher; Leppik, 2008; Reddy; Kuruba, 2013; Vezzani *et al.*, 2015; Trinka *et al.*, 2015).

Na prática clínica, o diagnóstico é definido após o paciente apresentar pelo menos duas crises epiléticas não provocadas em um intervalo maior que 24 horas ou pelo menos uma crise não provocada, com grande probabilidade (maior que 60%) de apresentar novas crises nos próximos 10 anos (devido à presença de fatores de riscos como trauma, infecção, lesões estruturais, AVE, entre outros (Fisher *et al.*, 2014; Fisher, 2015).

Similar a outras doenças crônicas, a Epilepsia pode tornar-se uma condição socialmente incapacitante aos seus portadores. Além do estigma e discriminação, traz limitações quanto à independência, autonomia, liberdade, autoimagem e autoconfiança. Ademais, em casos graves, podem ocorrer problemas de interação social, desemprego, subemprego, dificuldades cognitivas, transtornos comportamentais, depressão, suicídio, e também induzir à morte súbita, que pode ser responsável por 10-20% da mortalidade

observada nessa doença, podendo ocorrer em qualquer idade (Baker *et al.*, 1997; Lhatoo *et al.*, 1998; Walczak *et al.*, 2001; Scorza; Cavalheiro, 2004; Nashef *et al.*, 2007; Ren, 2009; Löscher *et al.*, 2013).

A Epilepsia foi uma das primeiras doenças neurológicas a ser descrita e por isso, a origem de seu nome remota da Grécia antiga, sendo derivada da palavra *epilambanein*, que significa ataque/apreensão (Niedermeyer, 1990). Ao longo da história e na maioria das culturas, foi descrita como uma doença a ser evitada, temida e ocultada, onde as pessoas pensavam que seus portadores haviam sido visitados por deuses ou demônios (Gravitz, 2014).

A primeira descrição foi feita há cerca de três mil anos em acadiano, na Mesopotâmia (hoje Iraque), sendo as crises epiléticas atribuídas ao deus da lua. Em 400 a.C., Hipócrates, renomado médico grego, concluiu que as crises eram hereditárias e originadas no cérebro, porém, essa constatação não foi aceita por séculos (Gravitz, 2014).

Somente no início do século XVII, o médico inglês William Gilbert descartou a teoria sobrenatural e mística ao descrever o fenômeno elétrico responsável pela doença (Pinto, 2010; Gravitz, 2014). Atualmente, o sentimento de vergonha e a desconfiança em relação à Epilepsia diminuíram, no entanto, em diversas regiões no mundo, o preconceito ainda é muito presente (Gravitz, 2014).

Visando diminuir a discriminação e informar a população, em 2008 foi criado o *Purple day* (Dia roxo), idealizado pela canadense Cassidy Megan de apenas nove anos de idade, motivada pela sua própria luta contra a Epilepsia e apoiada e desenvolvida em parceria com a Associação de Epilepsia da Nova Escócia (EANS) (<http://www.purpleday.org/>).

No dia 26 de março, pessoas em todo mundo vestem uma peça de roupa e monumentos são iluminados na cor roxa em apoio à causa. A escolha dessa cor para representar a epilepsia foi em referência à lavanda, flor frequentemente associada à solidão e que simboliza os sentimentos de isolamento que afetam seus portadores (<http://www.purpleday.org/>).

De acordo com a Academia Brasileira de Neurologia (ABN), apenas em 2014, a Epilepsia entrou para o ranking das doenças do cérebro, uma vez que, era tratada apenas como condição. Essa decisão foi tomada pela Liga Internacional contra Epilepsia (ILAE) e pela Secretaria Internacional para Epilepsia (IBE), com o intuito de demonstrar sua gravidade, complexidade e aumentar o entendimento pela população (Fisher, 2015).

Atualmente, essa doença afeta de 4 a 10 pessoas em cada mil, em países desenvolvidos (Faught, 2012; Lo-Castro; Curatolo, 2014), e de 14 a 57 pessoas em cada mil, em países em desenvolvimento (Carpio; Hauser, 2009). Cerca de 65 milhões de pessoas foram diagnosticadas com a doença sendo que, a incidência é maior em crianças e a maioria vive em países com condições socioeconômicas limitadas (Ngugi *et al.*, 2010; Camfield; Camfield, 2015; Li *et al.*, 2016).

Nos países em desenvolvimento, as infecções e infestações do Sistema Nervoso Central (SNC) correspondem aos fatores mais comuns para o desenvolvimento da Epilepsia e são provavelmente os mais fáceis de serem evitados (Singhi, 2011; Vezzani *et al.*, 2015).

Nos países desenvolvidos predominam as epilepsias causadas por fatores estruturais ou metabólicos (infância) e decorrentes de processos

degenerativos e vasculares (terceira idade) (Guerrini, 2006; Ren, 2009; Panayiotopoulos, 2012).

Em relação à classificação da Epilepsia, existem diversos subtipos e uma pessoa pode ter mais de um subtipo concomitantemente (Eisenstein, 2014). A classificação mais atual leva em consideração múltiplos fatores individuais como a idade de início, desenvolvimento cognitivo, exames motores e sensoriais, padrão no eletroencefalograma (EEG), fatores provocantes ou desencadeantes e padrões de ocorrência de crise durante o sono.

Sendo assim, as principais epilepsias hoje reconhecidas podem ser agrupadas em quatro grandes grupos (Tabela 1): síndromes eletroclínicas, constelações distintas, epilepsias estruturais ou metabólicas e de causa desconhecida (para revisão ver Berg *et al.*, 2010).

Tabela 1. Síndromes eletroclínicas e outras epilepsias (Berg *et al.*, 2010).

1- Síndromes eletroclínicas organizados por faixa etária de início
✚ Período neonatal
✚ Epilepsia familiar neonatal benigna
✚ Encefalopatia mioclônica precoce
✚ Síndrome de Ohtahara
✚ Lactente
✚ Epilepsia do lactente com crises focais migratórias
✚ Síndrome de West
✚ Epilepsia mioclônica do lactente
✚ Epilepsia benigna do lactente
✚ Epilepsia familiar benigna do lactente
✚ Síndrome de Dravet
✚ Encefalopatia mioclônica em distúrbios não progressivos
✚ Infância
✚ Crises febris <i>plus</i> (pode começar no lactente)
✚ Síndrome de Panayiotopoulos
✚ Epilepsia mioclônica com crises atônicas (anteriormente astáticas)
✚ Epilepsia benigna com espículas centrotemporais
✚ Epilepsia do lobo frontal noturna autossômica dominante
✚ Epilepsia occipital da infância de início tardio (tipo Gastaut)
✚ Epilepsia com ausências mioclônicas
✚ Síndrome de Lennox-Gastaut

-
- ✚ Encefalopatia epiléptica com espícula-onda contínua durante o sono lento
 - ✚ Síndrome de Landau-Kleffner
 - ✚ Epilepsia de ausência da infância
 - ✚ Adolescência - Adulto
 - ✚ Epilepsia ausência juvenil
 - ✚ Epilepsia mioclônica juvenil
 - ✚ Epilepsia somente com crises generalizadas tônico-clônicas
 - ✚ Epilepsias mioclônicas progressivas
 - ✚ Epilepsia autossômica dominante com características auditivas
 - ✚ Outras epilepsias familiares do lobo temporal
 - ✚ Correlação menos específica com a idade
 - ✚ Epilepsia focal familiar com focos variáveis (da infância à idade adulta)
 - ✚ Epilepsias reflexas

2- Constelações distintas

- ✚ Epilepsia do lobo temporal mesial com esclerose do hipocampo
- ✚ Síndrome de Rasmussen
- ✚ Crises gelásticas com hamartoma hipotalâmico
- ✚ Epilepsia-hemiconvulsão-hemiplegia
- ✚ Epilepsias que não se encaixam em nenhuma dessas categorias diagnósticas, podem ser distinguidas, primeiro com base na presença ou ausência de uma condição estrutural ou metabólica conhecida (causa presumida) e, em seguida, com base no principal modo de início da crise (generalizada versus focal).

3- Epilepsias atribuídas e organizadas por causas estrutural-metabólicas

- ✚ Malformações do desenvolvimento cortical (hemimegalencefalia, heterotopias, etc)
- ✚ Síndromes neurocutâneas (complexo da esclerose tuberosa, Sturge-Weber, etc)
- ✚ Tumor
- ✚ Infecção
- ✚ Trauma
- ✚ Angioma
- ✚ Insultos perinatais
- ✚ AVE

4- Epilepsias de causa desconhecida

Uma síndrome eletroclínica apresenta um quadro complexo de características clínicas, e de sinais e sintomas que, juntos, definem um distúrbio clínico distinto e reconhecível (Scheffer *et al.*, 2008; Guerrini *et al.*, 2007; Ottman *et al.*, 2008).

Esses distúrbios distintos são identificados com base em um conjunto de características que permitem um diagnóstico específico tais como: idade típica de início, características específicas do EEG, tipos de crises. Esse diagnóstico, por sua vez, visa proporcionar um melhor tratamento, manejo e prognóstico, assim como verificar fatores genéticos e neuropsicológicos associados (Berg *et al.*, 2010).

Cerca de 40% dos tipos de Epilepsia que são atribuídas e organizadas por causas estrutural-metabólicas é decorrente de uma injúria cerebral. Nesse sentido, lesões estruturais que incluem distúrbios adquiridos, como AVE, trauma e infecção, e de origem genética (por exemplo, esclerose tuberosa e malformações do desenvolvimento cortical) fazem parte dessa divisão (Berg *et al.*, 2010; Vezzani *et al.*, 2015). Apesar disso, nesse último caso, “ocorre um distúrbio separado, interposto entre o defeito genético e a epilepsia” (Berg *et al.*, 2010).

As epilepsias de causa desconhecida representam mais de 47% de todos os casos descritos (Nicita, 2012), sendo uma forma neutra para designar que a natureza da causa subjacente é ainda desconhecida. Segundo Berg (2010), “é importante ressaltar que nessa subdivisão, pode haver um defeito genético fundamental, ou pode ser a consequência de um distúrbio separado ainda não reconhecido” (Berg *et al.*, 2010).

1.2. Princípios farmacológicos para o tratamento da Epilepsia

Durante as últimas três décadas, a introdução de mais de 15 fármacos antiepilépticos (FAEs) de terceira geração proporcionou aos médicos e pacientes mais opções para o tratamento de muitos tipos de epilepsias. Apesar

disso, esses medicamentos não conseguem controlar as crises em grande parte dos pacientes (Löscher; Schmidt, 2011; Löscher *et al.*, 2013). Além disso, um aspecto particularmente inquietante dos tratamentos atuais de epilepsia é que não houve progressos substanciais no controle das crises nos últimos 50 anos desde a introdução da carbamazepina e do valproato (FAE de primeira geração/convencionais) (Löscher *et al.*, 2013).

Os FAEs disponíveis agem somente suprimindo as crises epiléticas (Löscher *et al.*, 2013). Os três principais mecanismos de ação desses fármacos são: a modulação dos canais iônicos voltagem-dependentes, aumento da transmissão inibitória mediada por GABA e diminuição da transmissão excitatória mediada pelo glutamato (Bialer; White, 2010; Löscher; Schmidt, 2011; Brodie *et al.*, 2011; Löscher *et al.*, 2013).

Adicionalmente, os FAEs podem ser utilizados imediatamente após um insulto cerebral, quer seja em modelos animais ou em pacientes, e visam prevenir ou reduzir o desenvolvimento da epileptogênese (processo onde ocorrem mudanças estruturais e funcionais no cérebro normal, podendo gerar crises epiléticas recorrentes devido à atividade anormal dos neurônios), a neurodegeneração e as alterações cognitivas ou comportamentais que podem surgir em decorrência do insulto (Goldenberg, 2010; Löscher *et al.*, 2013).

No entanto, esse efeito neuroprotetor (neutralizar os efeitos da epileptogênese, incluindo a prevenção, a modificação da doença e a remissão total das crises) só foi demonstrado em modelos animais, não sendo comprovado em seres humanos (Löscher *et al.*, 2013; Vezzani *et al.*, 2015), ou seja, nenhum FAE é capaz de prevenir a epileptogênese em pacientes que

apresentem fatores de risco para desenvolver a primeira crise e consequentemente, a epilepsia.

Os FAE convencionais (desenvolvidos antes de 1993) (Fenitoína, Fenobarbital, Carbamazepina, Ácido Valpróico, Diazepam, Etosuximida, Felbamato, Gabapentina, Lamotrogina Feb), e os de "nova geração" (Oxycarbazepina, Topiramato, Tiagabina, Vigabatrina, Rufinamida, Lacosamida, Parampanel), estão, usualmente, associados a efeitos adversos, variando em frequência e gravidade (Löscher; Schmidt, 2011; Löscher *et al.*, 2013; Vajda; Eadie, 2014).

Tais efeitos causam um grande impacto na qualidade de vida dos pacientes (Löscher *et al.*, 2013), especialmente os que causam deterioração cognitiva (Scorza; Cavalheiro, 2004; Vajda; Eadie, 2014), indução de dano neural (Sutula *et al.*, 2004; Scorza; Cavalheiro, 2004; Vajda; Eadie, 2014) ou morte súbita (Vajda; Eadie, 2014). Além disso, a maioria não consegue controlar as crises epiléticas em cerca de 40% dos pacientes (fármaco-resistentes) (Löscher *et al.*, 2013), podendo chegar a 70% em pacientes com epilepsia do lobo temporal (ELT) (Raza *et al.*, 2001, , Vliet *et al.*, 2014).

1.3. Epilepsia do lobo temporal (ELT)

A ELT é o subtipo mais comum de epilepsia focal em adultos, sendo, os insultos ou as lesões cerebrais, as principais causas para o seu surgimento (Vliet *et al.*, 2014). A maior parte dessas crises origina-se no lobo temporal, principalmente na formação hipocampal e no complexo amigdalóide (Löscher, 1997; Berg *et al.*, 2010).

As crises focais (tabela 2) apresentam atividade epileptogênica limitada a uma porção definida do encéfalo, podem ter origem subcortical e podem evoluir para uma crise epiléptica bilateral, onde ocorre o comprometimento da consciência ou do contato, podendo gerar crises epilépticas generalizadas (Berg *et al.*, 2010).

Tabela 2. Descrição de crises focais de acordo com o grau de comprometimento durante as crises (Berg *et al.*, 2010).

Sem comprometimento da consciência

- ✚ Com componentes observáveis motores ou autonômicos.
- ✚ Subjetiva envolvendo fenômenos sensoriais ou psíquicos apenas.

Com comprometimento da consciência.

- ✚ Esta corresponde aproximadamente ao conceito de “crise parcial complexa”.

Evoluindo para uma crise convulsiva bilateral (envolvendo componentes tônicos, clônicos, ou tônico-clônicos).

As crises generalizadas também podem se manifestar através de períodos de ausência, onde se observa interrupção da consciência, sem acometimento motor (ausência simples), ou pode se apresentar com discretas atividades motoras clônicas, tônicas e autonômicas e automatismos (ausência complexa) (Taylor; Dudek, 1984; Engel, 1995; Berg *et al.*, 2010). A classificação de crises epilépticas está descrita na tabela 3.

Tabela 3. Classificação atual das crises epilépticas (Berg *et al.*, 2010)

Crises generalizadas

- ✚ Tônico-clônica
Em qualquer combinação
 - ✚ Ausência
-

Típica
Atípica
Ausências com características especiais
Ausência Mioclônica
Mioclonia Palpebral

✚ Mioclônica
Mioclônica
Mioclônica Atônica
Mioclônica Tônica
Clônica
Tônica
Atônica

Crises focais

Desconhecido

Espasmos epilépticos

As crises focais com comprometimento da consciência ou parciais complexas se originam em algum ponto do encéfalo e rapidamente acometem os dois hemisférios, com distribuição bilateral, incluindo estruturas corticais e subcorticais, com lateralização, podendo ser assimétricas. Apresentam manifestações motoras tônico-clônicas, na qual após um período de espasmos musculares generalizados evoluem para contrações musculares rítmicas em todo o corpo.

Os principais fármacos utilizados no tratamento da ELT são a fenitoína e a carbamazepina ou oxcarbazepina (Schumacher *et al.*, 1998; Schmidt; Schachter, 2014; Vadja; Eadie, 2014). O tratamento com FAE é realizado preferencialmente em monoterapia, no entanto, os efeitos adversos, os altos custos e uma taxa de apenas 11% dos pacientes apresentarem controle total das crises geram restrições severas ao uso desses fármacos (Wieser, 2004; Schmidt; Schachter, 2014; Vadja; Eadie, 2014).

Em relação à origem e semiologia das crises, a ELT foi subdividida em mesial ou lateral (Engel, 2001a; Andrade-Valença *et al.*, 2006). A esclerose hipocampal, identificada desde 1825, é um dos principais achados patológicos em pacientes com ELT, sendo associada principalmente à Epilepsia do Lobo Temporal Mesial (ELTM).

A ELTM está classificada no grupo das constelações distintas (Tabela 1). Nesse grupo, a doença não pode ser enquadrada como síndrome eletroclínica no sentido *sensu-strictu*, mesmo assim, esse grupo representa uma série de entidades com lesões específicas ou outras etiologias bem definidas (Berg *et al.*, 2010).

A ELTM corresponde a aproximadamente 60% dos casos de ELT (Engel, 2001b; Téllez-Zenteno; Hernández-Ronquillo, 2012), sendo a esclerose mesial a causa descrita para 60-70% dos pacientes com ELTM se tornarem refratários ao tratamento clínico (Andrade-Valença *et al.*, 2006; Téllez-Zenteno; Hernández-Ronquillo, 2012).

Do ponto de vista anatomopatológico, a esclerose hipocampal clássica envolve um padrão característico de perda de células piramidais nas regiões CA1 e CA3, concomitantemente com astrogliose (Blümcke *et al.*, 2013; Coras; Blümcke, 2015). Além disso, ocorre a formação de cicatrizes com tecido fibroso, brotamento de fibras musgosas e dispersão de células granulares (Kobow *et al.*, 2009; Kovacs *et al.*, 2012; Cendes *et al.*, 2014).

Pacientes com ELTM geralmente apresentam auras antes das crises focais simples ou complexas originadas em estruturas mesiais do lobo temporal. As auras são manifestações subjetivas que envolvem fenômenos sensoriais ou psíquicos (sensação de náusea, mal-estar, medo, depressão,

angústia, *déjà-vu*, e alucinações gustativas, olfativas, auditivas ou visuais) de curta duração (1 a 2 minutos) que ocorrem em até 90% dos pacientes previamente às crises epiléticas (Fernandes, 2013; Diehl; Duncan, 2015).

Além das crises epiléticas, muitos pacientes com ELT sofrem de outras alterações fisiológicas que podem ser consequências das alterações morfológicas e funcionais do lobo temporal, tais como, depressão, ansiedade e psicose, além do comprometimento das funções cognitivas, entre elas: atenção, memória, linguagem, organização espacial, execução e inteligência (Blümcke *et al.*, 1999; Chang; Lowenstein, 2003, Sloviter, 2005, Avoli *et al.*, 2005; Marcangelo; Ovsiew, 2007; Liu *et al.*, 2014;

1.4. Formação hipocampal na ELTM

Quando na descrição da estrutura anatômica, o termo hipocampo foi escolhido em 1587 por Julius Caesar, em comparação ao formato dessa estrutura com a de um cavalo marinho (*hippokampus* em grego) (Lewis, 1923) (Figura 1).



Figura 1. Comparação da formação hipocampal de humanos com o cavalo marinho (Fonte: google.com).

Em 1742, Garengoet, baseado na morfologia característica do hipocampo, chamou a parte mesial da estrutura de Corno de Ammon (CA), em homenagem ao chifre do deus egípcio Ammun Kneph (Lewis, 1923; Walther, 2002; Coras; Blümcke, 2015) (Figura 2).

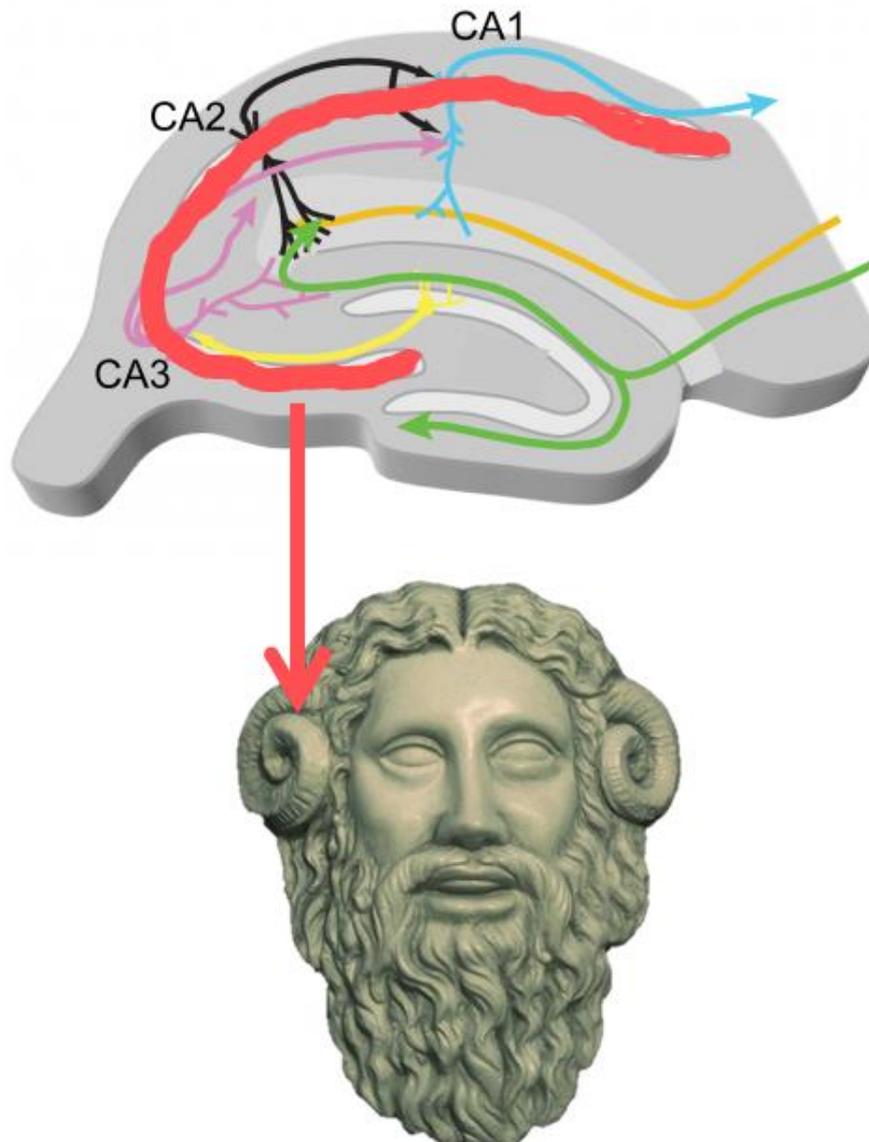


Figura 2. Esquema geral da formação hipocampal de camundongos, ilustrando o Corno de Ammon (CA). A seta indica a representação do chifre do deus egípcio Ammun Kneph, referente à região mesial do hipocampo (modificado de Brain Physiology Lab, 2015), chamada de corno de Ammon em sua homenagem.

Atualmente, a formação hipocampal é a estrutura mais estudada, tanto na epilepsia em humanos, quanto em modelos animais (Thom, 2014) e compreende quatro regiões corticais: o giro dentado (GD), o hipocampo propriamente dito, o complexo subicular e o córtex entorrinal (CE).

Essas regiões também apresentam camadas diversas. O giro dentado é subdividido em camada molecular, camada de células granulares e camada polimórfica (hilo). Os axônios de seus neurônios formam as fibras musgosas que se projetam até o CA3.

O hipocampo propriamente dito (*Corno de Ammon*) é composto por três regiões: CA3, CA2 e CA1 em mamíferos (humanos apresentam também a CA4), subdivididas em três camadas distintas: molecular, piramidal e granular (Scorza *et al.*, 2005; Coras; Blümcke, 2015).

Em relação à circuitaria, projeções glutamatérgicas do CE originam uma circuitaria trissináptica (Figura 3), que é uma via sequencial de sinapses glutamatérgicas excitatórias e consiste no principal caminho da excitabilidade neural na formação hipocampal (Scorza *et al.*, 2005; Barr *et al.*, 2006; Benes *et al.*, 2008; Goodrich-Hunsaker *et al.*, 2008; Van Strien *et al.*, 2009).

A circuitaria se inicia com a via perfurante, onde as células granulares do GD recebem aferências diretas do CE. A seguir, as células granulares projetam seus axônios (fibras musgosas) e fazem sinapse com as células piramidais de CA3 (Henze *et al.*, 2000; Urban *et al.*, 2001; Scorza *et al.*, 2005). A terceira sinapse acontece quando os colaterais de Schaffer (projeção de axônios das células piramidais da camada CA3 para o CA1) fazem contato com as células piramidais da CA1 (Urban *et al.*, 2001; Scorza *et al.*, 2005; Kesner, 2007).

Adicionalmente, a saída excitatória das células granulares do GD é controlada por células em cesto (neurônios GABAérgicos) que inibem tais células (Scorza *et al.*, 2005; Benes *et al.*, 2008). Especula-se que essas células inibitórias monitoram o fluxo de informação, evitando uma potencialização da excitação de maneira desnecessária, fenômeno presente em algumas situações patológicas, como a ELT (Spruston;McBain, 2007).

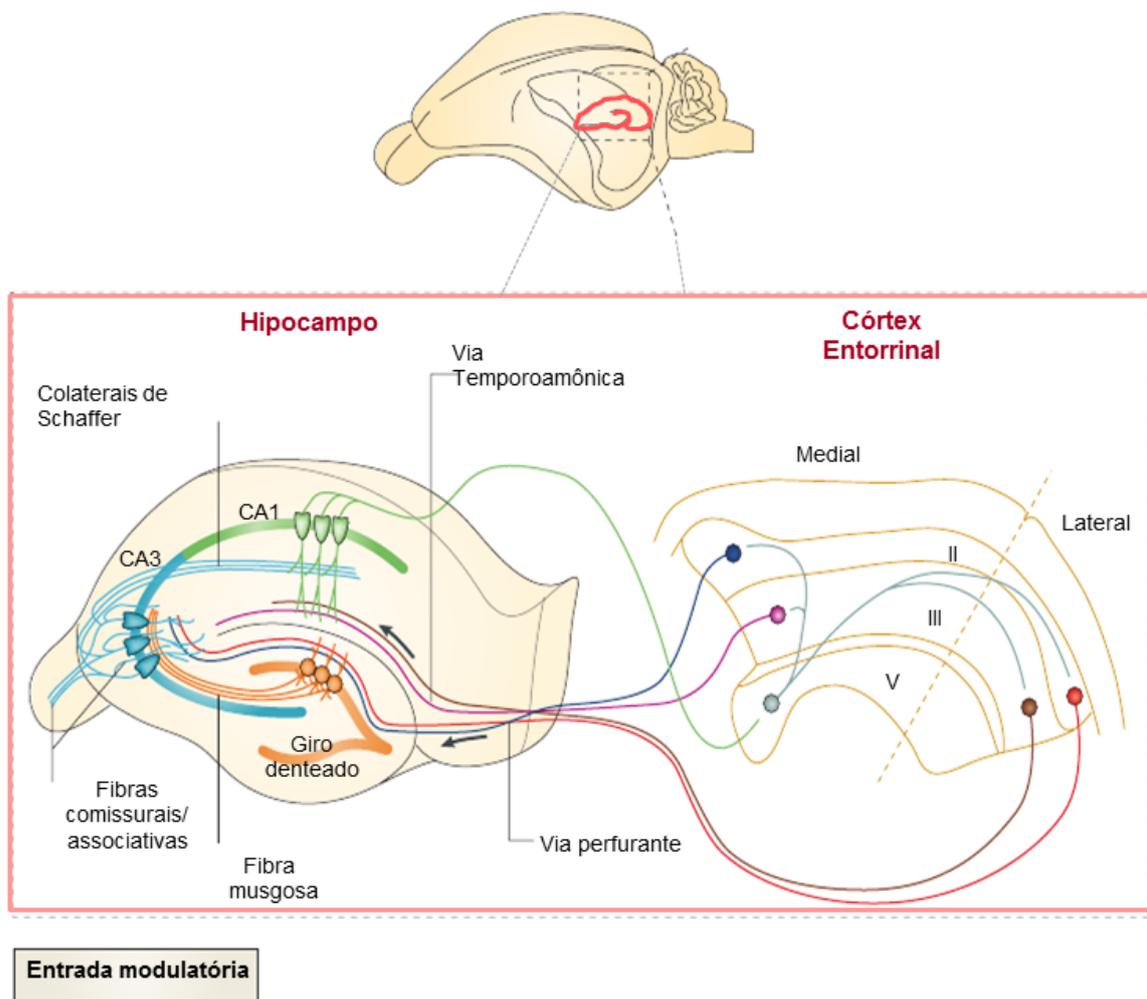


Figura 3. Conectividade básica na formação hipocampal em camundongo. Circuitaria trissináptica: A primeira sinapse é realizada por axônios da via perfurante, que transmitem informações dos neurônios da camada II do córtex entorrinal ao giro dentado. As fibras musgosas do giro dentado fazem a segunda sinapse com as células piramidais de CA3, que fazem a terceira sinapse com as colaterais de Schaffer na CA1 (modificado de Neves *et al.*, 2008).

1.5. Epileptogênese na ELTM

A epileptogênese é o processo neurobiológico pelo qual a epilepsia se desenvolve e que ocorre em decorrência de eventos desencadeados por um insulto ao encéfalo (Webster *et al.*, 2017). Estudos da epileptogênese na ELTM têm descritos diversos fatores que culminam com o seu surgimento. Esse fenômeno pode ser definido como o período entre o insulto e o aparecimento das primeiras crises espontâneas e abrange o processo em que todos os tipos de injúrias (crises febris prolongadas, AVE, infecções) ao encéfalo são capazes de gerar eventos que transformam a rede neuronal normal num circuito cronicamente hiperexcitável, e que induzirá o surgimento de crises epiléticas espontâneas (Acharya *et al.*, 2008).

Um dos importantes processos envolvidos na epileptogênese é o brotamento axonal desordenado. O brotamento axonal é um processo fisiológico normal que ocorre durante o desenvolvimento cerebral e importante para o surgimento de novas neuritos e sinapses, e que pode ocorrer como resposta a crises epiléticas.

Primeiramente, esse brotamento ocorre como uma resposta que visa reparar a morte de neurônios na formação hipocampal, no entanto, o brotamento aberrante de fibras musgosas é um componente crítico para o desenvolvimento de crises recorrentes em pacientes que apresentam esclerose hipocampal (Magloczky, 2010; Thom, 2014).

Em condições normais, as fibras musgosas das células granulares do GD projetam-se para as células piramidais do CA3, que é sua principal entrada excitatória, fazendo uma sinapse (Hamelin; Depaulis, 2015). Menos de 1% das fibras musgosas deixam suas projeções axonais na camada molecular do GD,

entretanto, na esclerose hipocampal, as fibras musgosas se projetam extensivamente para camada molecular do GD fazendo uma sinapse excitatória com as células granulares, criando um circuito local excitatório aberrante com potencial de sincronizar outros grupos neuronais. Esse processo de brotamento ocorre logo após uma crise e perda neuronal e as novas células contribuem significativamente para esse processo (Cameron *et al.*, 2011; Martinian *et al.*, 2012, Thom, 2014).

Nos últimos dez anos, têm-se demonstrado o papel das células da glia, especialmente dos astrócitos e da micróglia, no processo de epileptogênese. Em condições normais, essas células ficam perto dos neurônios, atuando na homeostase através da captação e liberação de potássio e glutamato liberados no espaço celular pelos neurônios, modulando a excitabilidade neuronal e a atividade sináptica (Seifert *et al.*, 2010; Cendes *et al.*, 2014; Hamelin; Depaulis, 2015).

Vários estudos têm demonstrado que os astrócitos estão envolvidos na epileptogênese através da liberação de glutamato que pode corroborar com a atividade sincronizada dos neurônios (Tian *et al.*, 2005; Seifert *et al.*, 2010; Hamelin; Depaulis, 2015), além de aumentar o fornecimento de glicose, sustentando a atividade epileptiforme (Rouach *et al.*, 2008; Seifert *et al.*, 2010; Cendes *et al.*, 2014; Hamelin; Depaulis, 2015).

Assim como os astrócitos, a micróglia é ativada em circuitos epiléticos após uma crise. Quando ocorre uma hiperativação e liberação de fatores tóxicos, como óxido nítrico, pode ocorrer um estresse oxidativo acima do normal, levando à morte de neurônios vizinhos (Thom, 2014; Depaulis, 2015).

Contudo, o papel das micróglia e astrócitos no processo epileptogênico, morte neuronal, manutenção da epilepsia e esclerose hipocampal permanece pouco estudado, apesar dessas células da glia estarem claramente envolvidas na duração das crises, assim como na excitabilidade neuronal (Dapaulis, 2015).

As crises epiléticas podem ser geradas tanto por mecanismos de reorganização axonal, como pela ausência de uma efetiva inibição, o que induz ao desequilíbrio e gerando alterações eletroclínicas nos pacientes. Na investigação diagnóstica, são utilizados exames para auxiliar na busca pelo foco epilético, especialmente o eletroencefalograma (EEG) (Neto *et al.*, 2006).

1.6. EEG na ELT

A atividade encefálica gera variações nos potenciais elétricos medidas no escalpo e estes podem ser detectados com o intuito de fornecer informações importantes sobre o estado funcional do órgão.

Em 1875, Richard Caton, um médico inglês, observou a presença de correntes elétricas no encéfalo. No entanto, o primeiro registro de EEG humano foi obtido somente em 1921, por um médico alemão Hans Berger, considerado o pai da Eletroencefalografia. Em 1934, o EEG tornou-se definitivamente uma técnica de investigação após Adrian e Matthews demonstrarem a veracidade dos registros e dos trabalhos de Berger (GEDDES e BAKER, 1989).

Antes do trabalho de Adrian e Matthews não estava claro a relação do padrão no EEG e a atividade cerebral. Esses pesquisadores publicaram relatórios detalhados que mostravam que o “rítmo Berger” era definitivamente de origem cortical (Collura, 1993).

O registro dos sinais elétricos indica que a atividade elétrica no encéfalo ocorre continuamente, e a intensidade e o ritmo destes sinais, dependem do nível global de atividade cortical (COSTA, 1994).

O EEG tem uma resolução temporal na faixa de milissegundos e mede diretamente a sinalização elétrica neuronal (Coito *et al.*, 2016), sendo caracterizado por uma aparente irregularidade, entretanto, vários padrões distintos de funcionamento cerebral normal foram identificados e receberam a designação de ritmos. Em especial podemos citar, o alfa (α) que varia de 8 - 13 Hz (oscilações por segundo), beta (β) 13 - 30 Hz, delta (δ) 1 - 4 Hz e teta (θ) 4 - 8 Hz (Poblet, 1988; Geddes; Baker, 1989; Clasadonte *et al.*, 2016).

Em pacientes com ELT, o registro é utilizado para identificar a atividade patológica, como picos interictais [aparecimento abrupto de pontas (eventos sincronizados com menos de 50ms) ou ondas agudas (50-200ms de duração), acompanhadas na maioria das vezes por ondas lentas], que podem ajudar na identificação da zona epileptogênica (Koi, 1966; Chatrian *et al.*, 1974; Gotman, 1980; Walczac; Jayacar; 1997; Brodbeck *et al.*, 2011).

No EEG de escalpo interictal de pacientes com ELT, anormalidades não epileptiformes podem aparecer com características de baixas frequências intermitentes, sendo detectadas nas faixas teta e delta sobre as regiões temporais méso-basais (Williamson *et al.*, 1993; Valença *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2013).

A presença de descargas interictais auxilia na confirmação do diagnóstico clínico da epilepsia e da síndrome epiléptica, além de fornecer informações para o planejamento da administração de medicamentos e de

candidatos à cirurgia para o controle das crises epiléticas (Ojemann; Angel; 1987).

Alguns pacientes apresentam um padrão de EEG interictais repetidamente normais. No entanto, o diagnóstico de ELTM não pode ser excluído (Valença *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2013), sendo que a repetição dos registros de EEG faz-se necessária para aumentar a acurácia diagnóstica (Salinsky *et al.*, 1987).

Como as crises epiléticas resultam de uma sincronia e descarga excessiva dos neurônios e são caracterizadas por alterações na atividade elétrica, elas podem ser registradas pelo EEG (Coito *et al.*, 2016) tanto em seres humanos, como em modelos animais de epilepsia.

1.7. Modelo Experimental de ELT

Desde 1937, modelos animais são o alicerce para a identificação de novas terapias para a Epilepsia (Bialer; White, 2010; Löscher; Schimidit, 2011; Löscher *et al.*, 2013; Löscher; White, 2015). Embora essa doença possa surgir a partir de diversas regiões cerebrais (foco epilético), a maioria dos estudos experimentais foca em modelos de ELT com esclerose hipocampal.

O grande interesse nesses modelos ocorre devido à ampla correspondência com a ELT em humanos, tanto na patologia que ocorre na formação hipocampal, como na ocorrência de crises espontâneas e recorrentes (CERs) (Sloviter; Bumanglag, 2013).

Em 2002, o *National Institute of Health* (NHI) e o *National Institute of Neurological Disorders and Stroke* (NINDS) recomendaram apenas dois grupos de modelos como ferramentas úteis no estudo e descoberta de novos

tratamentos para ELT: kindling e pós insulto induzido por *status epilepticus* (SE) (Stables *et al.*, 2002).

Nesse contexto, um dos modelos animais mais amplamente utilizados no estudo da ELT é o de CERs, pós insulto induzido quimicamente. O insulto é gerado por um SE, que é caracterizado por uma crise epiléptica ininterrupta, com duração maior ou igual a 30 minutos, ou crises repetidas de duração menor capazes de provocar uma condição duradoura e invariável, sem recuperação da consciência entre as crises (Scott, 2014; Cross, 2014).

A patofisiologia do SE ainda não está totalmente esclarecida, entretanto, acredita-se que o excesso de excitação mediada pelo neurotransmissor glutamato e uma diminuição da inibição normal mediada pelo GABA seja a causa mais provável para sua ocorrência (Reddy; Kuruba, 2013).

Entre os diferentes tipos de insultos iniciais para modelos pós SE, a utilização da pilocarpina (Figura 4) é o mais simples, viável, largamente utilizado e o que mais partilha semelhanças com a ELT em humanos (Turski *et al.*, 1983; Stables *et al.*, 2002; Müller *et al.*, 2009; Reddy; Kuruba, 2013; Römermann *et al.*, 2015). Isso ocorre porque a administração da pilocarpina induz crises e uma esclerose hipocampal similar à observada em pacientes com ELTM e tem sido extensamente utilizado no estudo e na busca por novos tratamentos (Müller *et al.*, 2009).

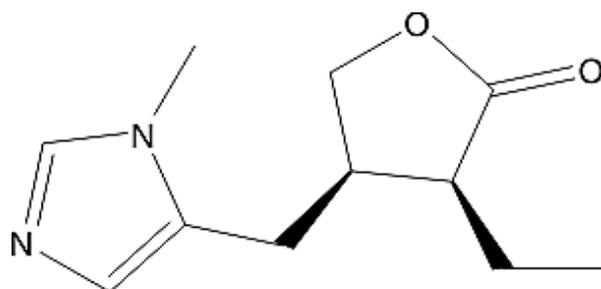


Figura 4. Estrutura química da pilocarpina ($C_{11}H_{16}N_2O_2$, Massa: 208.12). Disponível em: <http://www.basinc.com/library/presentations/biochem/sawyers03/>

A pilocarpina é um agonista colinérgico muscarínico extraída de uma planta brasileira, o *Pilocarpus jaborandi* (Figura 5). Quando aplicada sistêmica ou intracerebralmente leva a um quadro de SE, provocando no animal crises comportamentais contínuas e/ou repetidas sem completa recuperação neurológica entre as crises (Turski *et al.*, 1984; Turski *et al.*, 1986; Reddy; Kuruba, 2013; Römermann *et al.*, 2015).



Figura 5. *Pilocarpus jaborandi*. Disponível em: <http://www.engenhariadaSEsSEncias.com.br/site/modules.php?name=Conteudo&pid=1593>

Após a administração desse composto, ocorre uma hiperativação colinérgica, que ativa inicialmente receptores muscarínicos do tipo M1 (subtipo mais expresso na formação hipocampal, presente nas células granulares do GD e piramidais de CA1 e CA3 e alguns interneurônios), que ativam neurônios excitatórios glutamatérgicos, produzindo um desequilíbrio entre a transmissão excitatória e inibitória, gerando um quadro de SE (Hamilton *et al.*, 1997; Scorza, 2005; Reddy; Kuruba, 2013; Römermann *et al.*, 2015).

Similar à ELTM em humanos, esse modelo compreende três períodos para o desenvolvimento da epileptogênese: insulto inicial, período latente e

período crônico, onde se observa o aparecimento de CERs (Reddy; Kuruba, 2013) (Figura 6).

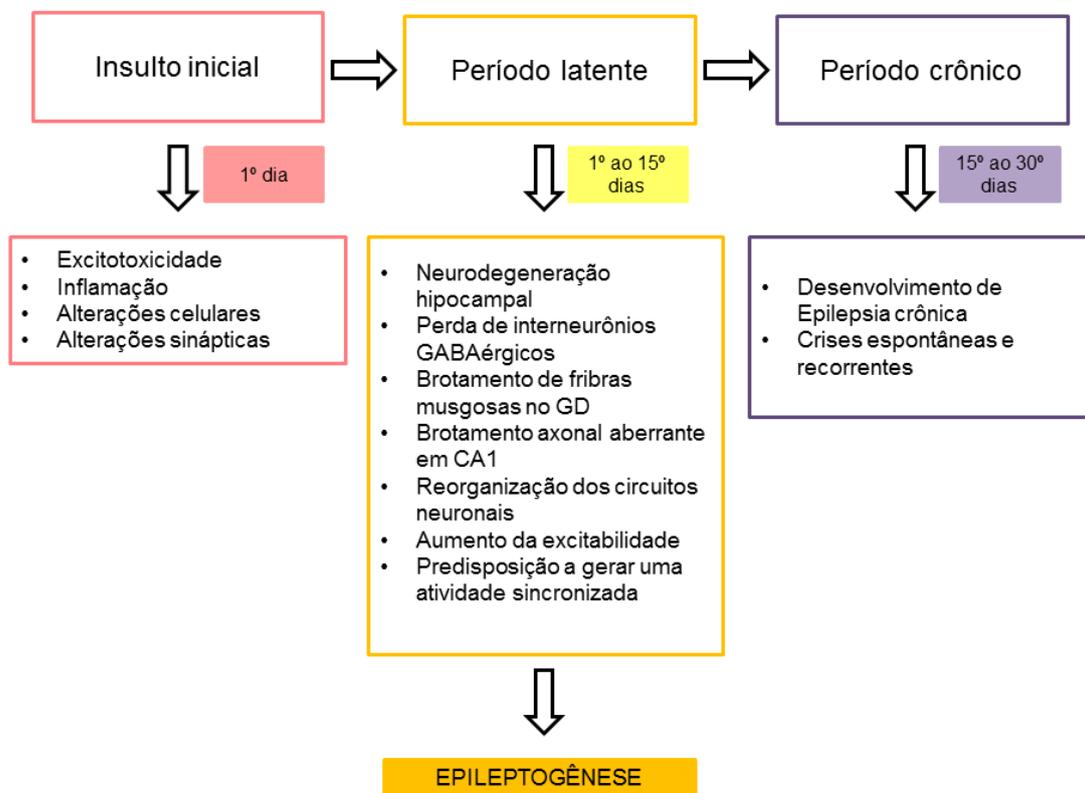


Figura 6: Etapas de efeitos patofisiológicos na epileptogênese envolvida no modelo de ELT em camundongos induzido por pilocarpina.

O Insulto inicial do modelo ocorre pela injeção sistêmica de pilocarpina que leva a um quadro de SE e pode ser mantido por um período variável de tempo (90 a 240 minutos). Uma vez que o animal não se restabelece do SE espontaneamente, tais crises são geralmente abortadas com o uso de um anestésico geral (Tiopental sódico®) ou benzodiazepínico (Diazepam®).

Após o período de latência, sem a presença de alterações comportamentais e com duração média de 14 dias (período latente) (Fernandes, 2013), o cérebro normal se torna epilético e o animal começa a

apresentar crises espontâneas que ocorrem durante toda a vida (período crônico) (Cavalheiro *et al.*, 1991; Scorza *et al.*, 2005).

Danos nas regiões da formação hipocampal e ao redor dessa região, assim como alterações comportamentais e cognitivas, que se assemelham às crises parciais complexas e à patologia associada à esclerose hipocampal encontrada em pacientes com ELT, são observadas durante o período crônico (Stables *et al.*, 2002; Reddy; Kuruba, 2013; Liu *et al.*, 2014).

Logo, o período crônico caracteriza-se pelo surgimento de CERs que variam desde automatismos faciais, clonias de patas anteriores e posteriores, elevação e perda do equilíbrio, até crises clônicas generalizadas com durações variáveis (40-60 segundos/crise).

Segundo Heng e colaboradores (2013), camundongos machos pesando entre 20-25g são mais propensos a desenvolver o SE, além de terem uma taxa maior de sobrevivência ao insulto inicial. Além disso, as crises ocorrem, com maior frequência, durante o período diurno (Cavalheiro *et al.*, 1991; Arida *et al.*, 1999).

O modelo de SE possibilita o estudo para o desenvolvimento de novos fármacos antiepilépticos mais efetivos, uma vez que ainda não foi possível a oferta de novos compostos com alta eficácia para a ELT, onde apenas 11% dos pacientes apresentam a remissão das crises (Bialer; White, 2010).

Uma abordagem mais direcionada para o tratamento de epilepsias fármaco-resistentes é extremamente necessária (Kwan *et al.*, 2011). Além disso, existe uma grande necessidade em buscar novas alternativas que possam gerar medicamentos mais eficazes e com menos efeitos adversos. Nos últimos anos, diversos compostos isolados da peçonha de vespas com

atividade no SNC de mamíferos têm sido descritas, especialmente os peptídeos (Mortari *et al.*, 2007).

1.8. Peptídeos neuroativos identificados na peçonha de vespas sociais

As peçonhas de insetos vêm sendo utilizadas desde 3000 a.C pela medicina tradicional chinesa e coreana, e também por civilizações egípcias e gregas, com o intuito de controlar várias doenças, entre elas, as neurológicas (Pemberton , 1999; Adewole *et al.*, 2013; Bogdanov, 2015; Silva *et al.*, 2015).

Nos últimos anos, o interesse nas moléculas biologicamente ativas presentes na peçonha de animais teve um grande crescimento, especialmente na procura por novos medicamentos baseados nessas peçonhas (Silva *et al.*, 2015).

A peçonha de vespas já é reconhecida por conter moléculas neuroativas, com grandes potenciais para o desenvolvimento de novos fármacos e também como possíveis ferramentas farmacológicas, que visam auxiliar o estudo das funções normais e patológicas do sistema nervoso (Mortari *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2015).

Entre as moléculas neuroativas presentes na peçonha de vespas sociais, os peptídeos destacam-se, pois representam aproximadamente 70% da peçonha bruta seca (Dohtsu *et al.*, 1993; Dias *et al.*, 2014). Atualmente, esses peptídeos têm sido divididos quanto à sua função biológica em antimicrobianos, quimiotáticos, inflamatórios e neuroativos.

Os estudos de peptídeos neuroativos têm sido pouco explorados, uma vez que, sua porcentagem na peçonha é pequena em comparação com os peptídeos antimicrobianos. Além disso, apenas na última década, a primeira

descrição da potencialidade da peçonha de vespas sociais para a obtenção de compostos antiepilépticos foi realizada (Mortari *et al.*, 2007a).

Em 2005, Cunha e colaboradores demonstraram que a peçonha desnaturada da vespa *Polybia ignobilis* protegeu os animais contra crises induzidas pelos epilépticos padrões bicuculina, picrotoxina e ácido caínico.

Em 2012, Couto e colaboradores demonstraram um efeito antiepiléptico da fração de baixa massa molecular da vespa social *Polybia paulista* no modelo de indução de crises por pentilenotetrazol (PTZ).

Mortari e colaboradores (2005) demonstraram também, que a peçonha desnaturada da vespa social *Polybia occidentalis* (Figura 7), quando injetada intracerebroventricularmente (i.c.v.) em ratos, era capaz de proteger os animais contra crises epilépticas induzidas pelos epilépticos químicos padrões: bicuculina, picrotoxina, ácido caínico e PTZ.



Figura 7. Exemplar da vespa social *Polybia occidentalis*. Disponível em: <http://biogeodb.stri.si.edu/bioinformatics/dfm/metas/view/30677>.

A partir destes últimos dados, foi feito o isolamento e a caracterização estrutural de um novo peptídeo antiepiléptico, denominado Occidentalina-1202

(OcTx-1202) (Mortari, 2007b), sendo formado por nove resíduos de aminoácidos (Glu-Gln-Tyr-Met-Val-Ala-Phe-Trp-Met-NH₂) (Figura 8).

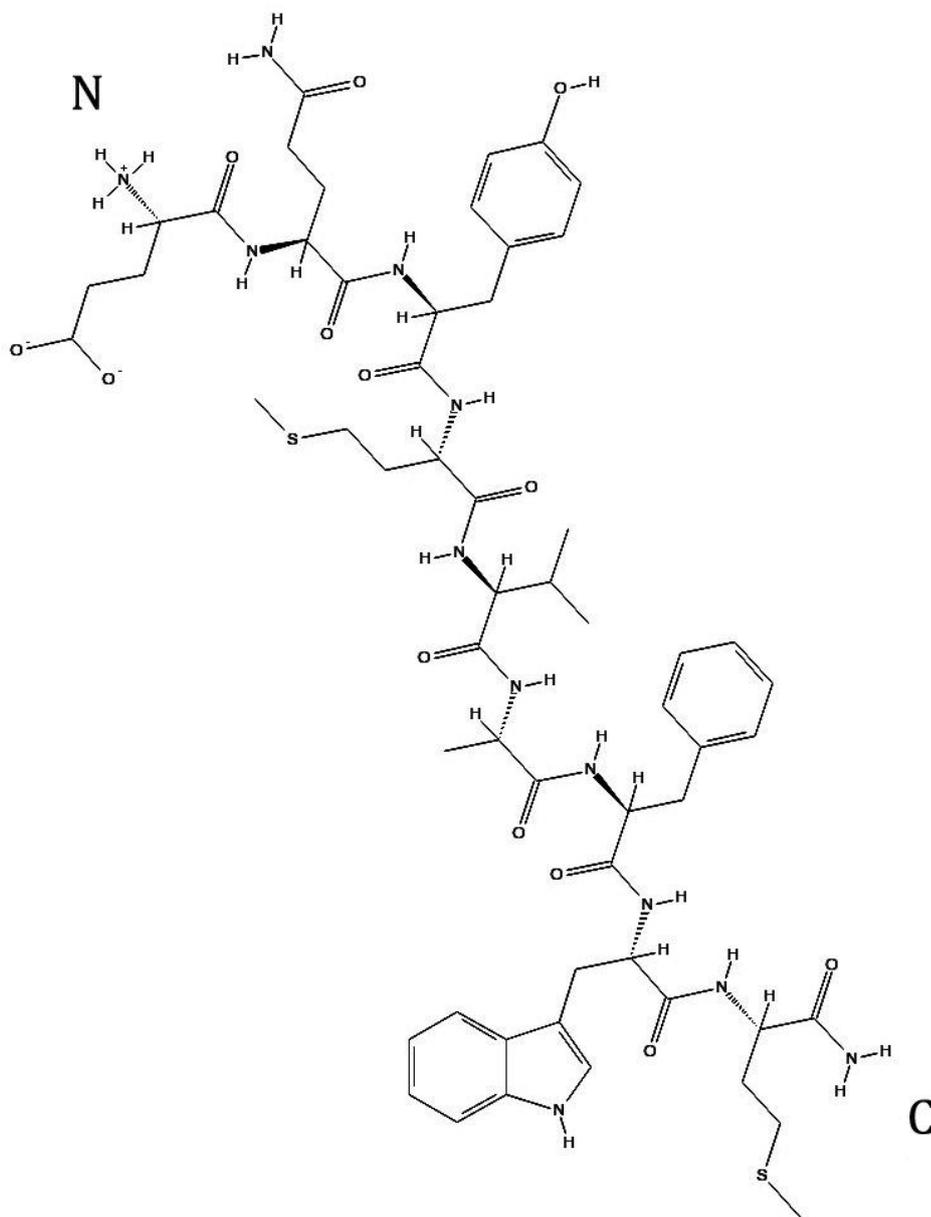


Figura 8. Fórmula estrutural da Occidentalina-1202. Massa molecular de 1202 Da e nove resíduos de aminoácidos: E-Q-Y-M-V-A-F-W-M. (Representação estabelecida por Solange Rego, 2012).

Quando avaliado em modelos de crises epiléticas, esse peptídeo promoveu um potente efeito antiepilético no teste de indução aguda de crise com ácido caínico (DE₅₀ - dose que protege 50% dos animais = 0.6 µg/rato, via

i.c.v.) e PTZ ($DE_{50} = 4.5 \mu\text{g/rato}$, via i.c.v.). Além disso, nas doses em que ocorreram crises, as latências para o início das crises foram significativamente aumentadas (Mortari, 2007b).

Com o intuito de melhorar a eficiência do peptídeo Occidentalina-1202 e a biodisponibilidade no SNC de mamíferos, um novo peptídeo, chamado de Neurovespina, foi desenhado, sintetizado e teve sua ação antiepiléptica avaliada. Os dados de sua sequência peptídica ainda não podem ser revelados devido ao sigilo exigido pelo Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI).

Em 2014, a patente desse composto foi depositada com o título: “Peptídeo modificado da peçonha de vespa social e seu uso como antiepiléptico e neuroprotetor” (*). Número do registro: BR1020140047280.

1.9. O peptídeo neurovespina no tratamento da Epilepsia

Primeiramente, a neurovespina foi avaliada em um modelo agudo de crise epiléptica. Os resultados revelaram que a neurovespina, quando injetada via i.c.v. e via intraperitoneal (i.p.), apresentou uma potente atividade antiepiléptica contra crises induzidas pelo epiléptico padrão ácido caínico.

Além disso, o peptídeo também apresentou um efeito neuroprotetor indireto, ou seja, não houve alteração na expressão da proteína c-fos (marcador de hiperativação neuronal) na formação hipocampal, nas maiores doses avaliadas, e houve uma redução da expressão dessa proteína nas camadas CA1 e CA3 da formação hipocampal, nas menores doses avaliadas (Dos Anjos, 2013).

Tais resultados fizeram da neurovespina um composto com alto interesse farmacológico, sendo alvo de grande interesse para o desenvolvimento de um novo medicamento para o tratamento da epilepsia.

No entanto, os dados obtidos foram realizados apenas em modelos agudos, não apresentando total equivalência à principal epilepsia que atinge os humanos, a ELT, caracterizada por CERs. Ademais, a busca por novos antiepiléticos deve levar em consideração os efeitos de toxicidade, visando à segurança farmacológica do composto.

(*) 2014, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020140047280, data de depósito: 27/02/2014, Instituição de registro: Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- ✚ Avaliar a atividade antiepiléptica e neuroprotetora do peptídeo neurovespina no modelo crônico de Epilepsia do lobo temporal (ELT) pela indução de *status epilepticus* (SE).

2.2. Objetivos específicos

- ✚ Avaliar o efeito antiepiléptico do peptídeo neurovespina injetado por via i.p. no modelo crônico de ELT pós insulto por pilocarpina em camundongos.
- ✚ Definir a DE_{90} , assim como a curva dose-resposta, utilizando o modelo crônico de ELT após avaliação da atividade antiepiléptica.
- ✚ Avaliar o efeito neuroprotetor do peptídeo neurovespina injetado por via i.p. no período latente do modelo crônico de ELT pós insulto por pilocarpina em camundongos.
- ✚ Realizar a avaliação do efeito neuroprotetor em diferentes regiões da formação hipocampal: giro denteado, CA3 e CA1, através da coloração de Nissl (Cresil Violeta), após avaliação da atividade antiepiléptica e neuroprotetora.
- ✚ Avaliar os registros eletroencefalográficos, através de um sistema de video-EEG, durante a fase I do tratamento, após a administração i.p. da DE_{90} do peptídeo neurovespina utilizando o modelo crônico de ELT induzido por pilocarpina em camundongos.

- ✚ Realizar estudos de toxicidade, após a administração de diferentes doses do peptídeo neurovespina, através dos testes de citotoxicidade, genotoxicidade e hematotoxicidade.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Síntese e avaliação do grau de pureza do peptídeo Neurovespina

O peptídeo neurovespina foi sintetizado pela empresa Aminotech Pesquisa e Desenvolvimento LTDA, utilizando a técnica de síntese em fase sólida – Fmoc. A confirmação do grau de pureza, a inspeção da massa monoisotópica e a confirmação da sequência do peptídeo foi realizado pela empresa responsável pela síntese e antes do início dos experimentos. Além disso, alíquotas do peptídeo foram submetidas às análises citadas a cada seis meses a fim de monitorar e garantir a estabilidade do composto em estudo.

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

3.2. Bioensaios

O manuseio dos animais experimentais procedeu em pleno acordo com a **Lei nº 11.794/2008**, mais conhecida como Lei Arouca, que regulamenta o uso de animais em pesquisa. Além disso, os princípios éticos do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) foram rigorosamente seguidos. O projeto foi aprovado pela Comissão de ética em uso animal (CEUA) da UnB, processo de número 139668/2014 (anexo 1) e autorizado pelo Conselho de gestão do patrimônio genético (CGEN) (010476/2013-0) (anexo 2).

3.3. Animais experimentais

Para proceder com a realização dos experimentos, foram utilizados camundongos *Swiss* machos, com 5 a 6 semanas de idade, pesando entre 17 e 23 g (n=6-8/grupo) obtidos do biotério do Instituto de ciências biológicas da Universidade de Brasília. Os animais foram mantidos no biotério em condições controladas: oito animais experimentais por caixa de polipropileno (41x34x16cm - comprimento x largura x altura), ciclo claro/escuro de 12/12 horas, temperatura de 25°C e umidade de 55%. Além disso, água e alimentação (ração específica para camundongos – Labina) *ad libitum* ficaram disponíveis durante todo o período experimental. Para identificar os sujeitos experimentais, utilizou-se caneta permanente para marcar a cauda e o dorso.

3.4. Avaliação do efeito antiepiléptico do Neurovespina no modelo crônico de ELT pós-insulto por pilocarpina

Para avaliar o efeito antiepiléptico do peptídeo neurovespina, empregamos o modelo crônico de ELT, com indução de crises por pilocarpina. Este modelo é subdividido em três etapas (Figura 9): insulto inicial, que é induzido pela administração sistêmica do agonista colinérgico (pilocarpina). Após alguns minutos, os animais começam a apresentar sinais de estimulação colinérgica além de respostas comportamentais estereotipadas que progridem para o quadro de *status epilepticus* (SE).

Após 180 minutos de SE, os animais recebem uma administração sistêmica de barbitúrico com o intuito de cessar o quadro de crises ininterruptas geradas pelo SE. Os sujeitos experimentais que sobreviveram ao insulto inicial (aproximadamente 50% dos animais morrem) passam para o período latente, onde ocorre o início da epileptogênese, e a partir do 15º dia começa o período crônico, onde os camundongos começaram a apresentar crises espontâneas e recorrentes (CERs).

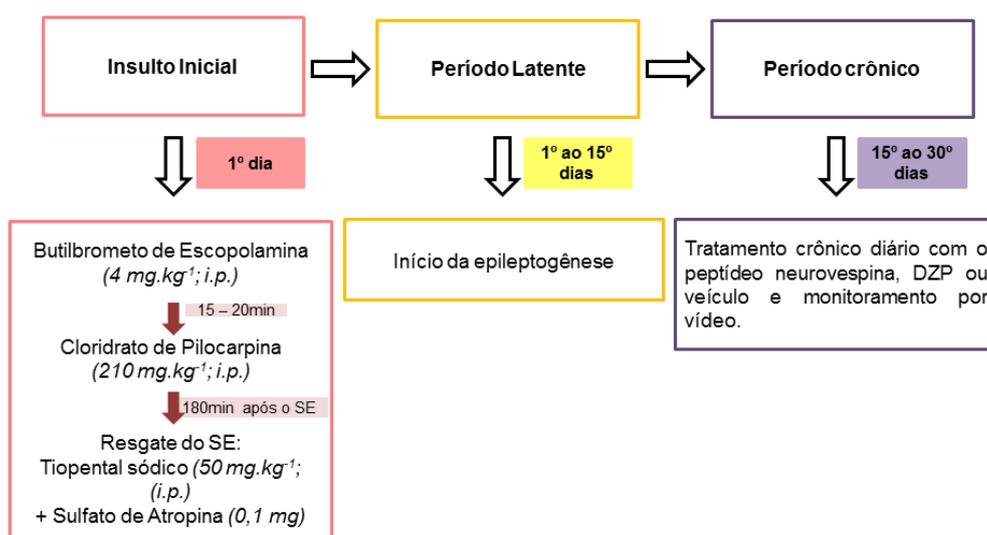


Figura 9. Desenho esquemático ilustrando cada etapa do modelo crônico de ELT induzida por pilocarpina.

3.4.1. Indução do Insulto inicial (SE)

Para estabelecer um insulto inicial, primeiramente, os animais foram pesados e recebiam uma injeção intraperitoneal (i.p.) do antagonista colinérgico butilbrometo de escopolamina (4mg.Kg⁻¹; Boehringer Ingelheim, Brasil) visando prevenir os efeitos periféricos da pilocarpina e reduzir a mortalidade e morbidade dos sujeitos experimentais, devido a paradas cardiorrespiratórias..

Após 15-30 minutos dessa injeção, foi administrado o cloridrato de pilocarpina (210 mg.Kg⁻¹; SigmaAldrich®, EUA) solubilizado em salina (NaCl 150 mM), e em seguida, os camundongos permaneceram em observação e seus comportamentos foram monitorados. A dose de pilocarpina foi estabelecida em ensaios prévios, sendo selecionada a dose capaz de induzir crises epiléticas ininterruptas com a menor taxa de mortalidade.

O critério de definição do SE (tabela 4) foi baseado na classificação de crises límbicas de Racine (1972), modificada por Shibley e Smith (2002), e corresponde ao momento em que o animal começou a apresentar crise de classe ≥ 4 ininterrupta, com duração maior ou igual a 30 minutos ou crises repetidas de duração menor, sem recuperação entre as crises (Scott, 2014; Cross, 2014). Essa classificação também será usada para avaliação de CERs durante o período crônico.

O SE foi interrompido 180 minutos após o início das crises através da administração de tiopental sódico (40 mg.Kg⁻¹; Cristália, Brasil), diluído em solução salina (NaCl 150mM), e de sulfato de atropina (0,1 mg/animal, i.p.; Hypofarma, Brasil). Os sujeitos experimentais permaneceram no biotério nas

condições de bem-estar supracitadas anteriormente durante os 15 dias subsequentes ao SE (período latente).

Tabela 4. Classificação das crises límbicas induzidas por pilocarpina de acordo com o índice de Racine (1972), modificado por Shibley e Smith (2002).

Classe	Comportamento
1 e 2	Automatismos faciais, enrijecimento da cauda, tremores
3	Crises tônico-clônicas pouco intensas marcadas por mioclonias unilaterais dos membros anteriores e os demais comportamentos das classes 1 e 2
4	Crises mioclônicas bilaterais dos membros anteriores com elevações e manifestações da classe 3
5	Crises mioclônicas bilaterais dos membros anteriores e posteriores com perda transitória do controle postural (crise generalizada)

3.4.2. Grupos experimentais submetidos ao protocolo experimental para avaliação da atividade antiepiléptica

Os sujeitos experimentais submetidos ao protocolo para avaliação da atividade antiepiléptica foram divididos em seis grupos independentes:

- ✚ Grupo sadio (salina) (n=7): animais não submetidos ao insulto inicial e tratados com solução salina (NaCl 150mM) por via i.p. (100µL/animal). Esse grupo não apresenta CERs e corresponde ao grupo controle saudável.
- ✚ Grupo epiléptico (n=8): animais submetidos ao insulto inicial, que desenvolveram o SE e foram tratados com solução salina (NaCl 150 mM) por via i.p. (100µL/animal). Esse grupo representa os animais que apresentam as CERs e corresponde ao grupo controle negativo.

- ✚ Grupo neurovespina (n=7-8 por grupo, N total = 22): animais submetidos ao insulto inicial, que desenvolveram o SE e foram tratados com três doses independentes do peptídeo neurovespina: 1, 2 ou 4mg/Kg, solubilizada na hora do uso em 10% de DMSO (Sigma-Aldrich, Alemanha) em solução salina (NaCl 150mM), administradas por via i.p. (100µL/animal).
- ✚ Grupo diazepam (DZP) (n=7): animais submetidos ao insulto inicial, que desenvolveram o SE e foram tratados com Diazepam (Compaz®; 4mg/kg, i.p, 100µL/animal; Cristália, Brasil). Esse grupo representa o controle positivo.

3.4.3. Tratamento no período crônico

Quinze dias após os animais (grupos epilético, neurovespina e diazepam) terem sido submetidos ao insulto inicial, que configura o início do período crônico (15^o ao 30^o) dia, foi realizado o tratamento dos sujeitos experimentais.

Para essa etapa, diariamente, os animais foram pesados e recebiam uma injeção por via i.p de salina (150 mM), neurovespina (doses 1, 2 ou 4mg/Kg) ou Diazepam (4mg/Kg) e foram monitorados utilizando uma câmera filmadora (Sony®, Câmera Gravadora de Vídeo Digital DCR-SR47, Brasil), instalada acima da caixa dos sujeitos experimentais (Figura 10), a uma distância aproximada de 50 cm, no próprio biotério, sempre iniciando às 8h, por um período de 9 horas/dia, para observação de CERs.

Os animais do Grupo sadio não sofreram o insulto inicial, mas foram submetidos ao mesmo protocolo de tratamento.



Figura 10. Câmera de vídeo dos sujeitos experimentais, no próprio biotério, para observação de CERs, no período crônico do modelo.

3.4.4. Avaliação das crises espontâneas e recorrentes

Após o término dos 15 dias no período crônico, a quantificação das CERs em cada grupo experimental foi contabilizada em relação ao tempo (em segundos), ao número e a categorização das crises apresentadas segundo a tabela 4 (classe 1 a 5).

Os resultados das análises de CERs foram apresentados sobre diferentes perspectivas: quantificação total de CERs (todas as horas de CERs

da filmagem no período crônico - 120 horas) e uma quantificação temporal em cada um dos 15 dias de tratamento. Além disso, para detectar um possível efeito da eliminação do peptídeo pelo organismo antes do fim do período de filmagem diário, a quantificação total e temporal foi dividida em duas fases: Fase I (uma até cinco horas após o tratamento) e Fase II (cinco a nove horas após o tratamento).

3.5. Determinação da DE₉₀

O cálculo da DE₉₀ foi realizado a partir da curva dose-resposta do efeito antiepiléptico obtido durante o tratamento com o peptídeo neurovespina no período crônico do modelo. Essa é a dose que foi utilizada para obtenção dos padrões epileptiformes por Vídeo-EEG.

3.6. Avaliação dos padrões epileptiformes por Vídeo-EEG

3.6.1. Procedimento experimental para a implantação dos eletrodos

Para avaliar o efeito antiepiléptico do peptídeo neurovespina através de registros amostrais da atividade epileptiforme por vídeo-EEG, também foi aplicado o modelo crônico de ELT, com indução de crises epiléticas por pilocarpina, subdividido em três períodos: insulto inicial, período latente e período crônico (Figura 11).

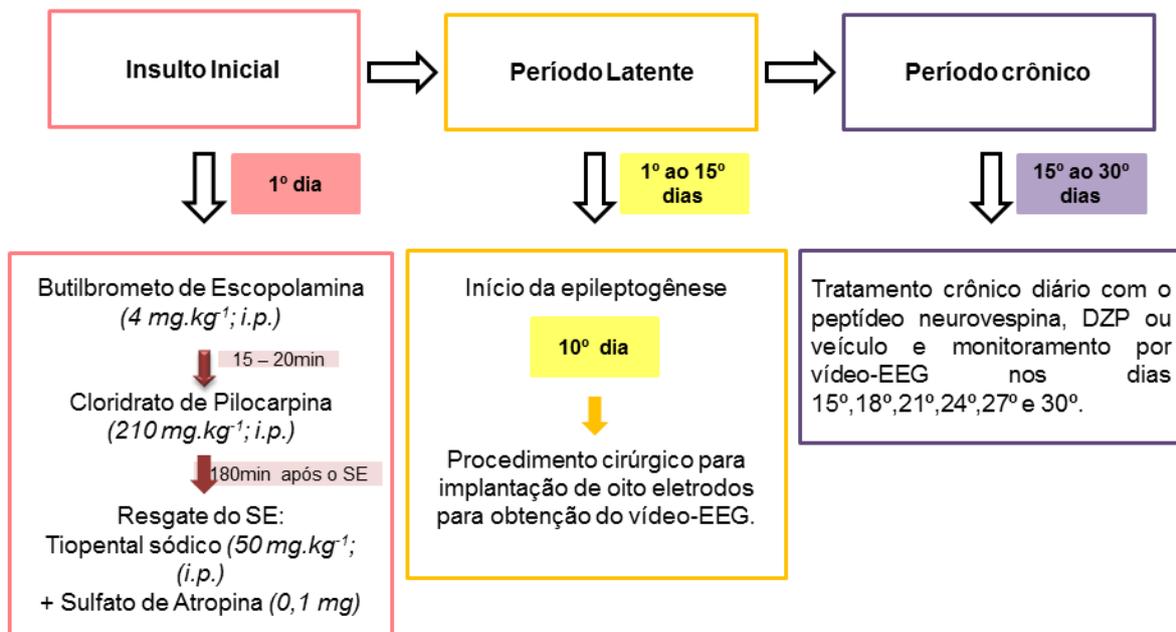


Figura 11. Desenho esquemático ilustrando cada etapa do modelo crônico de ELT induzida por pilocarpina para obtenção dos registros eletroencefalográficos.

No décimo dia do período latente, os animais foram anestesiados via i.p. com cloridrato de quetamina (75 mg.Kg^{-1} ; Ceva, Brasil.) e cloridrato de xilazina (15 mg.Kg^{-1} ; Ceva, Brasil), diluídas em solução fisiológica (150 mM), e fixados em um estereotático (Insight Equipamentos®, Brasil). Uma injeção local de lidocaína (30 mg.mL^{-1} , Dentsply Pharmaceutical, Brasil) foi administrada e após assepsia com iodopolividona 10% (Vic Pharma®, Brasil), foi realizada a tricotomia da cabeça, sendo, a seguir, o crânio do animal exposto para a implantação dos eletrodos, tendo como base o bregma, de acordo com o Atlas Estereotático de Paxinos & Watson (2001).

Pares de três eletrodos foram implantados nos córtices cerebrais e um par de eletrodos intrahipocampais foi implantado profundamente no tecido encefálico (Figura 12).

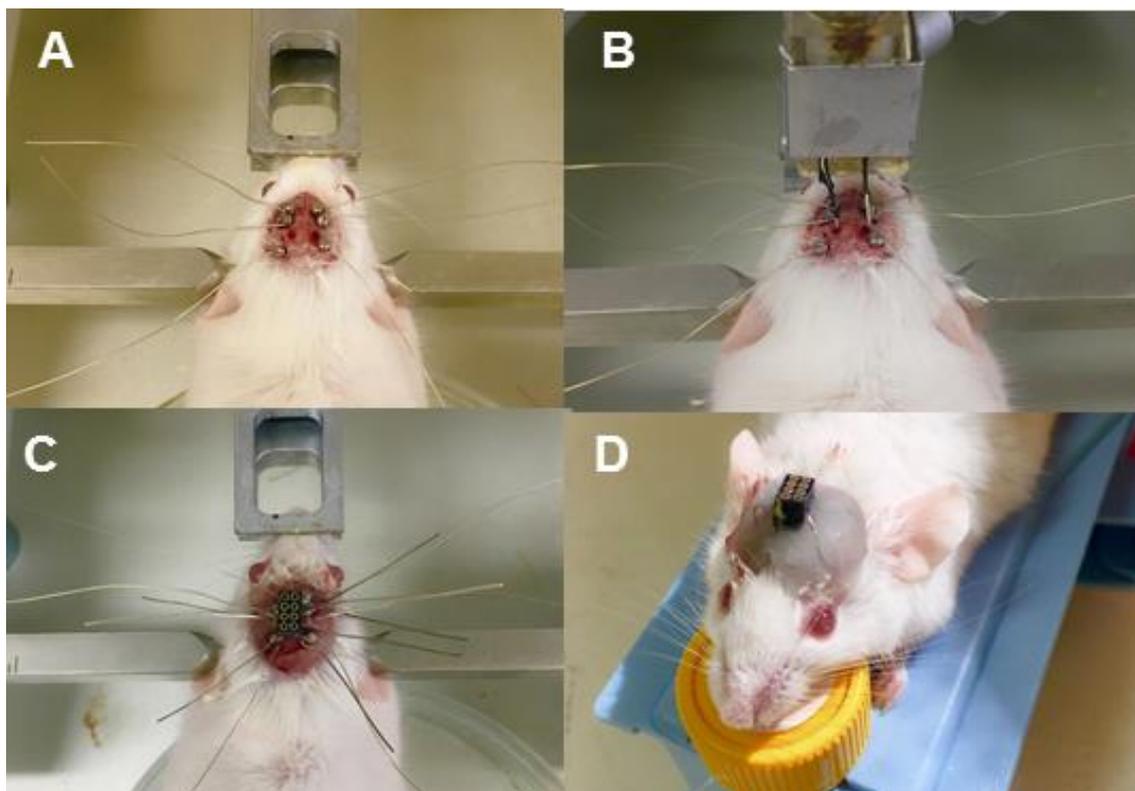


Figura 12. Etapas da implantação dos eletrodos para registro de vídeo-EEGs. (A) Superfície dorsal com os eletrodos corticais implantados. (B) Eletrodos corticais e intrahipocâmpais implantados. (C) Conector posicionado para conexão aos fios dos eletrodos. (D) Conector acoplado aos eletrodos e selado com resina acrílica.

Os eletrodos corticais eram constituídos por parafusos estéreis acoplados a fios condutores de 5 cm de comprimento (8403, Pinnacle Technologies, EUA) (Figura 13A) e os eletrodos intrahipocâmpais eram formados por fios de prata revestidos com material isolante (AGW1510, WPI – World Precision Instruments, EUA).

Ao final do procedimento, todos os fios dos parafusos e dos eletrodos intrahipocâmpais foram conectados aos oito pinos de um conector (8415-SM, Pinnacle Technologies, EUA) (Figura 13B) que foi fixado acima do crânio do animal com resina (Dentbras®, Brasil) polimerizada com líquido acrílico (Dentbras®, Brasil).

Uma pomada tópica de sulfato de neomicina e bacitracina (5 mg.g-1 e 250 UI.g-1; Medley, Brasil) foi aplicada ao redor do capacete de resina, auxiliando na cicatrização e impedindo infecções locais. Os animais ficaram em observação por 6 horas após a cirurgia e depois foram acondicionados no biotério (2 animais por caixa). Cinco dias após esse procedimento, os animais foram submetidos aos tratamentos no período crônico e a obtenção do vídeo-EGG.

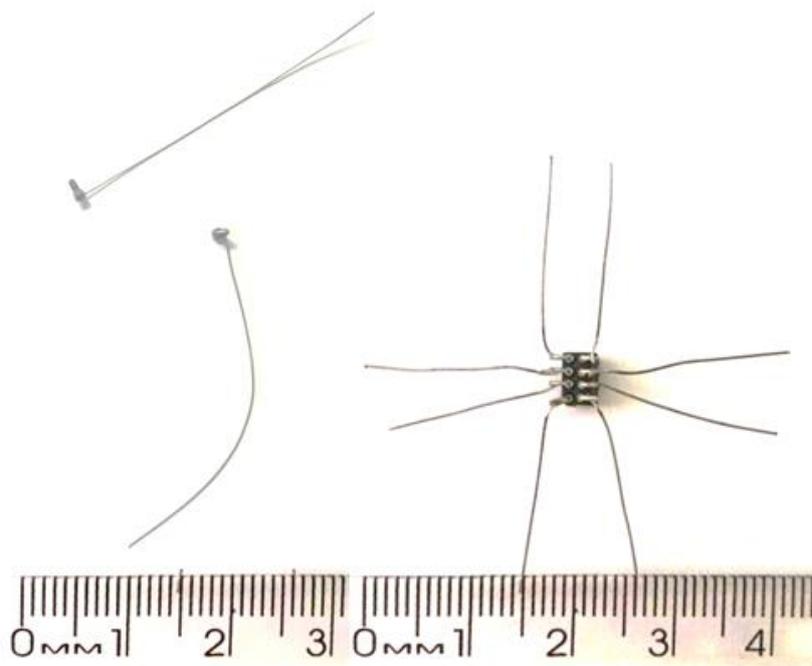


Figura 13. (A) Eletrodos corticais. (B) Conector de oito pinos com fios de prata soldados aos pinos visando garantir melhor contato com os eletrodos. Esses componentes foram adquiridos da Pinnacle Technologies para aquisição do vídeo-EEG.

Em relação à inserção dos eletrodos corticais, eles foram chamados de pontos frontais, pontos parietais e pontos occipitais.

Os pontos frontais correspondem aos dois eletrodos do córtex motor primário, onde um deles está posicionado no hemisfério esquerdo (eletrodo referência: *Shared/EEG Common*) e o outro, no hemisfério direito (eletrodo

terra: AGND) que é o encarregado em diminuir os ruídos externos e os movimentos dos animais. Os pontos parietais correspondem aos dois eletrodos implantados no córtex somatossensorial primário e os pontos occipitais são os dois eletrodos colocados no córtex visual primário. Cada eletrodo, de cada par, foi colocado em um hemifériso.

Os eletrodos intrahipocampais foram implantados no extrato de células piramidais da camada CA1 da formação hipocampal, cada um em um hemisfério.

O local para o posicionamento de cada eletrodo para obtenção dos registros está demonstrado na figura 14 e as medidas de referência encontram-se descritas na tabela 5.

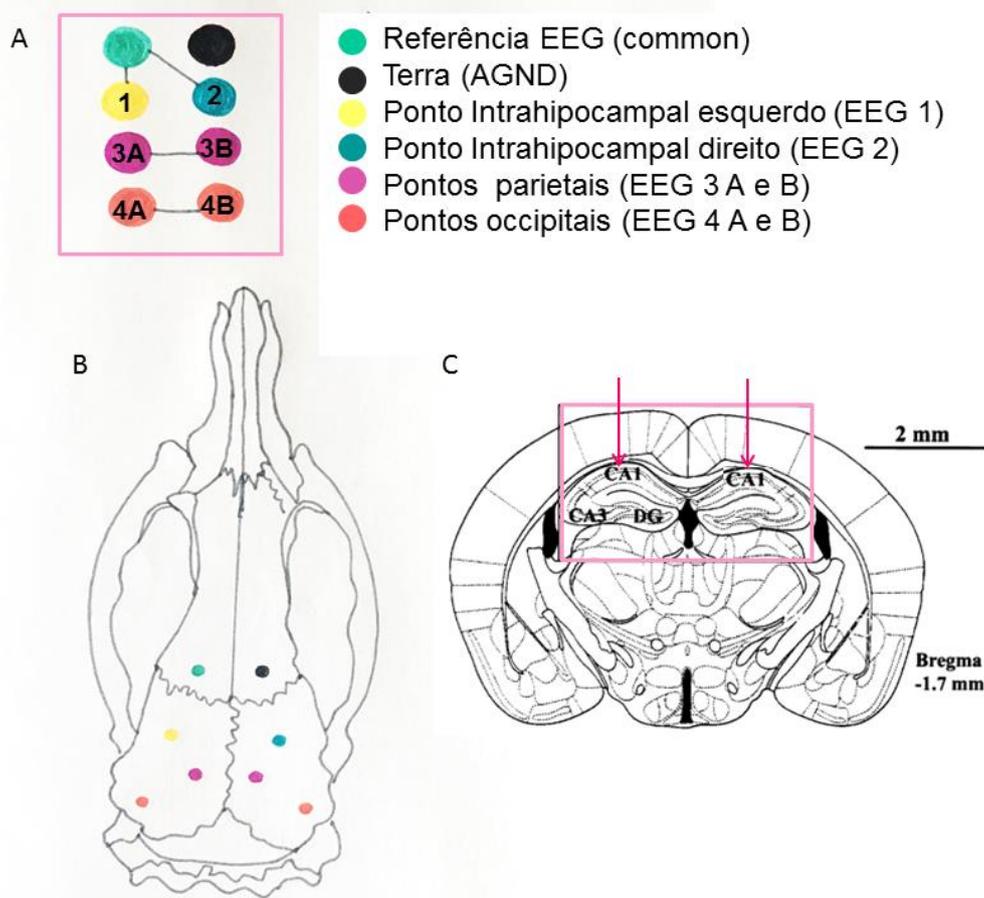


Figura 14. Delineamento esquemático do posicionamento dos eletrodos e do conector para os registros de video-EEGs em camundongos (modificado de Gomes, 2015). (A) Protótipo de configuração do conector a ser acoplado aos

eletrodos para obtenção dos registros EEGs. (B) Superfície dorsal do crânio de camundongo com indicação dos locais de implante. (C) Local de implantação dos eletrodos intrahipocampais nas CA1, modificada do Atlas Estereotático de Paxinos & Franklin (2001).

Tabela 5. Medidas de referência para posicionamento dos eletrodos corticais e intrahipocampais em camundongos (*Swiss*) segundo o Atlas Estereotático de Paxinos & Franklin (2001).

	Mesolateral	Anteroposterior	Dorsoventral
Frontais	± 1,5 mm	+ 1 mm	-
Intrahipocampais	± 2 mm	- 1 mm	-1,3mm
Parietais	±1,8 mm	- 2,2 mm	-
Occipitais	± 3 mm	- 3 mm	-

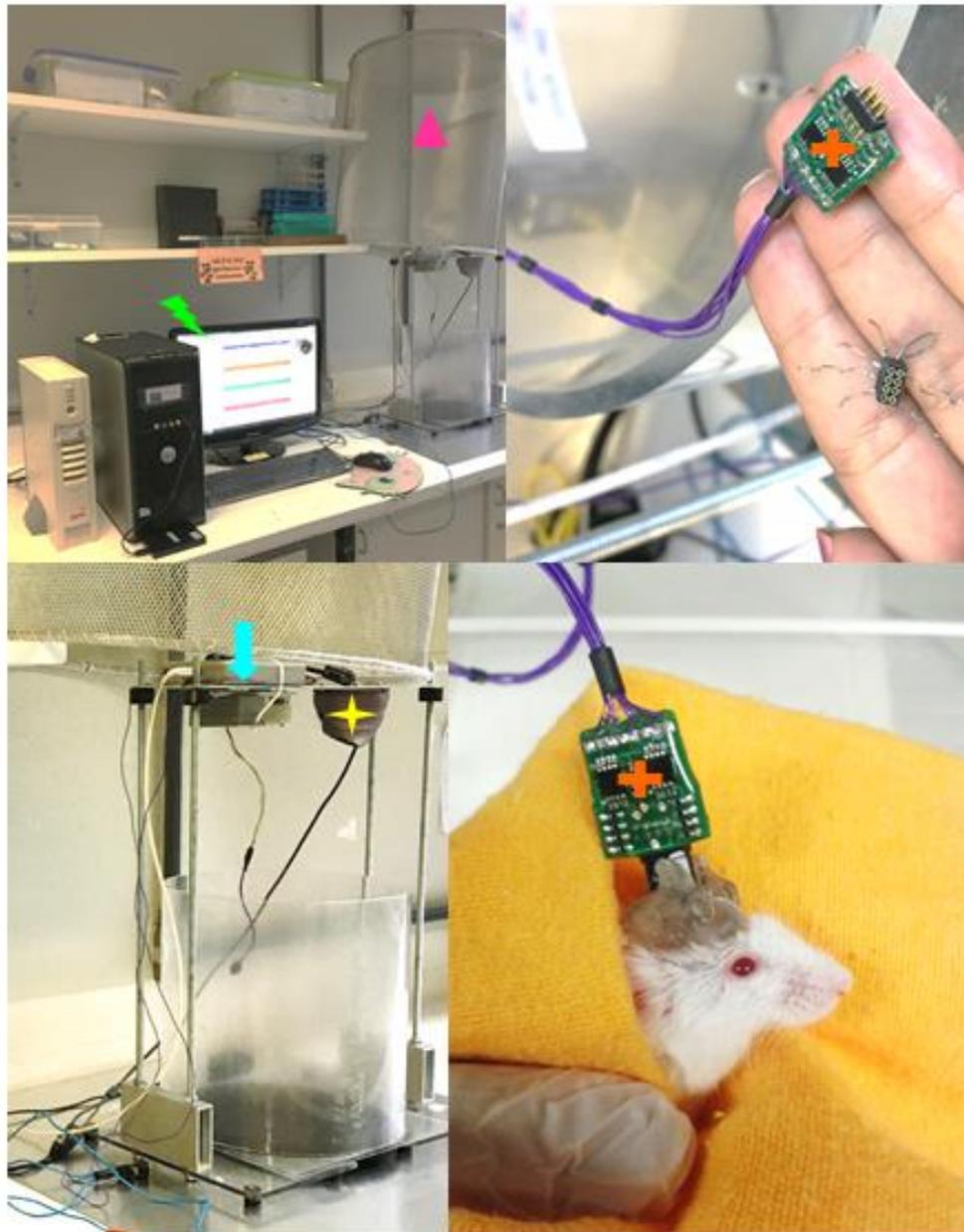
3.6.2. Obtenção dos registros eletroencefalográficos e comportamentais

Durante o período de tratamento (período crônico do modelo), foi realizado um monitoramento amostral por um sistema de registros por vídeo-EEG (Pinnacle Technologies, EUA). Foram utilizados três sujeitos experimentais para cada grupo (sadio; epiléptico; DZP e DE₉₀ da neurovespina - 3,43 mg/Kg).

O vídeo-EEG possibilita correlacionar o perfil eletroencefalográfico adquirido ao comportamento exibido pelo animal e foi obtido na fase I (primeiras cinco horas após a administração do tratamento com o veículo, o peptídeo neurovespina ou o fármaco DZP), após o período crônico de o modelo ter iniciado (15^o dia após o insulto inicial).

Para obtenção dos registros, os animais foram acoplados ao sistema de monitoramento de vídeo-EEG (*Pinnacle Technologies*, Estados Unidos) durante o período crônico do modelo nos dias: 15^o, 18^o, 21^o, 24^o, 27^o e 30^o, onde foi feito simultaneamente o registro eletroencefalográfico e a filmagem do animal.

A figura 15 ilustra o sistema de aquisição e os seus componentes durante o registro da atividade elétrica cerebral de um camundongo em um dos experimentos realizado nesse trabalho.



- ★ Câmera digital
- ✚ Conector adjunto ao cabo blindado
- ↗ Atividade elétrica do camundongo em quatro canais.
- ↓ Sistema de aquisição
- ▲ Gaiola de Faraday

Figura 15. Sistema de aquisição de vídeo-EEG para camundongos. Conector adjunto ao cabo blindado (8413-M, Pinnacle Technologies, EUA): permite que o animal efetue giros de 360° com liberdade de movimento. Sistema de condicionamento e aquisição de dados (8401-HS) amplifica e filtra os dados e bloqueia os ruídos eletromagnéticos externos, principalmente, na frequência de 60 Hz.

O software *Sirenia Acquisition* exibe os dados dos quatro canais de aquisição (8406-SE4, Pinnacle Technologies, EUA) e o registro de cada canal do EEG é feito a partir da diferença de potencial entre dois eletrodos (derivação). Os canais 1 e 2 (EEG 1 e EEG 2), apresentam as derivações de cada um dos pinos dos eletrodos intrahipocampais (esquerdo e direito) e o pino EEG Common apresenta a derivação do eletrodo de referência. Em relação aos canais 3 (parietal) e 4 (occipital), o registro é o resultado da derivação entre os lados esquerdo e direito de cada ponto da montagem bipolar (Tabela 6).

Para destacar ou eliminar atividades de frequências mais altas sem afetar as mais baixas, foi utilizado um filtro de alta frequência (40.000 Hz) e para eliminar atividades de frequências mais baixas sem afetar as mais altas, o filtro de baixa frequência foi utilizado (1 Hz).

Após os tratamentos, os primeiros 600 segundos de registro foram desconsiderados, uma vez que, os animais encontravam-se muito agitados devido à administração dos compostos e a conexão ao equipamento.

Para análise dos padrões epileptiformes obtidos com o software *Sirenia Acquisition*®, foi utilizado o software *Sirenia Seizure Pro*® que é amplamente utilizado na análise de ocorrência de crises em modelos animais de epilepsia. Foram contabilizadas quantas crises eletroencefalográficas (n) os animais apresentaram e o tempo (em segundos) de cada crise.

Tabela 6. Correlação entre os locais dos eletrodos, a derivação (diferença de potencial entre dois eletrodos) e os canais de registro do sistema de vídeo-EEG (Pinnacle technologies, EUA) em camundongos.

Local do eletrodo	Derivação	Canal
Intrahipocampal Esquerdo	EEG 1 e EEG Common	1
Intrahipocampal Direito	EEG 2 e EEG Common	2
Parietais (esquerdo e direito)	EEG 3 (direito) e EEG 3 (esquerdo)	3
Occipitais (esquerdo e direito)	EEG 4 (direito) e EEG 4 (esquerdo)	4

3.7. Avaliação do efeito neuroprotetor no modelo crônico de ELT

Para avaliar o efeito do peptídeo neurovespina no desenvolvimento da epilepsia, também foi empregado o modelo crônico de ELT, com indução de crises por pilocarpina, subdividido em três etapas: insulto inicial, período latente e período crônico da mesma forma que descrito anteriormente. No entanto, o tratamento dos sujeitos experimentais ocorreu durante o período latente do modelo (Figura 16).

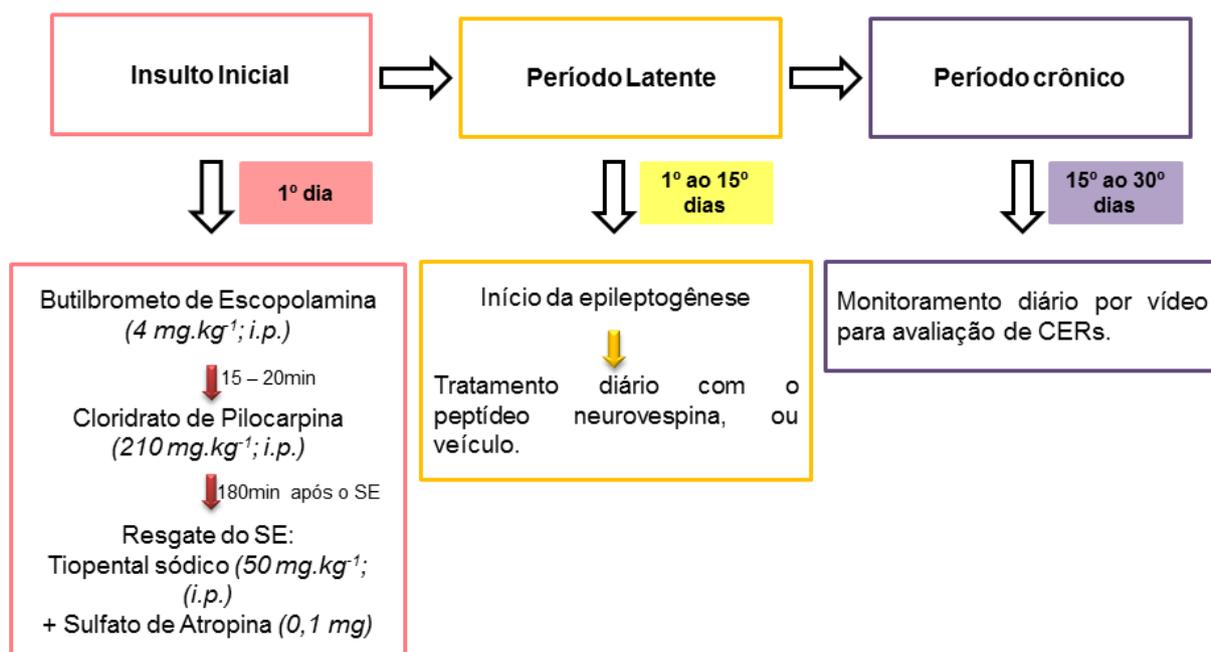


Figura 16. Desenho esquemático ilustrando cada etapa do modelo crônico de ELT induzida por pilocarpina para avaliação do efeito neuroprotetor.

3.7.1. Grupos experimentais

Os sujeitos experimentais submetidos ao protocolo experimental para avaliação da atividade neuroprotetora foram divididos em cinco grupos independentes:

- ✚ Grupo Sadio (n=7): animais não submetidos ao insulto inicial e tratados com solução salina (NaCl 150mM) por via i.p. ($100\mu\text{L}/\text{animal}$). Esse grupo não apresenta CERs e corresponde ao grupo controle saudável.
- ✚ Grupo Epiléptico (n=9): animais submetidos ao insulto inicial, que desenvolveram o SE e foram tratados com solução salina (NaCl 150mM) por via i.p. ($100\mu\text{L}/\text{animal}$). Esse grupo representa os animais que apresentam as CERs e corresponde ao grupo controle negativo.

- ✚ Grupo neurovespina (n=7-8 por grupo; N total=22): animais submetidos ao insulto inicial, que desenvolveram o SE e foram tratados com três doses independentes do peptídeo neurovespina: 2.5, 4 ou 8mg/Kg, solubilizadas na hora do uso em 10% de DMSO (Sigma-Aldrich, Alemanha) em solução salina (NaCl 150mM), administradas por via i.p. (100µL/animal).

3.7.2. Indução do Insulto inicial (SE)

A indução do SE foi realizado exatamente conforme descrito acima no item: 3.4.1.

3.7.3. Tratamento no período latente

Os animais submetidos ao insulto inicial (grupos epilético e neurovespina), do 1º aos 15º dia (período latente), foram pesados e tratados diariamente, sempre iniciando o tratamento às 16h de cada dia. Vale ressaltar que os animais do grupo sadio não sofreram o insulto inicial, mas foram submetidos ao mesmo protocolo.

3.7.4. Período crônico

Os sujeitos experimentais foram marcados com caneta permanente no dorso e no rabo, para diferenciação entre um e outro, e filmados por câmera filmadora (Sony®, Câmera Gravadora de Vídeo Digital DCR-SR47, Brasil), instalada acima da caixa dos animais (Figura 10), a uma distância aproximada

de 50 cm, no próprio biotério, por um período de 9 horas/dia, para observação de CERs.

3.7.5. Avaliação das crises espontâneas e recorrentes

Após o término do período crônico, a quantificação das CERs em cada grupo experimental foi contabilizada em relação ao tempo (em segundos), ao número e a categorização das crises apresentadas segundo a tabela 4 (classe 1 a 5). Os resultados foram apresentados em relação a todas as horas de filmagem no período crônico, ou seja, 120 horas.

3.8. Análises histológicas

Após avaliação do efeito antiepiléptico e neuroprotetor, os animais foram eutanasiados e uma perfusão transcardíaca foi realizada para retirada do tecido encefálico com o intuito de analisar morfológicamente a formação hipocampal, visando a verificação de alterações na sua citoarquitetura.

Os animais foram anestesiados profundamente com tiopental sódico (120 mg.Kg⁻¹, i.p.; Cristália, Brasil) no 30^o dia de experimento, em seguida, a caixa torácica e o coração foram expostos para a perfusão transcardíaca ser realizada.

Os camundongos foram perfundidos através do ventrículo esquerdo cardíaco com influxo de solução tampão fosfato de sódio (PBS; diluído em água destilada) seguida de solução fixadora de formaldeído 4% (diluído em PBS tamponado; Vetec, Brasil). Ambas as soluções foram drenadas através de uma secção no átrio direito e foram infundidas com um volume de 10 mL, por um período de 5 minutos, a uma pressão de 50 mmHg.

Após a perfusão transcardíaca os encéfalos foram extraídos, refixados em formaldeído a 4% e armazenados a 4°C por um período de 72h. Dois dias antes de serem seccionados (cortes coronais) a 50µm no vibrátomo (KD-400 Vibration Microtome, Zhejiang Jinhua Kedi Instrumental, China) (figura 17), os encéfalos foram colocados em solução desidratante de sacarose 30% (diluída em PBS; Sigma-Aldrich®, EUA) visando a crioproteção (prevenção da perda da citoarquitetura do tecido encefálico).

Para avaliação da formação hipocampal, a região de interesse (formação hipocampal) foi selecionada (entre 1,6 e -2,8 mm) segundo referências do Atlas Estereotáxico de Paxinos & Franklin (2001). As secções foram conservadas a 4° C em placas de 24 poços contendo solução anti-congelante (solução: diluir 19.5g de sacarose em 50 mL de PBS, adicionar 30 mL de etilenoglicol, completar com PBS até 100 mL) até a montagem das lâminas.

Para montagem das lâminas, três a cinco cortes do tecido encefálico, de cada sujeito experimental, foram distendidos em lâminas de vidro (Exacta, Brasil) anteriormente gelatinizadas, com solução de gelatina (Vetec, Brasil) e cromosulfato de potássio (Carlo Erba Reagents, França) a fim de serem submetidas à coloração de Nissl.



Figura 17. Posicionamento do tecido cerebral para iniciar as secções utilizando o Vibrátomo KD-400.

3.8.1. Coloração de Nissl

A coloração de Nissl foi empregada para evidenciar a presença de neurônios nas regiões de interesse da formação hipocampal, visto que, o corante concentra-se especificamente na substância de Nissl (material granular presente no retículo endoplasmático rugoso do corpo celular e dos dendritos dos neurônios).

Para obter melhores resultados, o corante violeta de cresila é o que fornece resultados mais confiáveis na revelação da substância de Nissl. Em neurônios lesados e em degeneração, ocorre um processo conhecido como cromatólise, onde a substância de Nissl se rompe e se redistribui pela periferia do corpo celular.

A coloração de Nissl foi utilizada para visualizar os neurônios dos extratos piramidais das regiões CA1 e CA3, e dos extratos granulares do hilus do giro denteado (GD), a fim de estimar a densidade das células neuronais.

Antes de iniciar a técnica da coloração de Nissl (Figura 18), as lâminas previamente montadas com os cortes de tecido encefálico contendo as regiões da formação hipocampal foram colocadas na estufa a 58°C, por 30 minutos, para secagem.

Após secagem, todo o procedimento da coloração de Nissl ocorreu em uma capela de fluxo laminar. Doze lâminas de cada vez foram colocadas em um suporte de plástico acetal e imersas em uma cuba contendo água destilada, por três vezes, e depois foram submersas em uma cuba com a solução do corante de Nissl (Acetato de cresil violeta; Sigma-Aldrich®, Brasil), por 30 minutos.

Posteriormente, as lâminas foram imersas cinco vezes em água destilada e o excesso de corante foi retirado. Na sequência, foram submersas cinco vezes em solução de álcool etílico (Vetec, Brasil) em duas concentrações: 50 e 70%.

Logo depois, uma imersão rápida em uma solução diferenciadora (1 mL de ácido acético em 100 mL de álcool etílico absoluto) foi realizada e, em seguida, foram recobertas por 1 minuto cada em soluções de etanol em diferentes concentrações: 70, 96 e 100% (v/v, em água destilada).

Por último, as lâminas foram submersas em solução de xilol (Dinâmica®, Brasil) por 1 minuto e ao final, as lâminas foram deixadas em outro solução de xilol até, uma a uma, serem recobertas com lamínula de vidro (Exacta, Brasil) empregando Entellan® (Merck KGaA®, Alemanha) como meio de montagem.



Figura 18. Cubas contendo as soluções utilizadas na técnica de coloração de Nissl (em capela de fluxo laminar).

3.8.2. Avaliação da citoarquitetura da formação hipocampal

A análise quantitativa dos neurônios foi verificada através de um sistema de captura de imagens de um microscópio óptico (Leica DM2000, Leica Microsystems, São Paulo) com uma câmera de vídeo digital (Leica DFC 310 FX, Leica Microsystems, São Paulo), conectados a um computador equipado com o software (Leica, Las V4.1.0, Leica Microsystems, São Paulo) (Figura 19).



Figura 19. Microscópio óptico com câmera de vídeo digital, conectados a um computador equipado com o software (Leica, Las V4.1.0, Leica Microsystems, São Paulo) mostrando a formação hipocampal no aumento de 40x.

3.8.3. Análise semiquantitativa do dano neural

A análise semiquantitativa do dano neuronal foi realizada em cada um dos sujeitos experimentais submetidos aos protocolos de avaliação descritos anteriormente, exceto os submetidos ao vídeo-EEG.

Foram obtidas sete imagens de cada lado da formação hipocampal (hemisférios direito e esquerdo), de regiões previamente delimitadas, das camadas de células piramidais das regiões CA1 (3 imagens) e CA3 (3 imagens) e da camada de células granulares do GD (1 imagem) no aumento de 400x.

A diferença de densidade óptica (DO), que se correlaciona com a quantidade de células presentes no tecido, foi obtida com auxílio do software ImageJ (National Institute of Health - NIH, EUA), e calculada a partir da fórmula a seguir:

$$\text{Log}_{10} = 255 / (255 - \text{VC})$$

VC: valor de cinza ($\text{DO}_{\text{área}} - \text{DO}_{\text{fundo}}$)

A $\text{DO}_{\text{área}}$ corresponde a medida de densidade óptica de uma região delimitada do extrato celular (de cada uma das três regiões avaliadas) calculada pelo software, sendo que nas regiões CA1 e CA3, foi feita uma média das três imagens obtidas nessas regiões. A DO_{fundo} é a densidade de uma região fora do extrato celular (sem células) (Sestito *et al.*, 2011).

3.9. Ensaio de toxicidade do peptídeo

3.9.1. Grupos experimentais

Os ensaios de toxicidade aguda (figura 20) foram realizados em camundongos *Swiss* machos, com três meses de vida, pesando entre 38 a 45g. Os sujeitos experimentais submetidos ao protocolo experimental para avaliação da atividade citotóxica, genotóxica e hematotóxica foram divididos em dois grupos independentes:

- ✚ Grupo Sadio (n=6): animais tratados com solução salina (NaCl150 mM) por via i.p. (100µL/animal).
- ✚ Grupo neurovespina (n=6/grupo N total=18): animais tratados 24 horas antes da autanásia com três doses independentes do peptídeo Neurovespina: 4, 8 ou 12mg/Kg, solubilizada na hora do uso em 10% de DMSO (Sigma-Aldrich, Alemanha) e salina (NaCl 150mM), administradas por via i.p. (100µL/animal).

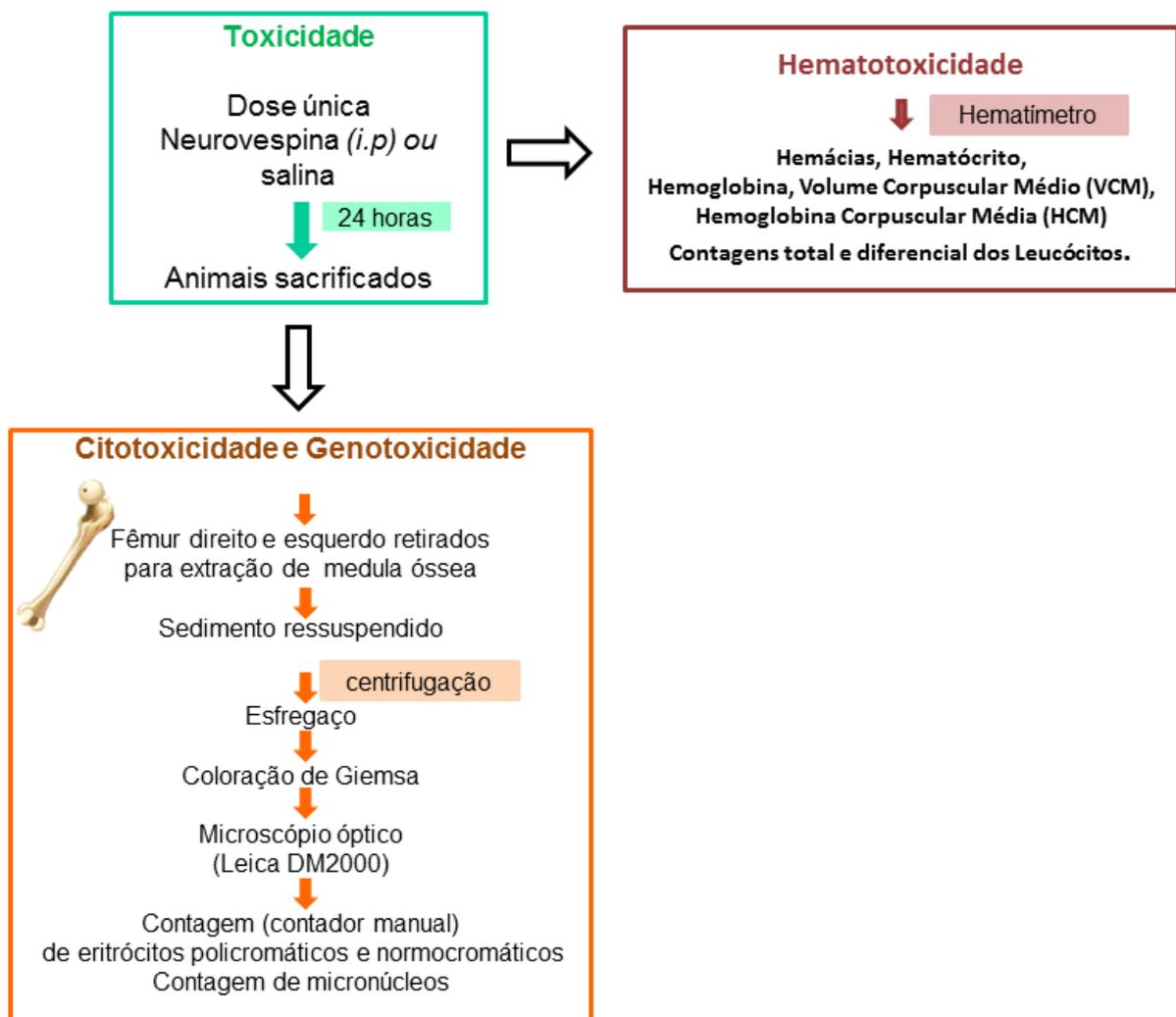


Figura 20. Esquema dos testes de toxicidade aguda em camundongos.

3.9.2. Hematotoxicidade

O sangue foi coletado através de uma seringa contendo EDTA (10%). A coleta foi feita através do ventrículo esquerdo cardíaco e o sangue obtido foi submetido imediatamente à análise hematológica para contagem de hemácias e obtenção do hematócrito, hemoglobina, volume corpuscular médio (VCM) e hemoglobina corpuscular média (HCM). No leucograma foram realizadas as contagens total e diferencial dos leucócitos. A análise do sangue obtido foi realizada em um hematómetro automatizado, calibrado para camundongos (Sysmex pocH-100iV Diff) (Figura 21).



Figura 21. Hematómetro automatizado utilizado para as análises quantiativas do sangue dos camundongos tratados com o peptídeo neurovespina.

3.9.3. Citotoxicidade e genotoxicidade

O teste de proliferação de eritrócitos em medula óssea (figura 20) seguiu o manual da ANVISA (2013) com algumas modificações.

Vinte quatro horas após o tratamento com salina ou com o peptídeo Neurovespina, os animais foram eutanasiados e o fêmur direito e esquerdo foram retirados para extração de medula óssea.

Cortes nas epífises dos ossos foram feitos para expor o canal da medula. A agulha da seringa, previamente preenchida com soro fetal bovino, foi inserida na abertura do fêmur de modo a empurrar a medula para dentro de um tubo de centrífuga, previamente etiquetado com o código do sujeito experimental.

A medula óssea extraída foi centrifugada por 5 minutos a 1000 rpm e o sobrenadante foi descartado com o auxílio de uma pipeta de Pasteur. O sedimento foi ressuspensionado e em seguida foram colocadas duas gotas da suspensão na extremidade de uma lâmina previamente marcada com o código do animal e, com o auxílio de outra lâmina inclinada em um ângulo de 45°, foi feito um esfregaço.

Após a secagem das lâminas à temperatura ambiente, foi feita a fixação do material. As lâminas foram imersas em metanol por 10 minutos e coradas por 7 minutos em uma cuba de coloração contendo o corante Giemsa a 5%, por 3 minutos e a seguir, o excesso de corante foi retirado com água destilada.

Para avaliação da citotoxicidade, foi feita a correlação entre eritrócitos policromáticos (EPC) e normocromáticos (ENC) em aproximadamente 2000 células de medula óssea. A contagem de EPC e ENC é realizada até que uma das duas linhagens atinja 1000 células e então é feita a proporção entre as células na medula óssea. Para o teste de genotoxicidade, foram contados os micronúcleos (MN) em eritrócitos EPC e ENC em 2000 células de medula óssea.

A contagem das células foi feita utilizando um contador manual. A visualização das lâminas foi feita em um microscópio óptico (Leica DM2000, Leica Microsystems, São Paulo), utilizando objetiva de 100X para visualização de EPC e ENC e MN.

3.10. Análise estatística

Os testes foram realizados através do *software* GraphPad Prisma. Em grupos com mais de duas amostras foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido do teste de Tukey, para distribuições normais de variância semelhante (avaliado com o teste de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk) considerando-se $p < 0,05$ e $p < 0,001$. Para o cálculo da DE_{90} foi utilizada a análise de Regressão não-linear. Para análise da significância dos resultados obtidos nos experimentos de incidência e score de crises recorrentes e espontâneas, foram utilizadas ANOVA não paramétrica seguida do teste Kruskal-Wallis.

4. RESULTADOS

4.1. Determinação da dose de pilocarpina utilizada para a indução do SE

A dose de pilocarpina ideal para a indução do SE foi estabelecida após um ensaio padrão de indução de SE. Foram testadas as doses de 350, 300, 250, 210 e 190 mg/Kg (nessa ordem).

Utilizando a dose de 210mg/Kg, 100% dos animais apresentaram um quadro de SE e a taxa de mortalidade foi entre 30-50%. Nas doses superiores a 210 mg/Kg, os animais apresentaram SE, no entanto a taxa de óbito foi superior a 90%. Na dose de 190 mg/Kg, os animais ou não apresentaram SE ou reverteram o SE espontaneamente.

4.2. Efeito antiepiléptico do peptídeo neurovespina durante o período crônico do modelo de ELT

A primeira hora de cada filmagem foi descartada das análises, uma vez que, os animais ficaram muito agitados devido à manipulação e à administração dos compostos. As análises foram divididas nos seguintes parâmetros: tempo (em segundos), número e categorização das crises apresentadas, segundo a tabela 4.

4.2.1. Tempo de duração das crises epiléticas

A Figura 22 representa o resultado obtido quanto ao tempo em segundos de CERs apresentadas pelos sujeitos experimentais, durante todo período crônico [$F_{(7,49)} = 12.45$; $p < 0,01$]. Diferenças significativas foram obtidas entre o grupo epilético e os grupos: sadio e neurovespina ($p < 0,001$).

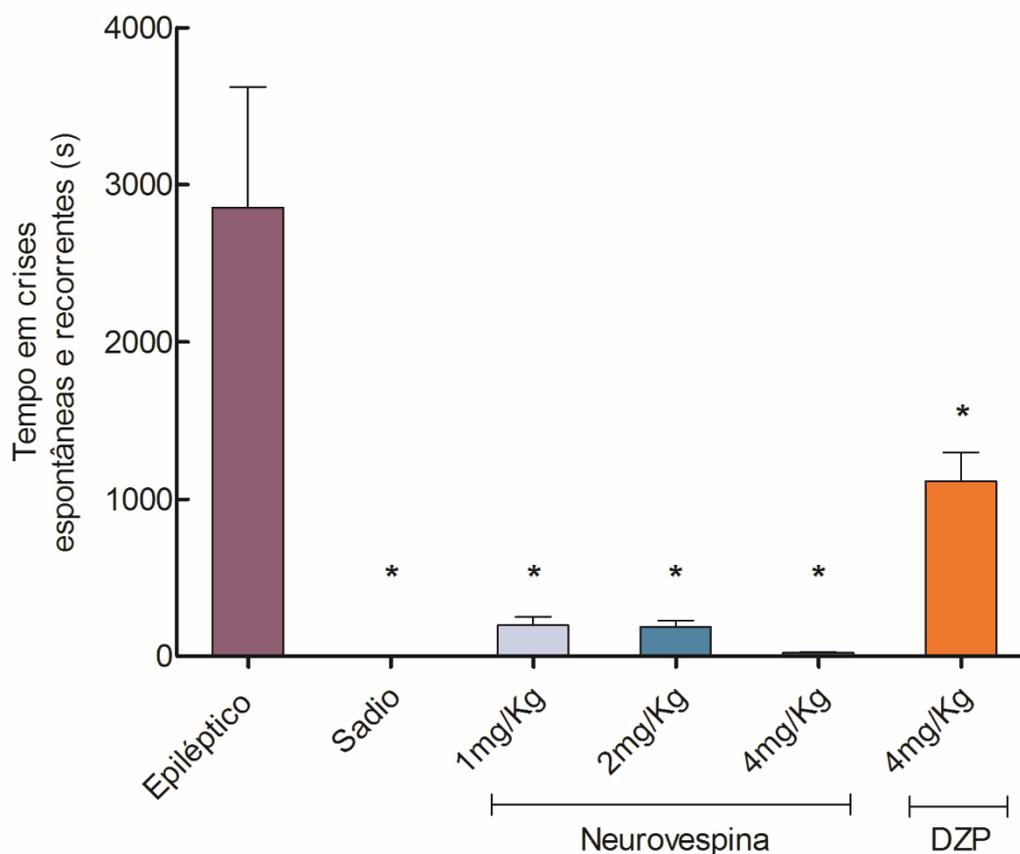


Figura 22. Tempo (segundos) da somatória das CERs durante o período crônico. Os valores representam médias \pm EPM. Todos os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste Tukey-Kramer, $[F_{(7,49)} = 12.45; p < 0,01]$.

(*) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo epiléptico ($p < 0,001$).

Na Figura 23 está ilustrada a duração em segundos das CERs, apresentadas pelos animais, em cada dia do período crônico.

Nos grupos: epiléptico e DZP, os camundongos começaram a apresentar crises desde o primeiro dia do período crônico e a duração das crises foi aumentando no decorrer dos dias. No grupo Sadio os animais não apresentaram CERs.

No grupo tratado com o peptídeo neurovespina, na dose de 1 mg/Kg, alguns animais começaram a apresentar crises no quarto dia de tratamento (18º dia do modelo). Na dose de 2 mg/Kg e 4 mg/Kg, as crises começaram no

sexto e décimo primeiro dias de tratamento (20^o e 25^o dia do modelo), respectivamente. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas no decorrer do período crônico entre o grupo epilético e os grupos: sadio e neurovespina; e entre o grupo sadio e o grupo DZP ($p < 0,05$)

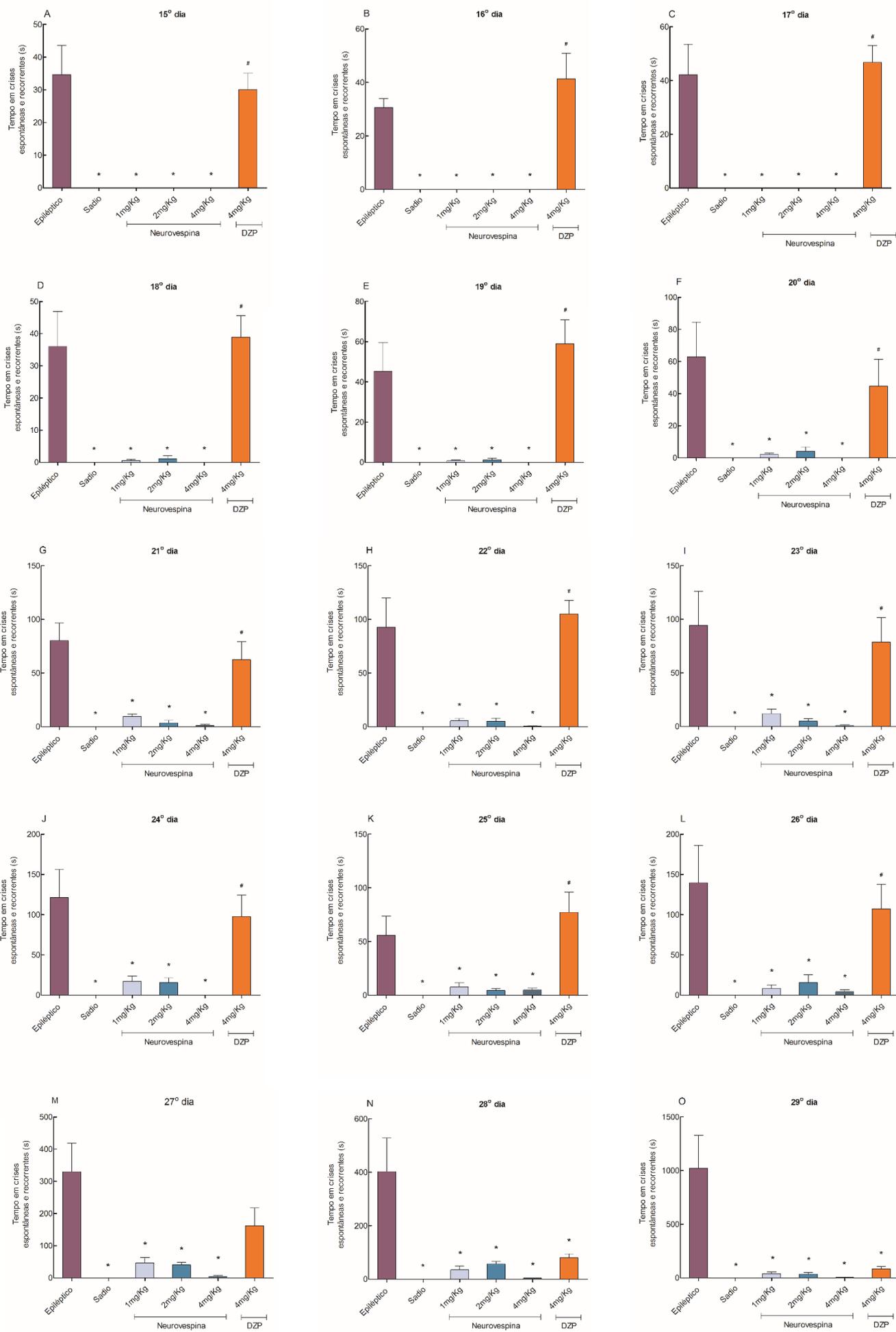


Figura 23. Tempo (segundos) de CERs em cada dia do período crônico após tratamento durante o período crônico do modelo de ELT. Os valores representam médias \pm EPM. Todos os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste Tukey-Kramer, sendo considerado $p < 0,05$.

(*) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo epiléptico .

(#) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo sadio.

(A). 15^o dia: $[F_{(7,49)} = 6.348]$. **(B).** 16^o dia: $[F_{(7,49)} = 7.714]$. **(C).** 17^o dia: $[F_{(7,49)} = 5.226]$. **(D).** 18^o dia: $[F_{(7,49)} = 4.637]$. **(E).** 19^o dia: $[F_{(7,49)} = 4.564]$. **(F).** 20^o dia: $[F_{(7,49)} = 4.802]$. **(G).** 21^o dia: $[F_{(7,49)} = 9.924]$. **(H).** 22^o dia: $[F_{(7,49)} = 4.900]$. **(I).** 23^o dia: $[F_{(7,49)} = 3.976]$. **(J).** 24^o dia: $[F_{(7,49)} = 4.975]$. **(K).** 25^o dia: $[F_{(7,49)} = 3.915]$. **(L).** 26^o dia: $[F_{(7,49)} = 8.925]$. **(M).** 27^o dia: $[F_{(7,49)} = 6.401]$. **(N).** 28^o dia: $[F_{(7,49)} = 4.547]$. **(O).** 29^o dia: $[F_{(7,49)} = 6.331]$.

A Figura 24 representa a duração total (segundos) das CERs, apresentadas durante todo o período crônico, dividido em duas fases: I (até cinco horas após o tratamento) e II (quatro horas restantes) $[F_{(7,49)} = 10.74$; $p < 0,01$]. Diferenças significativas foram obtidas entre o grupo epiléptico e os grupos: sadio e neurovespina ($p < 0,001$).

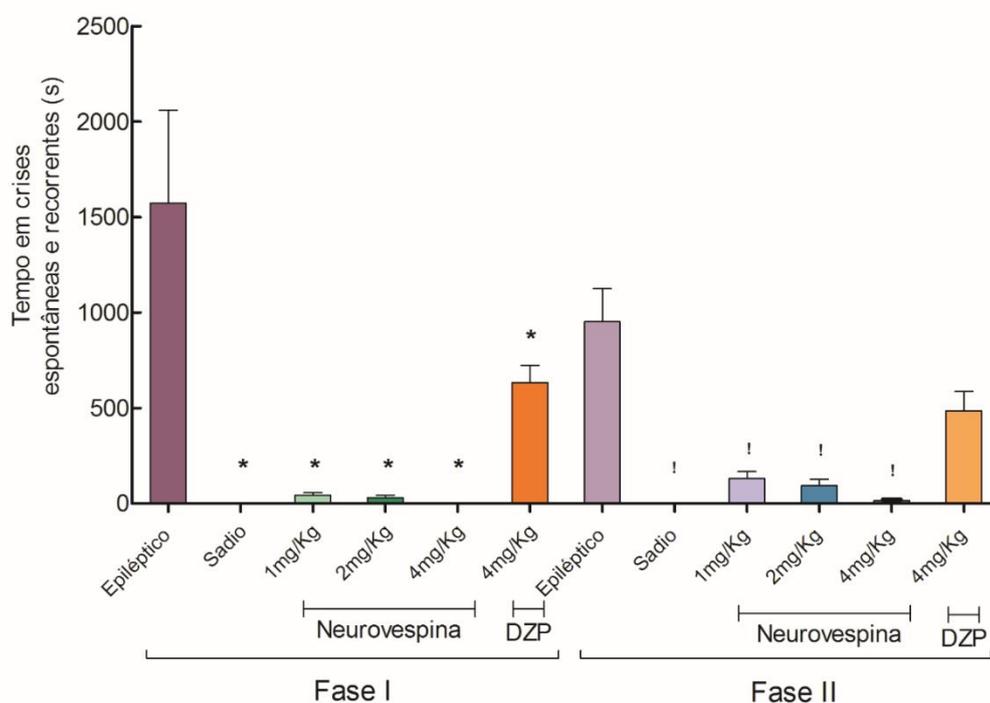


Figura 24. Duração total das CERs (segundos) em cada fase de todo o período crônico no modelo de ELT. Fase I: primeiras cinco horas logo após o tratamento. Fase II: quatro horas restantes de observação. Os dados passaram

pelo teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov e foram submetidos à análise de variância ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste Tukey-Kramer

(*) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo epiléptico na fase I ($p < 0,01$).

(#) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo sadio na fase I ($p < 0,01$).

(!) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo epiléptico na fase II ($p < 0,01$).

Na figura 25 estão ilustrados os resultados, em relação ao tempo, em que os animais apresentaram CERs, em cada dia do período crônico, dividido em duas fases: I (até cinco horas após o tratamento), e II (de cinco até nove horas após o tratamento).

No grupo epiléptico e DZP, todos os animais apresentaram CERs nas fases I e II a partir do primeiro dia do período crônico. No grupo Sadio, os animais não apresentaram nenhuma crise.

No grupo neurovespina, na dose de 1 mg/Kg, foi observado que os animais não apresentavam crises na fase I, nos primeiros 10 dias de tratamento do período crônico. Na dose de 2 mg/Kg os animais não apresentavam crises na fase I nos primeiros 12 dias. A partir do 11º dia e 13º dia, respectivamente, os animais começaram a apresentar crises na fase II, no entanto, em ambas as doses, o tempo em crise era maior na fase II em relação à fase I. Na dose de 4 mg/Kg, os animais não apresentaram crises na fase I do modelo.

Diferenças estatisticamente significativas foram obtidas no decorrer do tratamento.

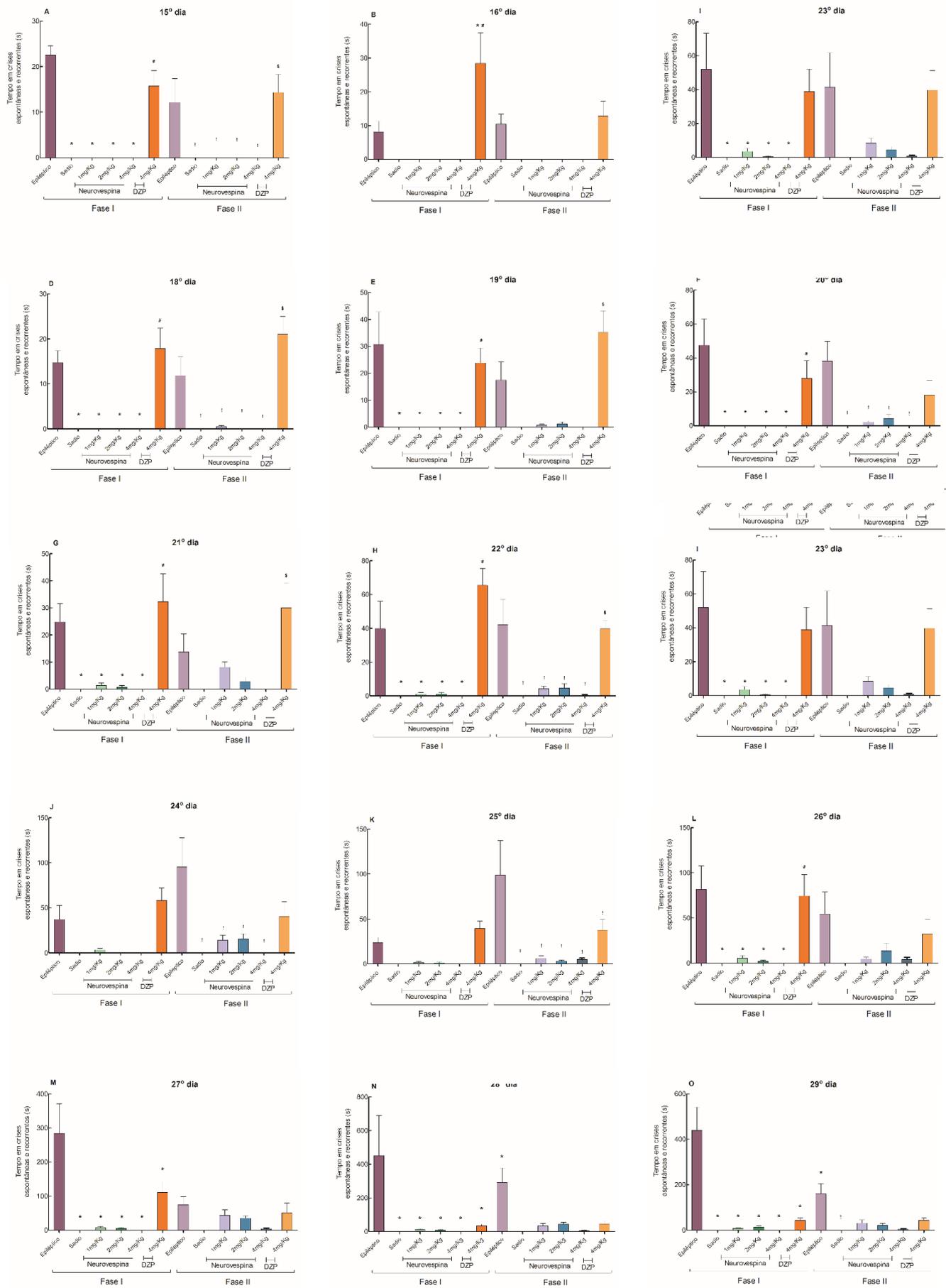


Figura 25. Duração das CERs (segundos) em cada fase de todo o período crônico. Fase I: primeiras cinco horas logo após o tratamento. Fase II: quatro horas restantes de observação. Os dados passaram pelo teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov e foram submetidos à análise de variância ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste Tukey-Kramer, considerando-se $p < 0,05$.

(*) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo epiléptico na fase I.

(#) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo sadio na fase I.

(!) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo epiléptico na fase II.

(\$) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo sadio na fase I.

(A). 15^o dia: $[F_{(7,49)} = 13.95]$. (B). 16^o dia: $[F_{(7,49)} = 8.056]$. (C). 17^o dia: $[F_{(7,49)} = 7.320]$. (D). 18^o dia: $[F_{(7,49)} = 14.09]$. (E). 19^o dia: $[F_{(7,49)} = 8.010]$. (F). 20^o dia: $[F_{(7,49)} = 6.406]$. (G). 21^o dia: $[F_{(7,49)} = 6.824]$. (H). 22^o dia: $[F_{(7,49)} = 10.82]$. (I). 23^o dia: $[F_{(7,49)} = 4.328]$. (J). 24^o dia: $[F_{(7,49)} = 5.357]$. (K). 25^o dia: $[F_{(7,49)} = 7.753]$. (L). 26^o dia: $[F_{(7,49)} = 9.335]$. (M). 27^o dia: $[F_{(7,49)} = 3.944]$. (N). 28^o dia: $[F_{(7,49)} = 3.547]$. (O). 29^o dia: $[F_{(7,49)} = 15.00]$.

4.2.2. Número de crises epilépticas

A Figura 26 representa o resultado obtido quanto ao número de CERs apresentadas pelos sujeitos experimentais, durante todo período crônico $[F_{(7,49)} = 32.90; p < 0,01]$. Diferenças significativas foram obtidas entre o grupo epiléptico e os grupos: sadio e neurovespina ($p < 0,001$).

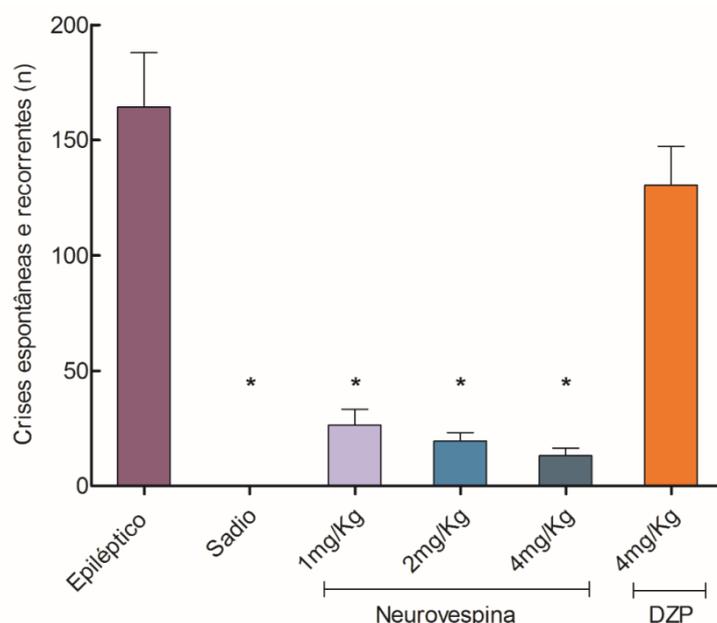


Figura 26. Número de crises espontâneas e recorrentes durante todo período crônico no modelo de ELT. Os valores representam médias \pm EPM. Todos os

dados foram submetidos à análise de variância ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste Tukey-Kramer, [$F_{(7,49)} = 32.90$; $p < 0,0001$].

(*) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Epiléptico ($p < 0,001$).

Na figura 27, está ilustrada a análise do número de CERs apresentadas pelos camundongos, em cada dia do período crônico.

No grupo epiléptico e DZP, os animais começaram a apresentar crises desde o primeiro dia do período crônico e a quantidade de crises foi aumentando no decorrer dos dias. No grupo sadio os animais não apresentaram crises espontâneas e recorrentes. No grupo neurovespina, na dose de 1 mg/Kg, os animais começaram a apresentar crise no quarto dia do período crônico (18º dia do modelo). Na dose de 2 mg/Kg, as crises começaram no sexto dia (20º dia do modelo) e na dose de 4 mg/Kg, no décimo dia (25º dia do modelo). Nas três doses avaliadas, a quantidade de crises foi aumentando no decorrer dos dias, sendo observadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre o grupo epiléptico e os grupos: sadio e neurovespina durante todos os dias.

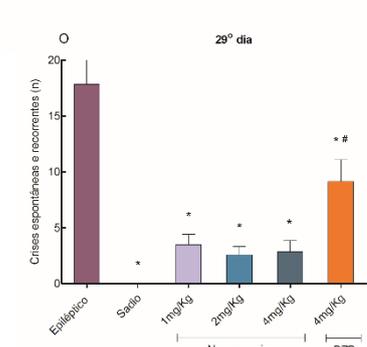
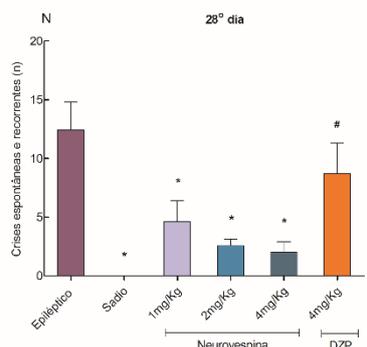
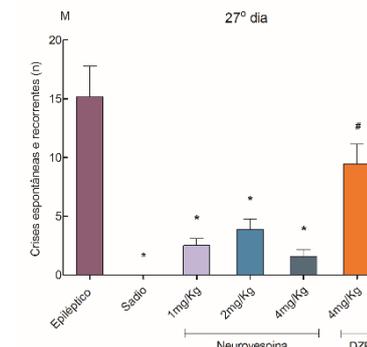
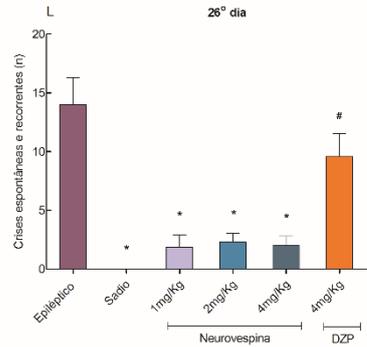
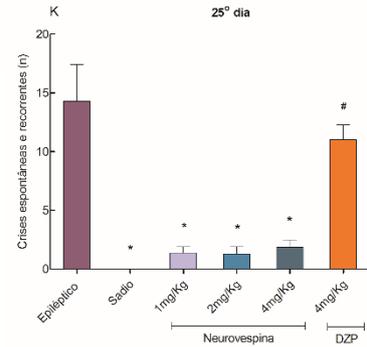
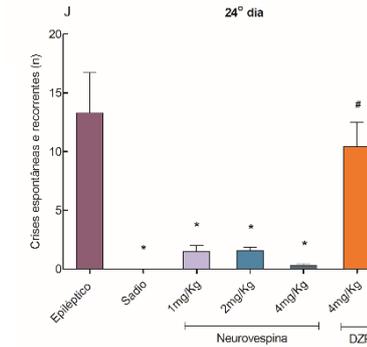
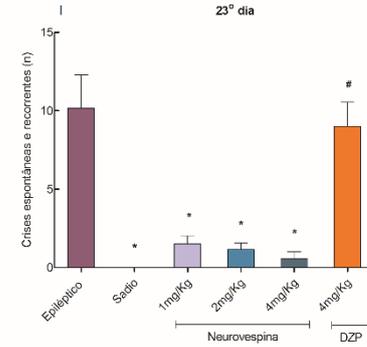
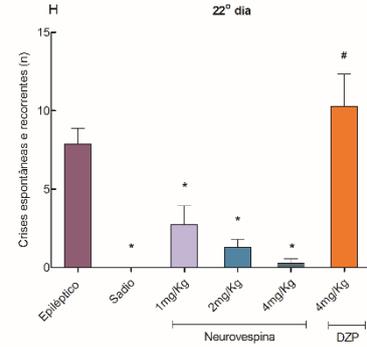
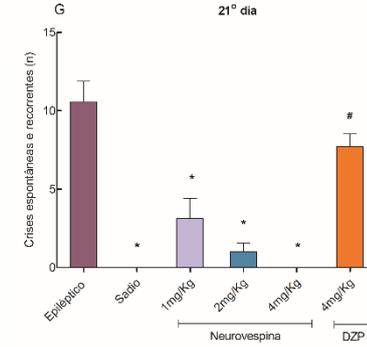
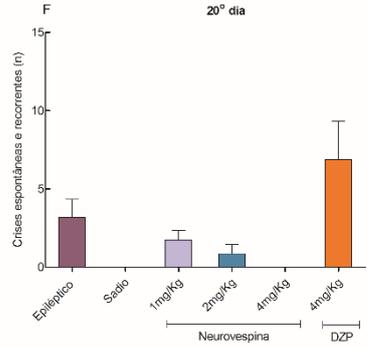
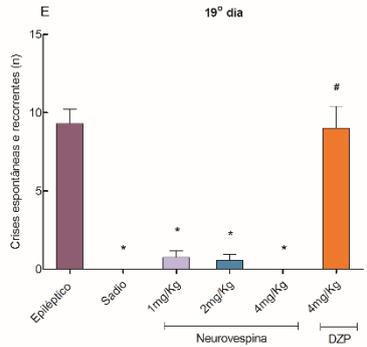
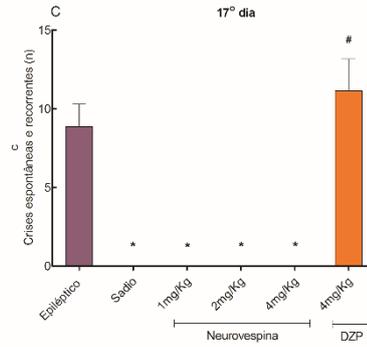
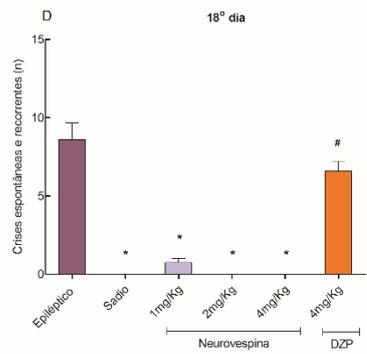
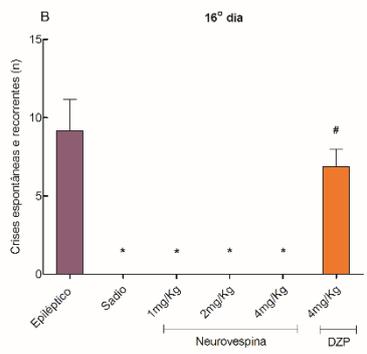
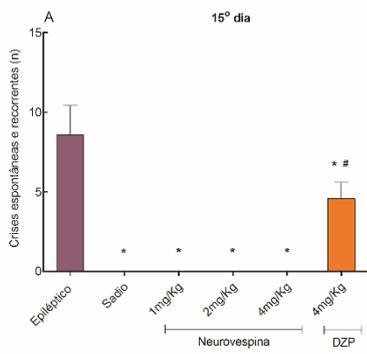


Figura 27. Número de CERs em cada dia após tratamento durante o período crônico no modelo de ELT. Os valores representam médias \pm EPM. Todos os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste Tukey-Kramer, considerando $p < 0,05$.

(*) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo epiléptico.

(#) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo sadio.

(A). 15º dia: $[F_{(7,49)} = 18.31]$. (B). 16º dia: $[F_{(7,49)} = 17.94]$. (C). 17º dia: $[F_{(7,49)} = 27.42]$. (D). 18º dia: $[F_{(7,49)} = 56.83]$. (E). 19º dia: $[F_{(7,49)} = 40.98]$. (F). 20º dia: $[F_{(7,49)} = 5.242]$. (G). 21º dia: $[F_{(7,49)} = 24.98]$. (H). 22º dia: $[F_{(7,49)} = 15.29]$. (I). 23º dia: $[F_{(7,49)} = 17.05]$. (J). 24º dia: $[F_{(7,49)} = 12.70]$. (K). 25º dia: $[F_{(7,49)} = 18.04]$. (L). 26º dia: $[F_{(7,49)} = 16.18]$. (M). 27º dia: $[F_{(7,49)} = 17.83]$. (N). 28º dia: $[F_{(7,49)} = 7.729]$. (O). 29º dia: $[F_{(7,49)} = 17.52]$.

Na Figura 28 encontram-se os resultados quanto ao número de CERs, durante o período crônico, dividido nas duas fases: I e II $[F_{(7,49)} = 20.98$; $p < 0,01$]. Diferenças significativas foram obtidas entre o grupo epiléptico e os grupos: sadio e neurovespina nas duas fases ($p < 0,001$).

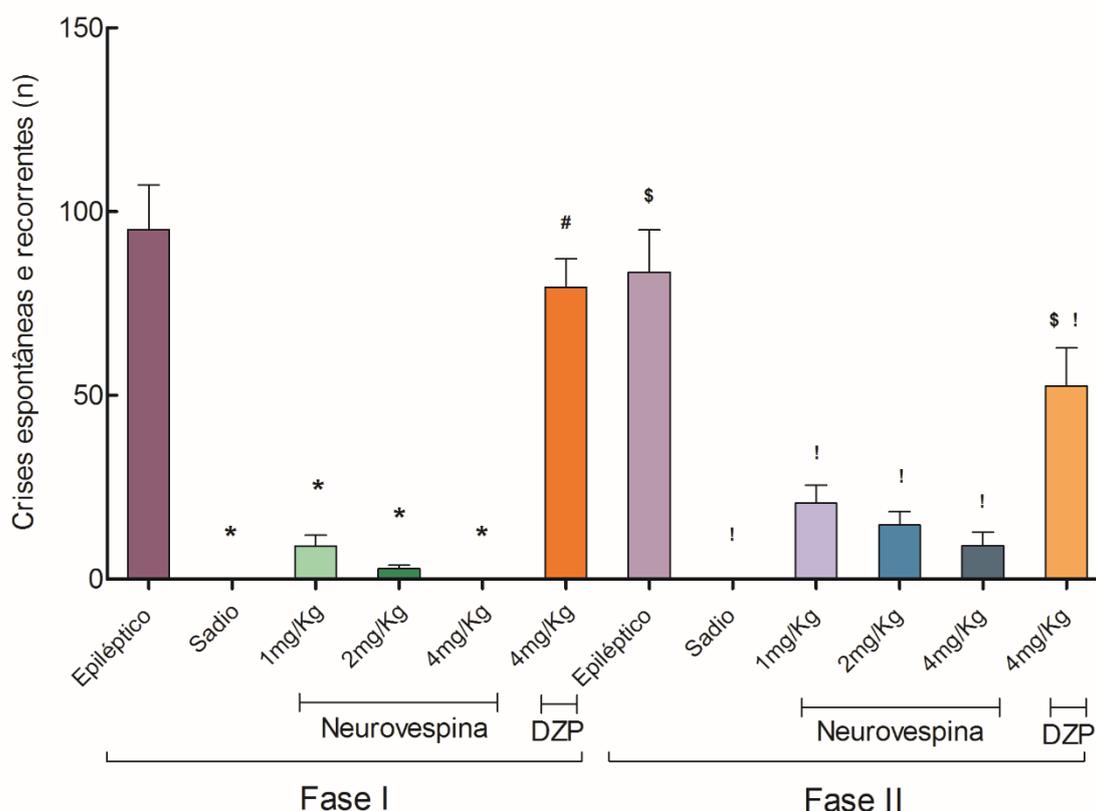


Figura 28. Número de CERs (segundos) em cada fase de todo o período crônico. Fase I: primeiras cinco horas logo após o tratamento. Fase II: quatro horas restantes de observação. Os dados passaram pelo teste de normalidade

Kolmogorov-Smirnov e foram submetidos à análise de variância ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste Tukey-Kramer, sendo considerado $p < 0,05$.

(*) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo epilético na fase I.

(#) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo sadio na fase I.

(!) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo epilético na fase II.

(\$) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo sadio na fase II.

Na Figura 29 está ilustrada a análise do número CERs que os animais apresentaram em cada dia do período crônico, dividido em duas fases: I (até cinco horas após o tratamento) e II (de cinco até nove horas após o tratamento).

No grupo epilético e DZP, todos os animais apresentaram CERs, nas fases I e II, a partir do primeiro dia do período crônico. No grupo Sadio, os animais não apresentaram nenhuma crise.

No grupo neurovespina, na dose de 1 mg/Kg, foi observado que os animais não apresentavam crises na fase I nos primeiros 10 dias de tratamento do período crônico. Na dose de 2 mg/Kg, os animais não tinham crises na fase I nos primeiros 12 dias. A partir do 11º dia e 13º dia, respectivamente, os animais começaram a apresentar crises na fase II, no entanto, em ambas as doses, o tempo das crises era maior na fase II. Na dose de 4 mg/Kg, os animais não tiveram crises na fase I do modelo.

Diferenças estatisticamente significativas foram obtidas no decorrer dos dias do período crônico.

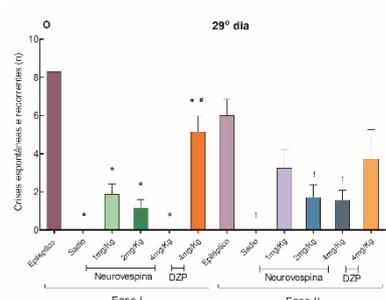
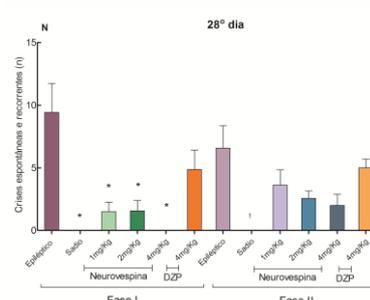
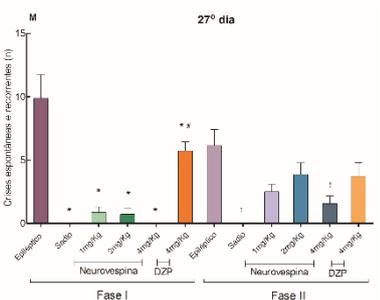
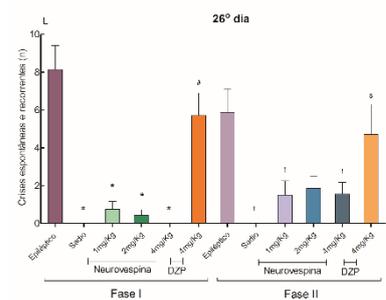
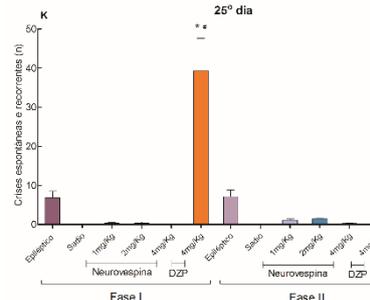
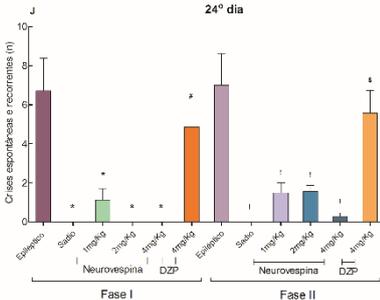
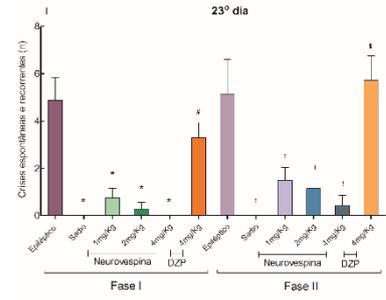
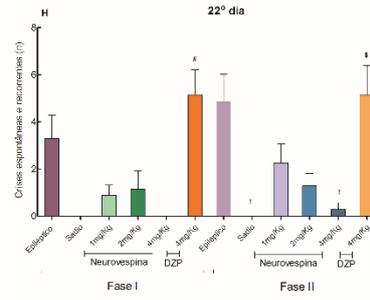
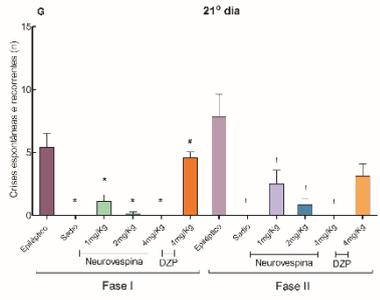
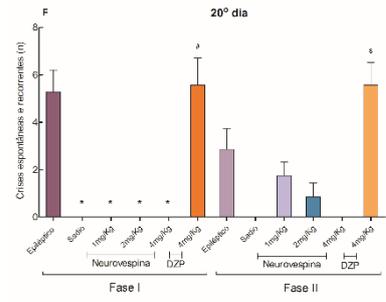
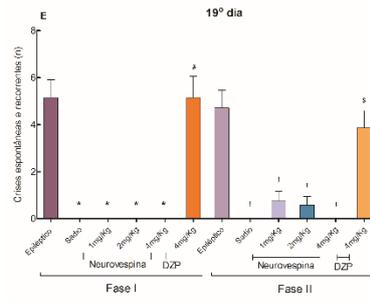
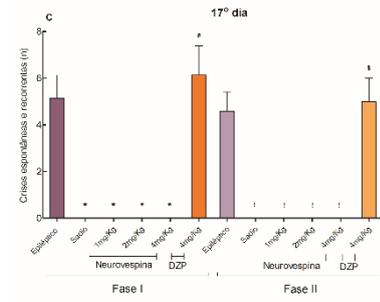
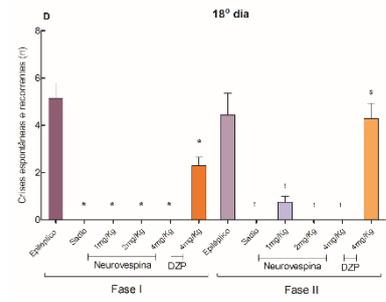
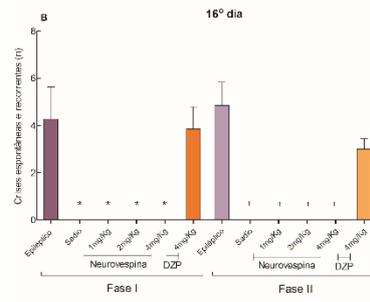
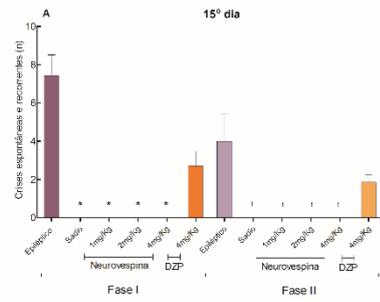


Figura 29. Quantidade de CERs (n) em cada fase do período crônico. Fase I: primeiras cinco horas logo após o tratamento. Fase II: quatro horas restantes de observação. Os dados passaram pelo teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov e foram submetidos à análise de variância ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste Tukey-Kramer, considerando-se $p < 0,05$.

(*) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo epiléptico na fase I.

(#) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo sadio na fase I.

(!) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo epiléptico na fase II.

(\$) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo sadio na fase I.

(A). 15^o dia: $[F_{(7,49)} = 16.94]$. **(B).** 16^o dia: $[F_{(7,49)} = 13.15]$. **(C).** 17^o dia: $[F_{(7,49)} = 19.82]$. **(D).** 18^o dia: $[F_{(7,49)} = 27.91]$. **(E).** 19^o dia: $[F_{(7,49)} = 22.33]$. **(F).** 20^o dia: $[F_{(7,49)} = 15.17]$. **(G).** 21^o dia: $[F_{(7,49)} = 10.94]$. **(H).** 22^o dia: $[F_{(7,49)} = 7.468]$. **(I).** 23^o dia: $[F_{(7,49)} = 10.57]$. **(J).** 24^o dia: $[F_{(7,49)} = 10.99]$. **(K).** 25^o dia: $[F_{(7,49)} = 19.47]$. **(L).** 26^o dia: $[F_{(7,49)} = 10.61 \text{ } p < 0,05]$. **(M).** 27^o dia: $[F_{(7,49)} = 13.11]$. **(N).** 28^o dia: $[F_{(7,49)} = 6.416]$. **(O).** 29^o dia: $[F_{(7,49)} = 10.57]$.

4.2.3. Classe das crises epilépticas

Os resultados obtidos quanto à classe das CERs, durante o período crônico do modelo de ELT induzido por pilocarpina, estão representados na figura 30. A análise foi feita de acordo com a tabela de classificação de crises límbicas de Racine (1972) modificada por Shibley e Smith (2002) (Tabela 4).

Em relação ao grau de severidade das CERs apresentadas pelos sujeitos experimentais durante todo período crônico, o teste de Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn revelaram que o tratamento com o peptídeo amenizou a severidade das crises $[K = 66.77; p < 0,0001]$.

Diferenças significativas foram obtidas entre o grupo epiléptico e os grupos sadio e neurovespina nas doses de 2 e 4 mg/Kg ($p < 0,05$).

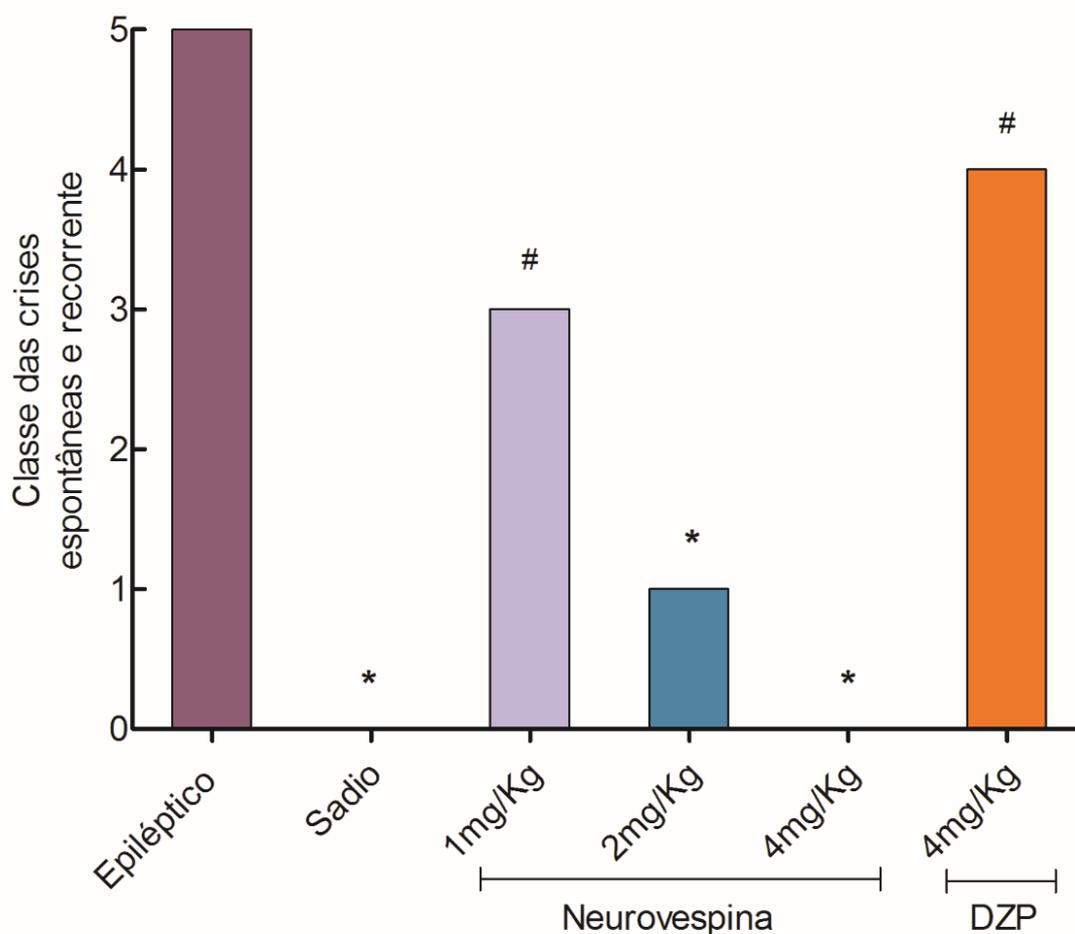


Figura 30. Classe das CERs, de acordo com a classificação de crises límbicas de Racine (1972) modificada por Shibley e Smith (2002), observadas durante todo período crônico. Os valores representam **medianas**. Todos os dados foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn, sendo considerado $p < 0,05$

(*) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo epiléptico ($p < 0,001$).

(#) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo sadio ($p < 0,001$).

Na figura 31 está ilustrada a classe de gravidade das CERs apresentadas pelos animais em cada dia do período crônico. Segundo a Tabela 4, quanto maior a classe, mais grave a crise.

Foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre o grupo epiléptico e os grupos: sadio e neurovespina na dose de 4 mg/Kg, durante todos os dias.

Nos grupos epiléptico e DZP, os animais começaram a apresentar crises de classe 3 ou 4 (crises tônico-clônicas pouco intensas marcadas por iclonias unilaterais dos membros anteriores e crises mioclônicas bilaterais dos membros anteriores com elevações) desde o primeiro dia de avaliação do período crônico, e a classe das crises foi aumentando no decorrer dos dias. No grupo Sadio, os animais não apresentaram crises espontâneas e recorrentes.

O teste de Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn revelaram que o tratamento com o peptídeo, em todas as concentrações testadas, amenizou a severidade das CERs ao longo dos dias de tratamento.

Na dose de 1 mg/Kg, alguns animais começaram a apresentar crises mais severas no quarto dia do período crônico (18º dia do modelo) e na dose de 2 mg/Kg, as crises começaram a se agravar no sexto dia (20º dia). Na dose de 4 mg/Kg, as crises começaram a se agravar no décimo dia (25º dia). Nas três doses avaliadas, a classe das crises foi aumentando no decorrer dos dias.

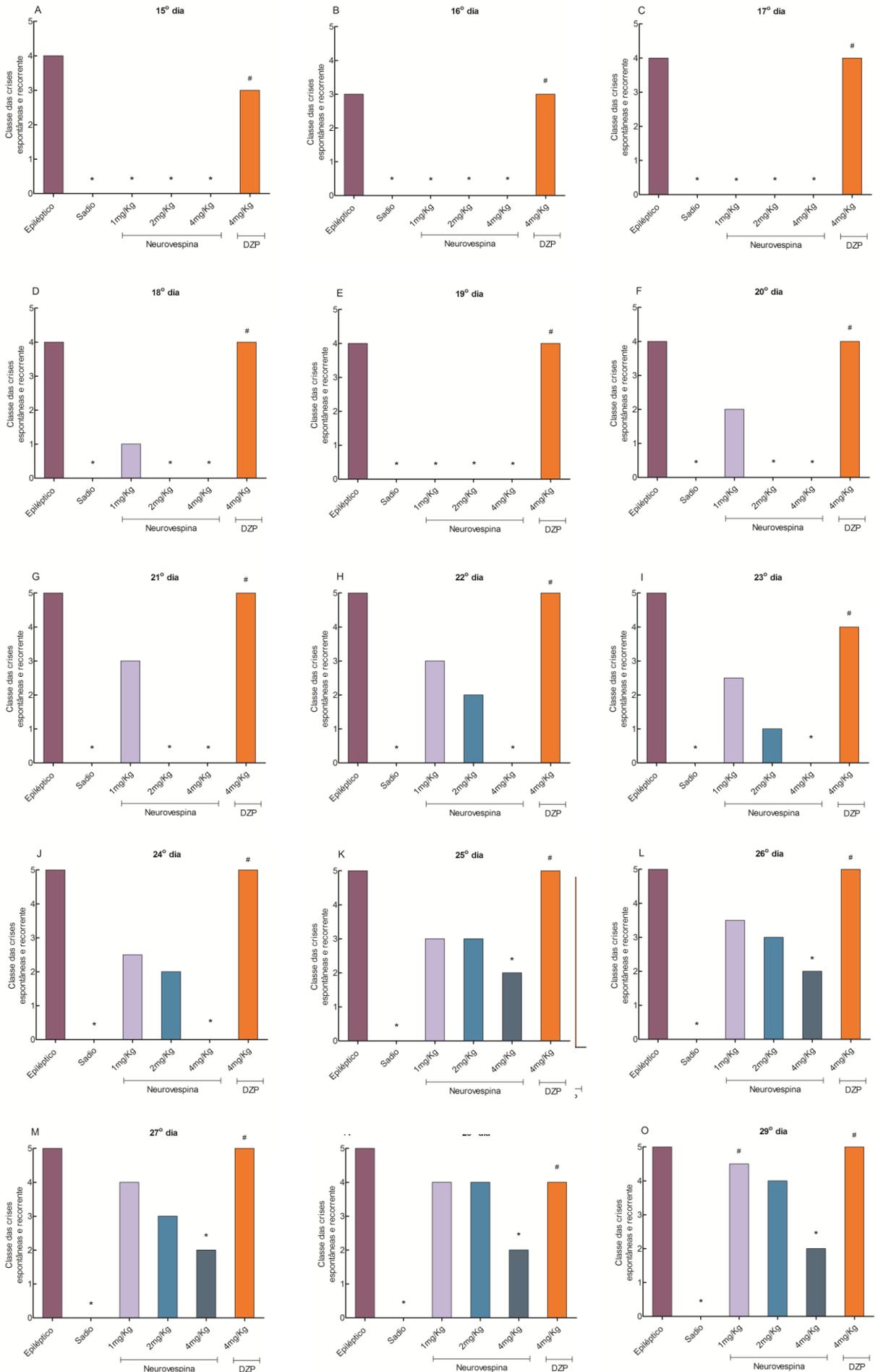


Figura 31. Classes máximas das CERs de acordo com a classificação de crises límbicas de Racine (1972) modificada por Shibley e Smith (2002), observadas em cada dia do período crônico. Os valores representam **medianas**. Todos os dados foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn, sendo considerado $p < 0,05$.

(*) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo epiléptico.

(#) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo sadio.

(A). 15º dia: (K = 40.96). **(B).** 16º dia: (K = 40.57). **(C).** 17º dia: (K = 41.15). **(D).** 18º dia: (K = 37.42). **(E).** 19º dia: (K = 35.09). **(F).** 20º dia: (K = 31.28). **(G).** 21º dia: (K = 35.79). **(H).** 22º dia: (K = 34.22). **(I).** 23º dia: (K = 27,19). **(J).** 24º dia: (K = 31.46). **(K).** 25º dia: (K = 23.22). **(L).** 26º dia: (K = 24.98). **(M).** 27º dia: (K = 28.38). **(N).** 28º dia: (K = 23.75). **(O).** 29º dia: (K = 27.92).

A Figura 32 representa a mediana da classe máxima das CERs apresentada pelos animais durante todo o período crônico, dividido em duas fases: I (até cinco horas após o tratamento) e II (quatro horas restantes) [K = 152.9; $p < 0,0001$]. Diferenças significativas foram obtidas entre o grupo epiléptico e os grupos: sadio e neurovespina, em todas as doses avaliadas na fase I, e nas doses 2 e 4 mg/Kg na fase II.

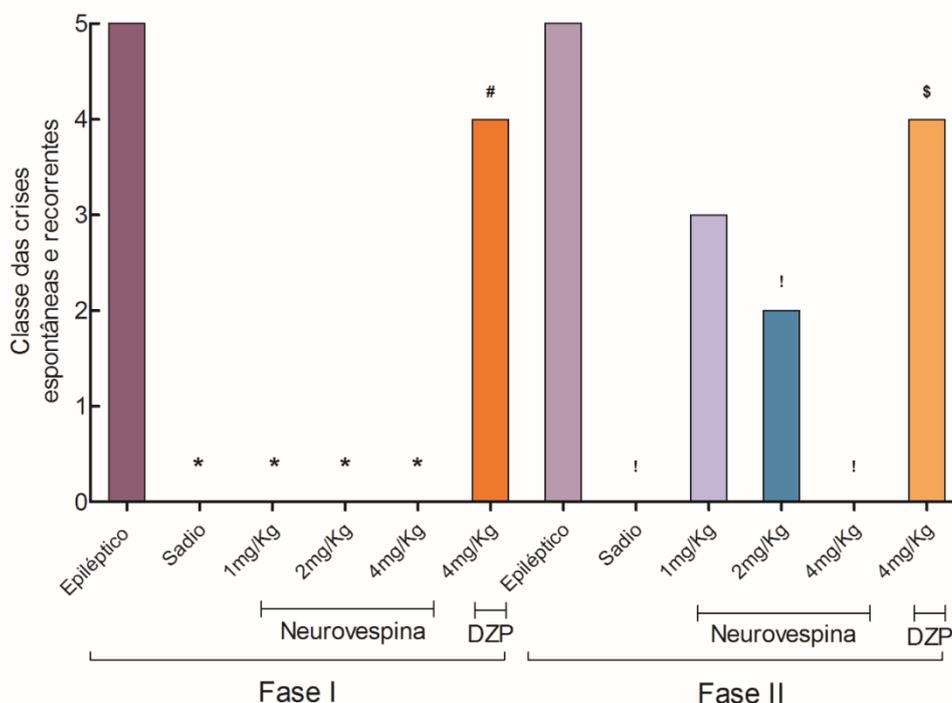


Figura 32. Classe máxima das CERs apresentadas pelos animais em cada fase do período crônico. Fase I: primeiras cinco horas logo após o tratamento. Fase II: quatro horas restantes de observação. considerando-se $p < 0,05$. Os

valores representam **medianas**. Os dados passaram pelo teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov e foram submetidos à análise de variância ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste Tukey-Kramer (K = 152.9).

(*) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo epiléptico na fase I.

(#) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo sadio na fase I.

(!) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo epiléptico na fase II.

(\$) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo sadio na fase II.

Na Figura 33 está ilustrada a análise da classe das CERs em cada dia do período crônico, dividido em duas fases: I (até cinco horas após o tratamento) e II (de cinco até nove horas após o tratamento).

No grupo epiléptico e DZP, todos os animais apresentaram CERs, nas fases I e II, a partir do primeiro dia do período crônico. No grupo Sadio, os animais não apresentaram nenhuma crise.

No grupo neurovespina, na dose de 1 mg/Kg, foi observado que os animais não apresentavam crises na fase I nos primeiros 10 dias de tratamento do período crônico. Na dose de 2 mg/Kg, os animais não tinham crises na fase I nos primeiros 12 dias. A partir do 11^o dia e 13^o dia, respectivamente, os animais começaram a apresentar crises na fase II, no entanto, em ambas as doses, a gravidade das crises era maior na fase II. Na dose de 4 mg/Kg, os animais não tiveram crises na fase I do modelo.

Diferenças estatisticamente significativas foram obtidas no decorrer dos dias do período crônico.

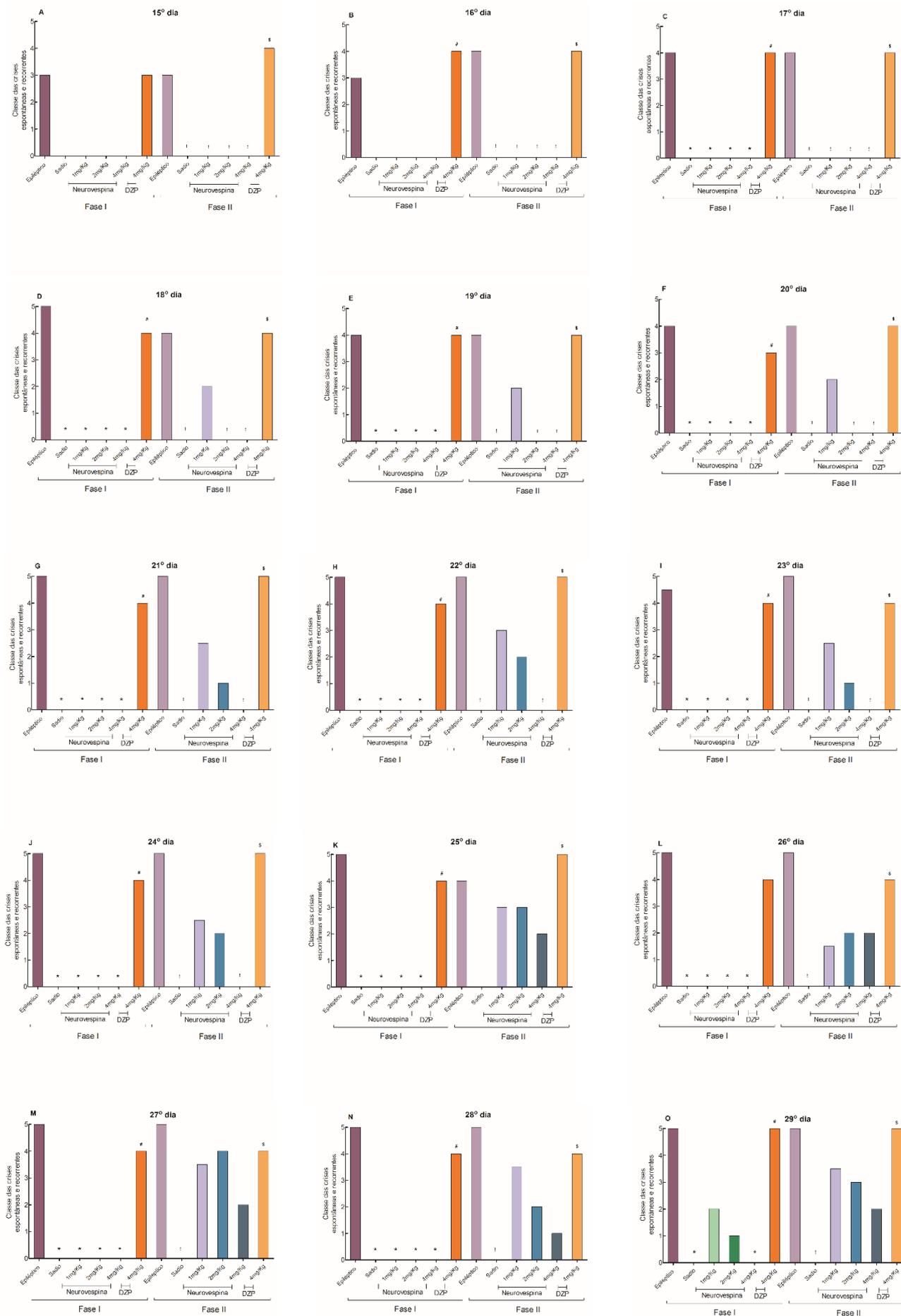


Figura 33. Classe máxima das CERs apresentadas pelos animais em cada dia do período crônico, dividido em duas fases. Fase I: primeiras cinco horas logo após o tratamento. Fase II: quatro horas restantes de observação. Os valores representam **medianas**. Os dados passaram pelo teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov e foram submetidos à análise de variância ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste Tukey-Kramer, considerando-se $p < 0,05$.

(*) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo epiléptico na fase I.

(#) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo sadio na fase I.

(!) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo epiléptico na fase II.

(\$) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo sadio na fase II.

(A). 15º dia: (K = 79.35). **(B).** 16º dia: (K = 80.30). **(C).** 17º dia: (K = 82.55). **(D).** 18º dia: (K = 78.84). **(E).** 19º dia: (K = 77.46). **(F).** 20º dia: (K = 73.46). **(G).** 21º dia: (K = 77.67). **(H).** 22º dia: (K = 64.83). **(I).** 23º dia: (K = 72.70). **(J).** 24º dia: (K = 59.48). **(K).** 25º dia: (K = 52.42). **(L).** 26º dia: (K = 64.32). **(M).** 27º dia: (K = 60.75). **(N).** 28º dia: (K = 63.44). **(O).** 29º dia: (K = 65.43).

4.3. Medidas da massa corporal dos sujeitos experimentais durante o período crônico

Em relação à massa corporal dos animais (Figura 34), não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre o primeiro e o último dia de tratamento, durante o período crônico [$F_{(7,42)} = 2.691$; $P = 0059$].

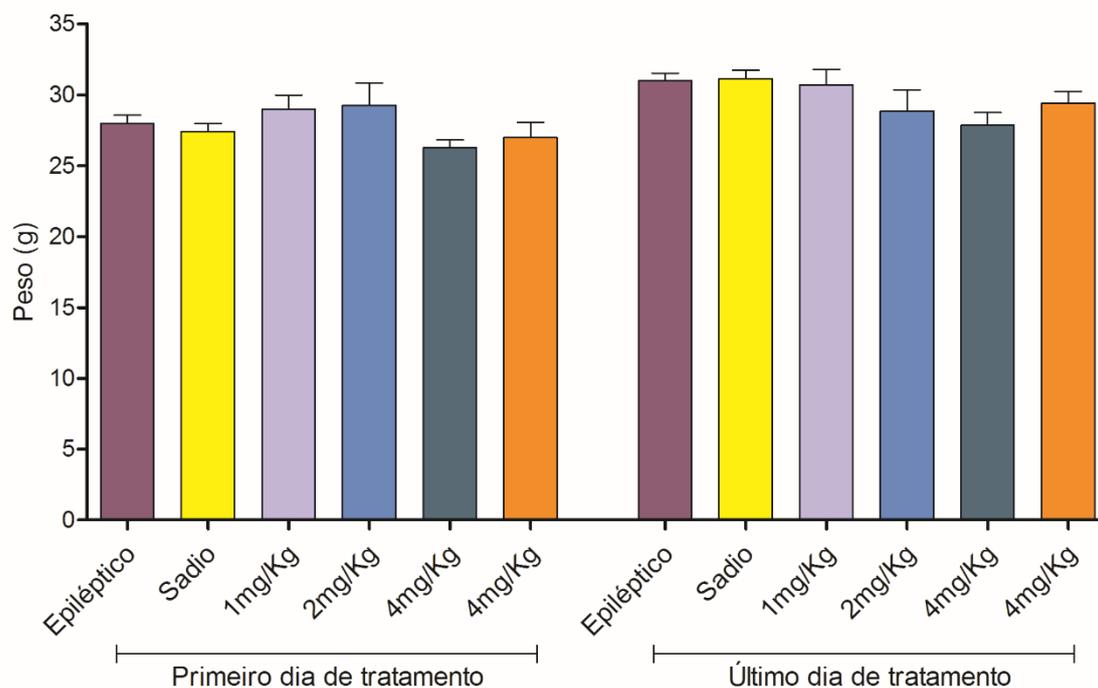


Figura 34. Massa corporal (gramas) dos sujeitos experimentais no primeiro e último dia de tratamento durante o período crônico. Os valores representam médias \pm EPM. Todos os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste Tukey-Kramer, [$F_{(7,49)} = 2.691$; $P = 0,0059$].

4.4. Cálculo da DE_{90}

O cálculo da DE_{90} do peptídeo neurovespina (figura 35), foi feito utilizando uma regressão não-linear sigmoideal e utilizando os dados de proteção [quantidade de animais que não apresentaram crise máxima (classe 5, tabela 4) durante o período crônico] contra CERs. A DE_{90} calculada foi de 3.43 mg/Kg e o intervalo de confiança foi de 0.5683 -1.639 mg/Kg. $R^2 = 0,9808$.

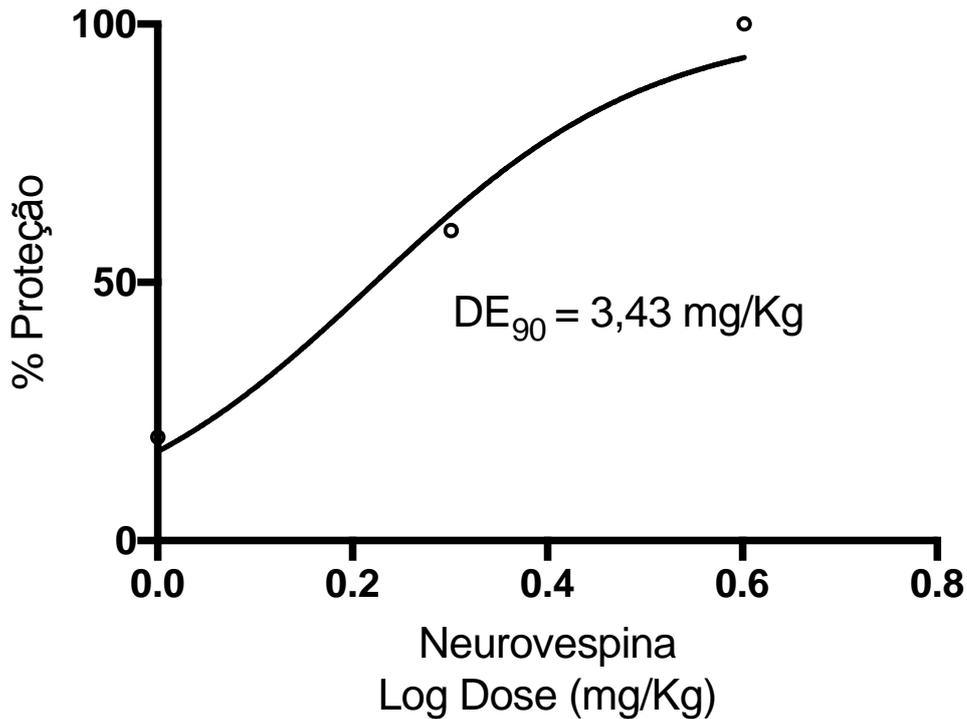


Figura 35: Curva de porcentagem de proteção (animais que não apresentaram crises durante a fase I) do peptídeo neurovespina no modelo crônico de ELT induzido por pilocarpina. Regressão não-linear sigmoidal; $R^2 = 0,9808$.

4.5. Avaliação dos padrões epileptiformes por vídeo-EEG

Os resultados obtidos quanto ao tempo e a quantidade de crises eletroencefalográficas observadas após o tratamento com o peptídeo neurovespina durante os dias: 15^o, 18^o, 21^o, 24^o, 27^o e 30^o do período crônico do modelo de ELT induzido por pilocarpina estão representados nas figuras 36 a 41.

Em relação ao tempo de crises eletroencefalográficas apresentadas pelos sujeitos experimentais durante os dias pré-definidos do período crônico, o teste de Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn revelou que o tratamento com o peptídeo diminuiu o tempo de crises eletroencefalográficas detectada nos quatro canais de registro do sistema de aquisição por vídeo-EEG em relação ao grupo epiléptico (Figura 36) ($p < 0,05$).

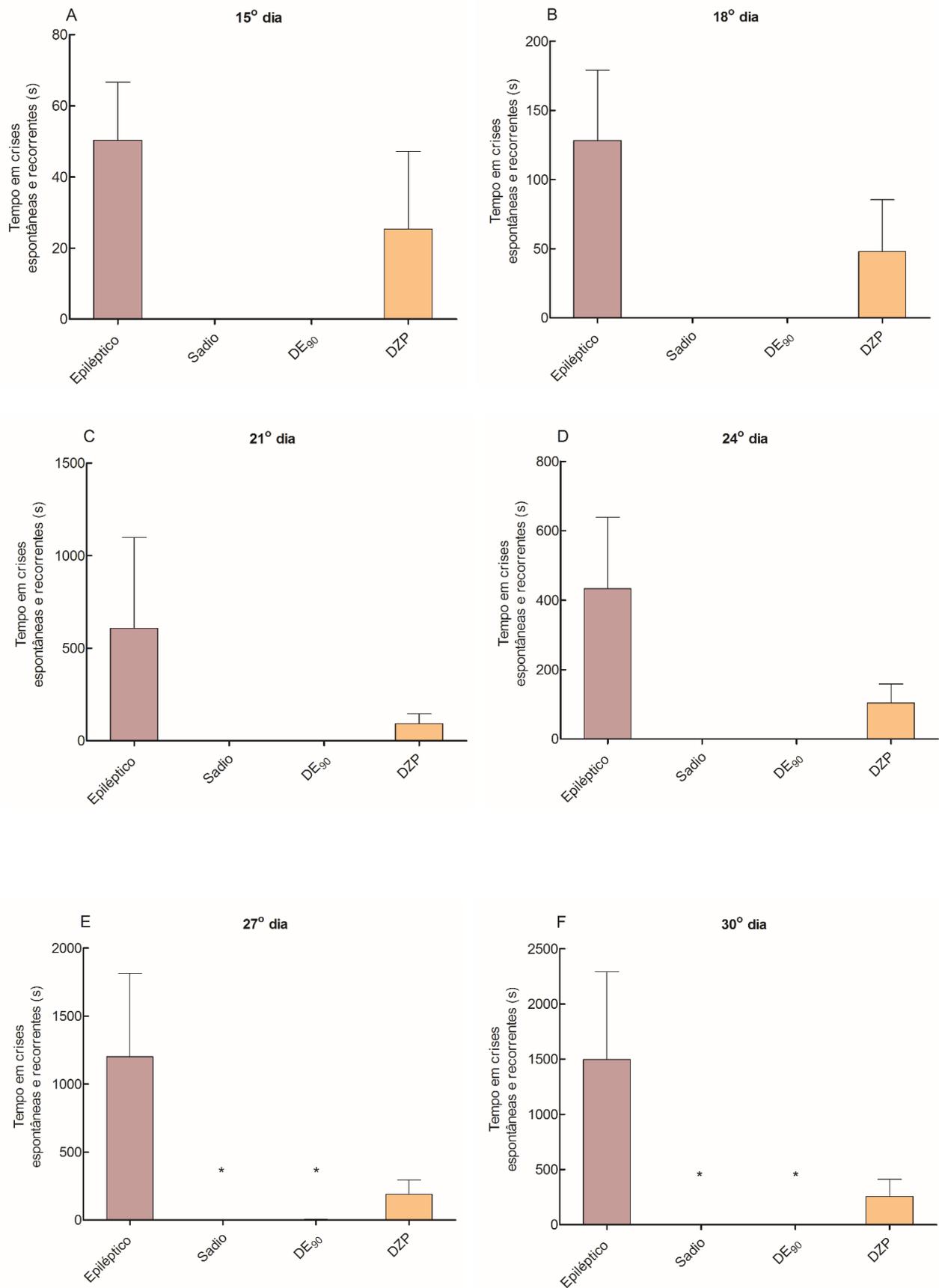


Figura 36. Tempo (segundos) de CERs nos dias 15^o, 18^o, 21^o, 24^o, 27^o e 30^o do período crônico do modelo de ELT induzido por pilocarpina após o

tratamento com a DE₉₀ do peptídeo neurovespina. Os valores representam médias \pm EPM. Todos os dados foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis e o pós teste de Dunn, sendo considerado $p < 0,05$.

(*) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo epilético.

(A): [K = 9.831; $p < 0,05$]; (B): [K = 10.18; $p < 0,05$]; (C): [K = 9,831; $p < 0,05$]; (D): [K = 10.18; $p < 0,05$]; (E): [K = 9.732; $p < 0,05$]; (F): [K = 9.732; $p < 0,05$].

Em relação à quantidade (N) de crises eletroencefalográficas apresentadas pelos sujeitos experimentais durante os dias pré-definidos do período crônico, o teste de Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn revelou que o tratamento com o peptídeo diminuiu o tempo de crises eletroencefalográficas detectada nos quatro canais de registro do sistema de aquisição por vídeo-EEG, analisadas de acordo com os padrões pré definidos pelo *software Sirenia Seizure Pro*, em relação ao grupo epilético (Figura 37) ($p < 0,05$).

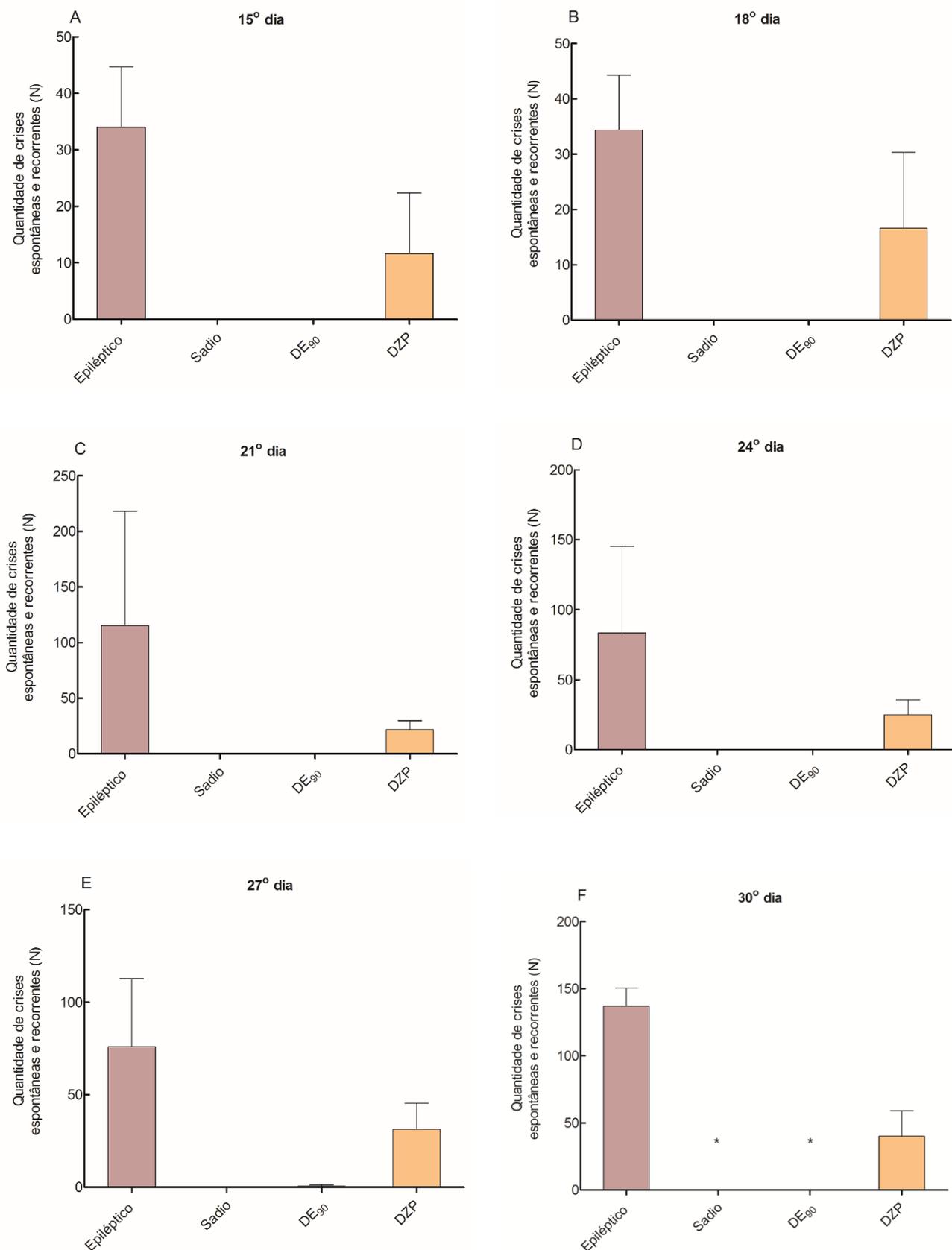


Figura 37. Quantidade (N) de CERs nos dias 15º, 18º, 21º, 24º, 27º e 30º do período crônico do modelo de ELT induzido por pilocarpina após o tratamento

com a DE₉₀ do peptídeo neurovespina. Os valores representam médias \pm EPM. Todos os dados foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis e o pós teste de Dunn, sendo considerado $p < 0,05$.

(*) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo epilético.

(A): [K = 9.504; $p < 0,05$]; (B): [K = 10.24; $p < 0,05$]; (C): [K = 9,831; $p < 0,05$]; (D): [K = 9.588; $p < 0,05$]; (E): [K = 9.401; $p < 0,05$]; (F): [K = 10.75; $p < 0,05$].

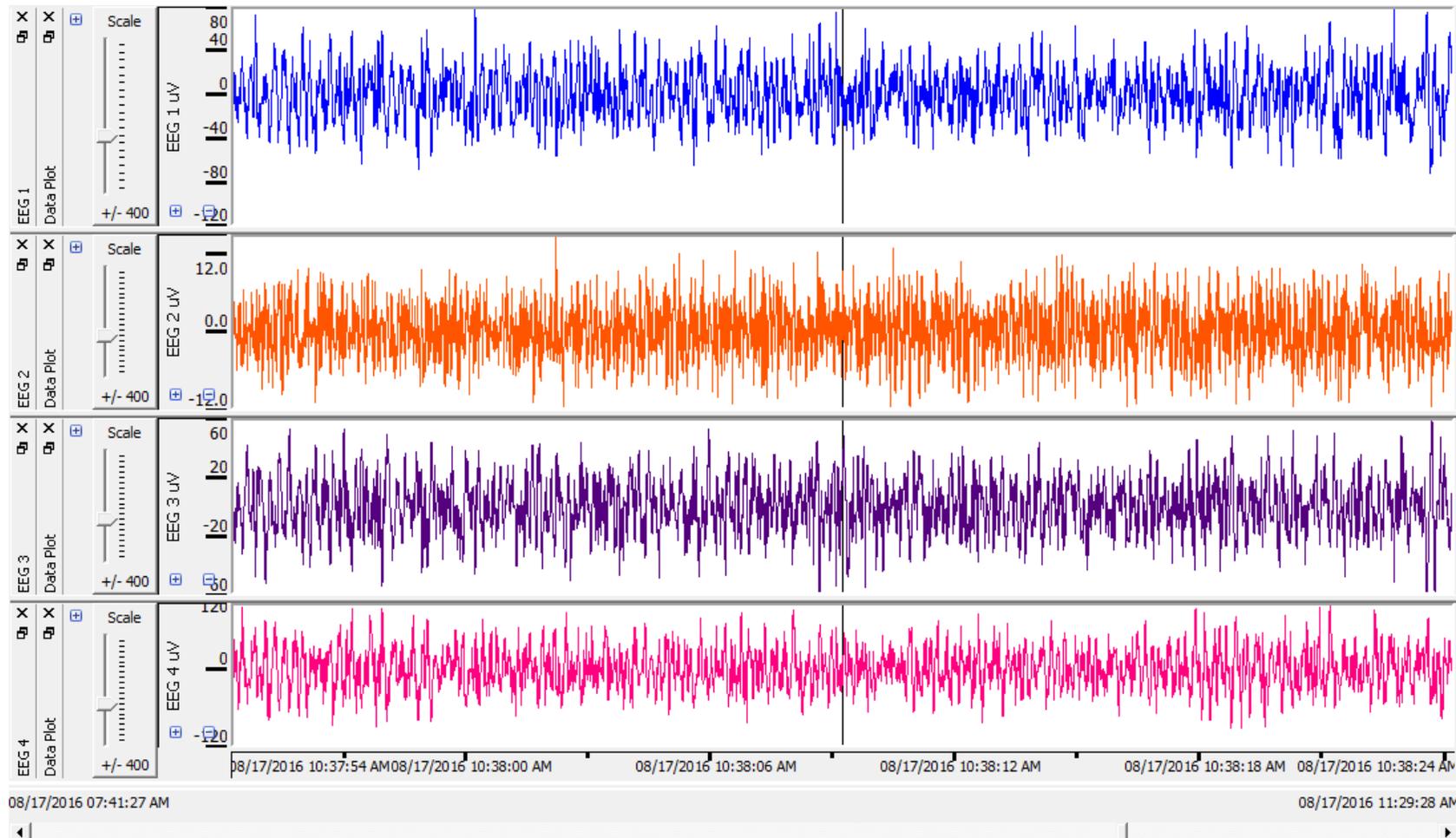


Figura 38. Representação ilustrativa do perfil eletroencefalográfico de um sujeito experimental sadio sem detecção de descargas epileptiformes sincronizadas (Pinnacle Technologies). EEG 1 e 2: A montagem referencial dos eletrodos intrahipocampais bilaterais e bipolar dos eletrodos corticais; EEG 3 (parietal) e 4 (occipital): gera as derivações observadas separadamente em cada um dos quatro canais de aquisição.

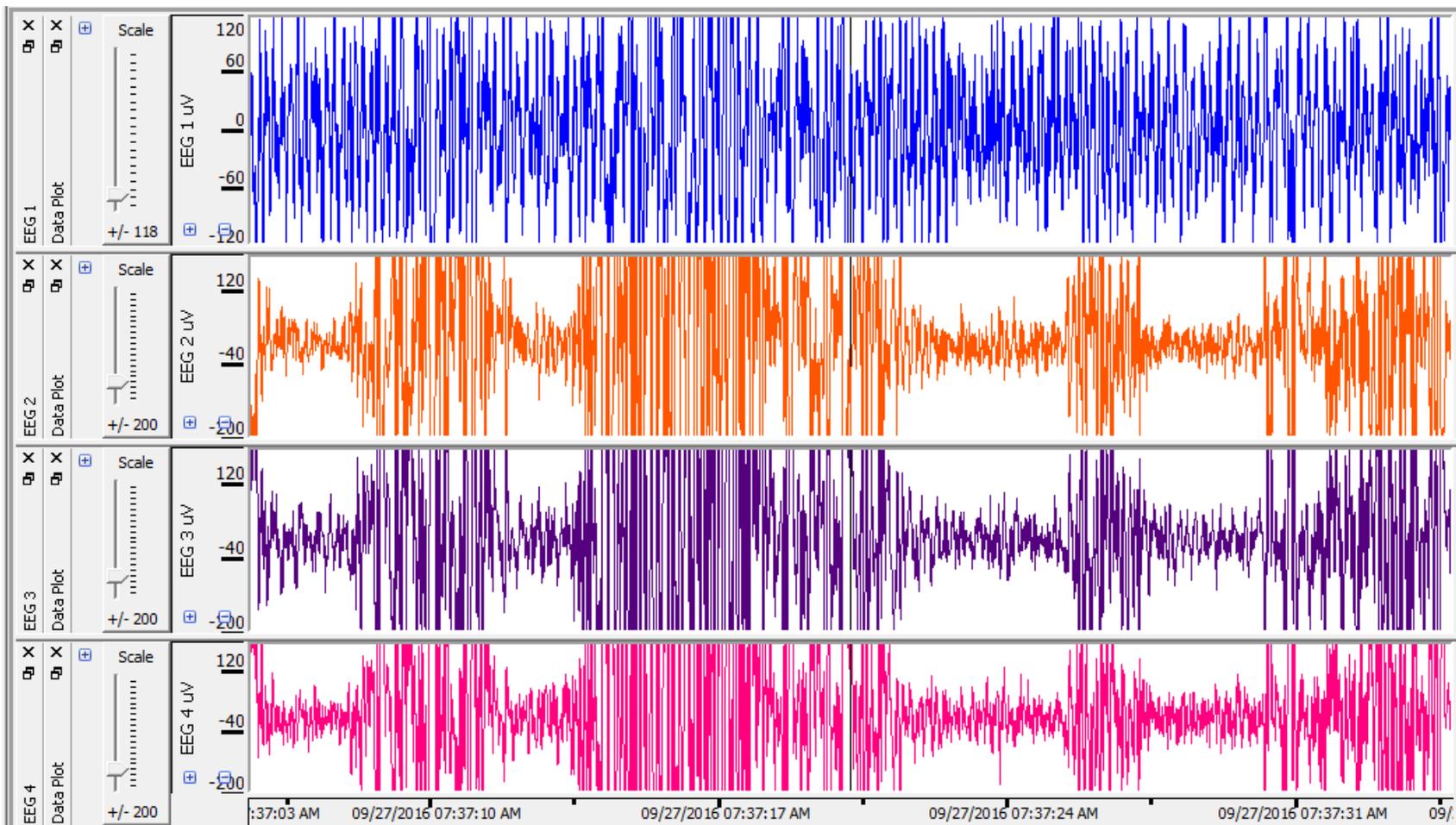


Figura 39. Representação ilustrativa do perfil eletroencefalográfico de um sujeito experimental epiléptico (tratado com salina) com detecção de descargas epileptiformes sincronizadas (Pinnacle Technologies). EEG 1 e 2: A montagem referencial dos eletrodos intrahipocampais bilaterais e bipolar dos eletrodos corticais; EEG 3 (parietal) e 4 (occipital): gera as derivações observadas separadamente em cada um dos quatro canais de aquisição.

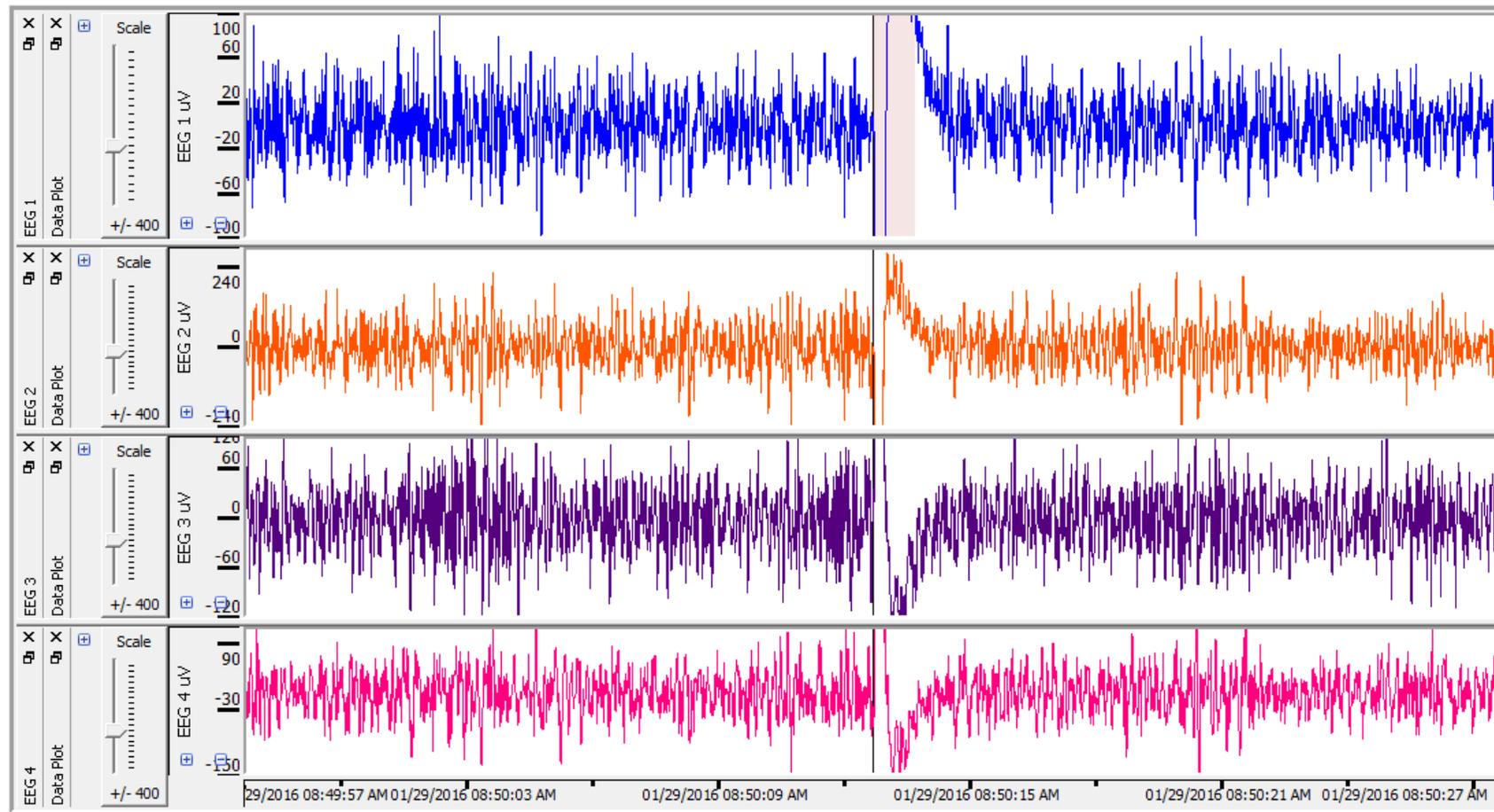


Figura 40. Representação ilustrativa do perfil eletroencefalográfico de um sujeito experimental epiléptico (tratado com DZP) com detecção de descargas epileptiformes sincronizadas (Pinnacle Technologies). EEG 1 e 2: A montagem referencial dos eletrodos intrahipocampais bilaterais e bipolar dos eletrodos corticais; EEG 3 e 4: gera as derivações observadas separadamente em cada um dos quatro canais de aquisição.

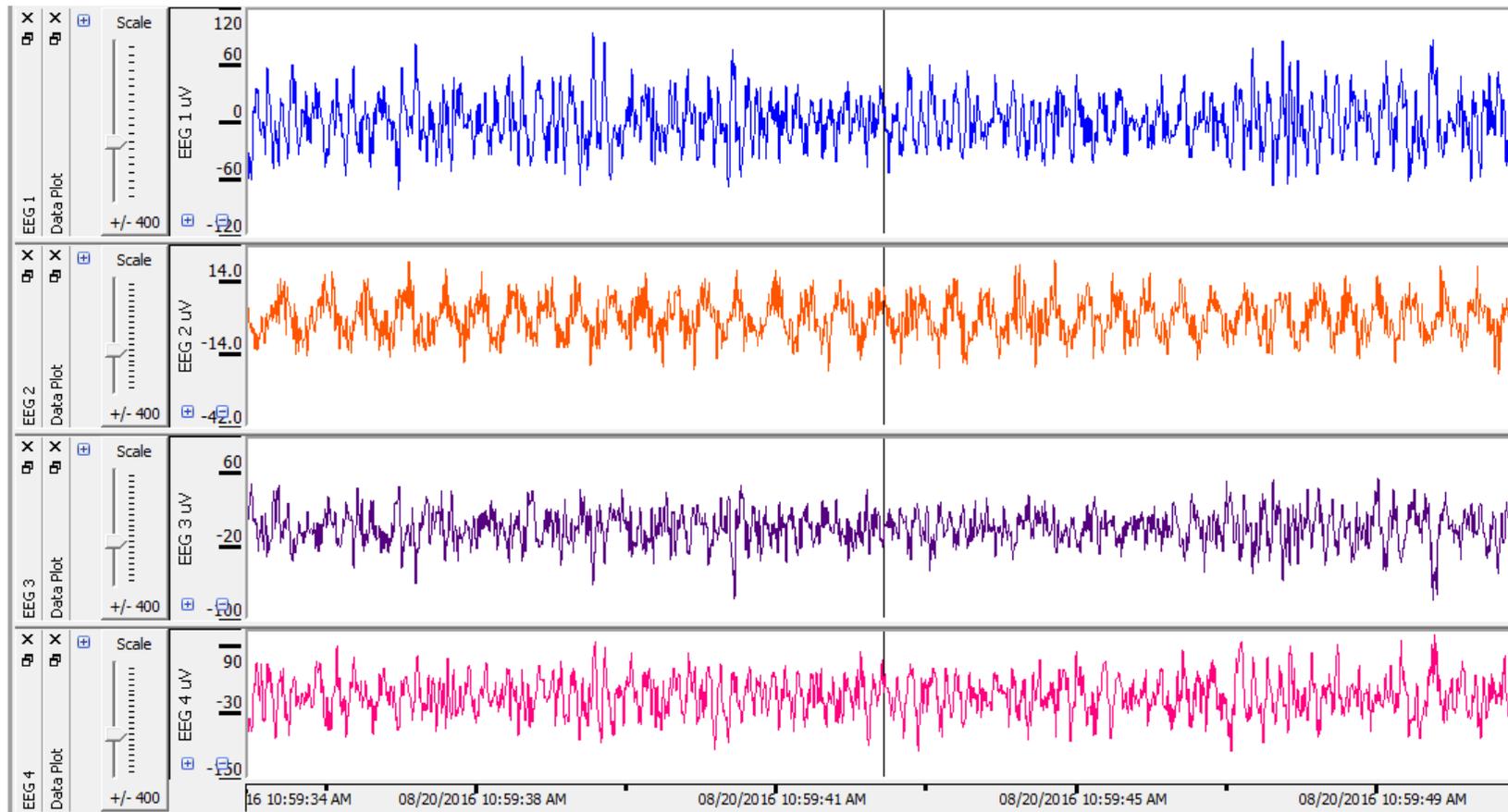
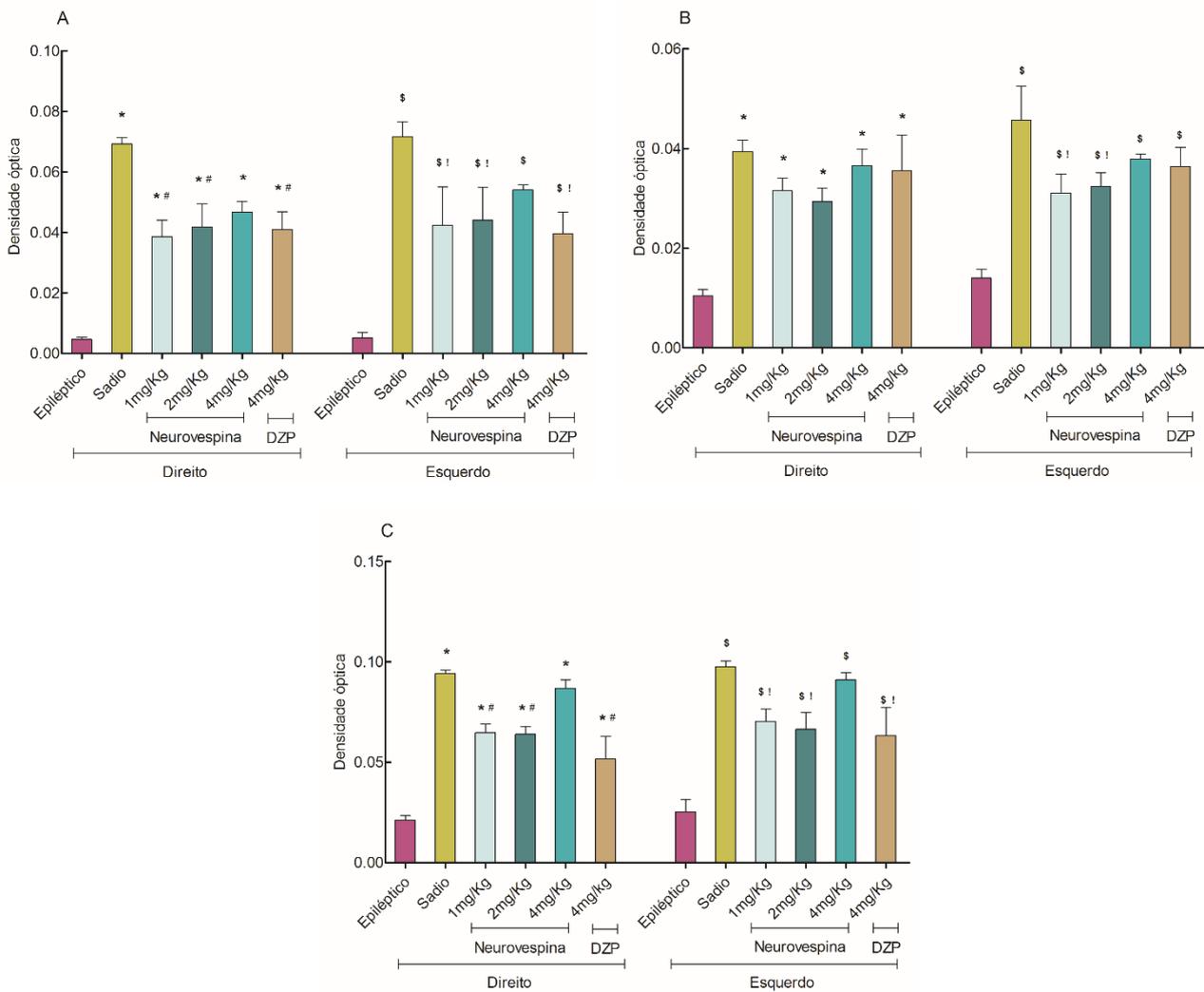


Figura 41. Representação ilustrativa do perfil eletroencefalográfico de um sujeito experimental epiléptico (tratado com a De_{90} do peptídeo neurovespina) sem detecção de descargas epileptiformes sincronizadas (Pinnacle Technologies). EEG 1 e 2: A montagem referencial dos eletrodos intrahipocâmpais bilaterais e bipolar dos eletrodos corticais; EEG 3 e 4: gera as derivações observadas separadamente em cada um dos quatro canais de aquisição.

4.6. Avaliação do Dano Neural no modelo Antiepiléptico

Nas figuras 42 a 46 estão representados os resultados obtidos quanto à integridade das camadas de células piramidais das regiões CA1 e CA3 e da camada de células granulares do Giro Denteado (GD), após o tratamento com o peptídeo neurovespina, salina ou DZP durante o período crônico.

Na análise da densidade óptica, os tratamentos com o peptídeo em todas as doses testadas e com o DZP diminuíram significativamente a morte de neurônios nas camadas CA3, CA1 e GD, nos lados direito e esquerdo da formação hipocampal, quando comparados com o grupo epiléptico (Figura 42).



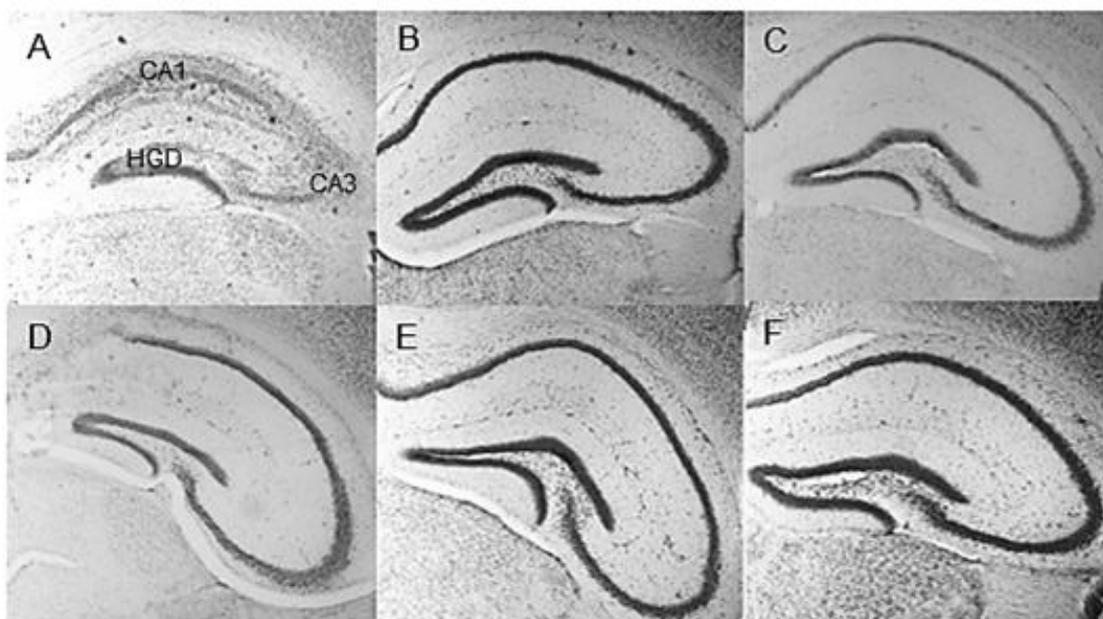


Figura 43. Imagens das secções coronais (50 μ m) da formação hipocámpal de camundongos (aumento de 40x), mostrando a organização das camadas celulares, submetidas à técnica de coloração de Nissl. (A) Epiléptico (nota-se uma desorganização e uma perda celular evidente em todas as regiões da formação hipocámpal). (B) Sadio. (C) DZP. (D) 1 mg/Kg do peptídeo neurovespina. (E) 2 mg/Kg do peptídeo neurovespina. (F) 4 mg/Kg do peptídeo neurovespina.

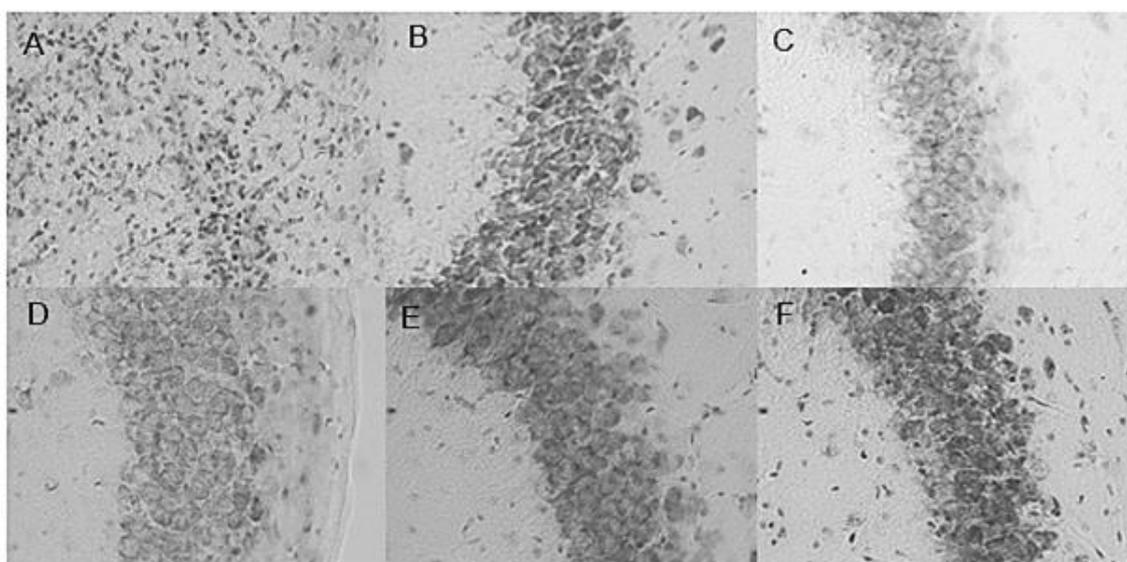


Figura 44. Imagens das secções coronais (50 μ m) da camada piramidal da região CA3 da formação hipocámpal de camundongos, mostrando a sobreposição de células (aumento de 400x), submetidas à técnica de coloração

de Nissl. (A) Epiléptico(B) Sadio. (C) DZP. (D) 1 mg/Kg do peptídeo neurovespina. (E) 2 mg/Kg do peptídeo neurovespina. (F) 4 mg/Kg do peptídeo neurovespina.

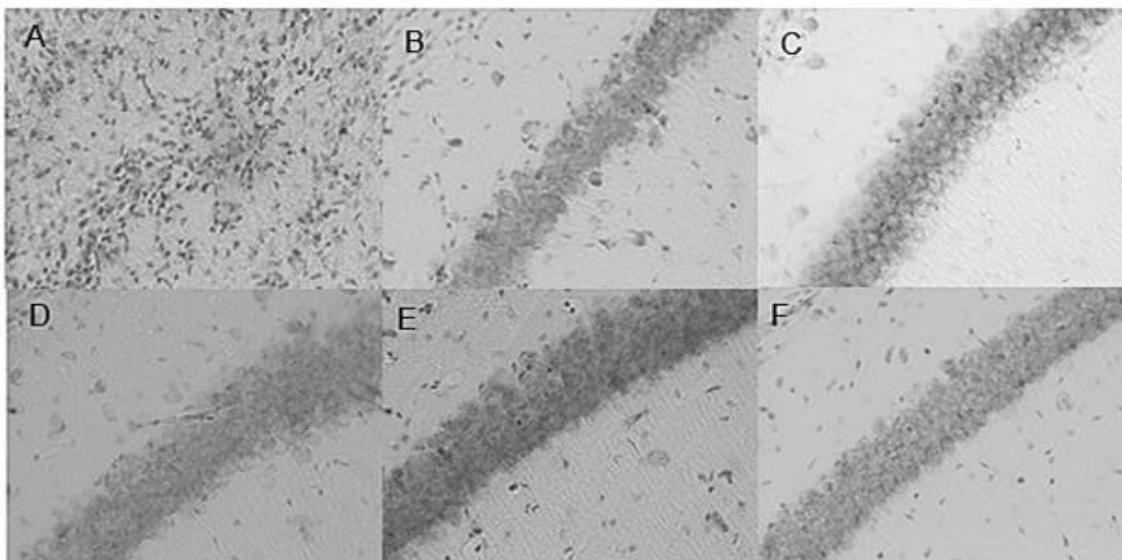


Figura 45. Imagens das secções coronais (50 μ m) da camada piramidal da região CA1 da formação hipocampal de camundongos, mostrando a sobreposição de células (aumento de 400x), submetidas à técnica de coloração de Nissl. (A) Epiléptico. (B) Sadio. (C) DZP. (D) 1 mg/Kg do peptídeo neurovespina. (E) 2 mg/Kg do peptídeo neurovespina. (F) 4 mg/Kg do peptídeo neurovespina.

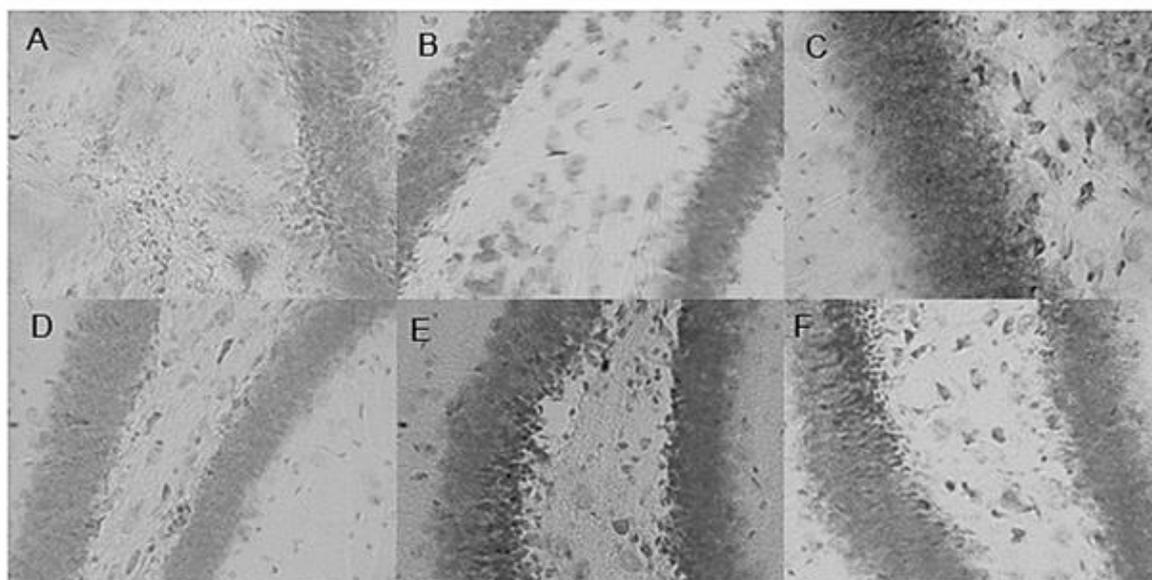


Figura 46. Imagens das secções coronais da camada de células granulares do giro dentado da formação hipocampal de camundongos (aumento de 400x), submetidas à técnica de coloração de Nissl. (A) Epiléptico. (B) Sadio. (C) DZP.

(D) 1 mg/Kg do peptídeo neurovespina. (E) 2 mg/Kg do peptídeo neurovespina.
(F) 4 mg/Kg do peptídeo neurovespina.

4.7. Avaliação da atividade neuroprotetora do peptídeo neurovespina

Para a avaliação comportamental das CREs, a primeira hora de cada dia de filmagem obtida durante o período crônico do modelo de ELT induzido por pilocarpina foi descartada da análise, visto que, os animais ficam muito agitados devido à manipulação.

As análises foram divididas nos seguintes parâmetros: tempo (em segundos), número e categorização das crises apresentadas, segundo a tabela 4. Todos os registros das filmagens foram realizados por dois pesquisadores treinados com concordância superior a 95%.

4.7.1. Tempo de duração das crises epiléticas

A Figura 47 ilustra o tempo (segundos), durante todo o período crônico do modelo, em que os animais apresentaram CERs [$F_{(5,33)} = 7.787$; $P = 0,0002$], quando tratados durante o período latente. Diferenças significativas foram obtidas entre o grupo epilético e os grupos: sadio e neurovespina nas doses de 4 e 8 mg/Kg, $p < 0,01$.

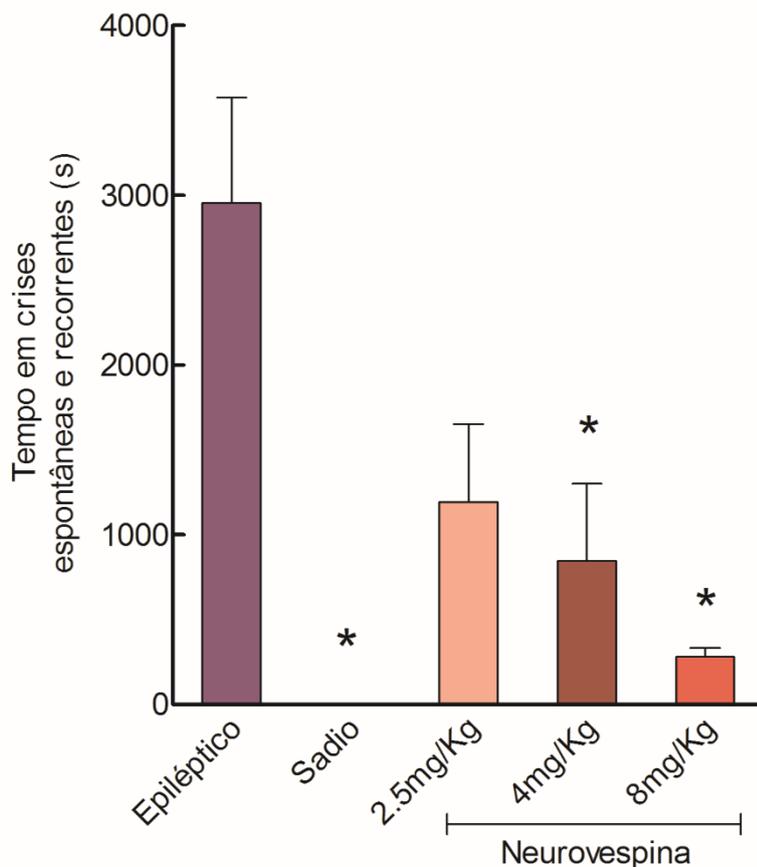


Figura 47. Tempo (segundos) de CERs durante todo período crônico após o tratamento durante a epileptogênese (período latente do modelo). Os valores representam médias \pm EPM. Todos os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste Tukey-Kramer, [$F_{(5,33)} = 7.787$; $P = 0,0002$].

(*) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo epilético ($p < 0,001$).

4.7.2. Número de crises epiléticas

A Figura 48 representa o resultado obtido quanto ao número de CERs apresentadas pelos sujeitos experimentais, durante todo período crônico [$F_{(5,33)} = 13.41$; $P = <0,0001$] após o tratamento durante a epileptogênese. Diferenças significativas foram obtidas entre o grupo epilético e os grupos: sadio e neurovespina nas doses de 4 e 8 mg/Kg ($p < 0,05$).

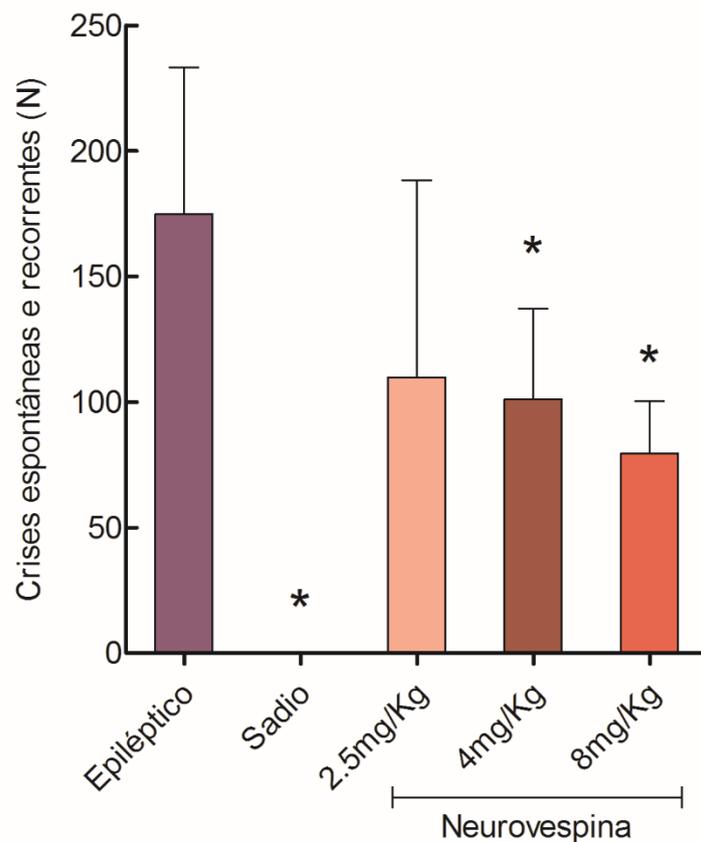


Figura 48. Número de CERs durante todo período crônico após o tratamento durante a epileptogênese (período latente do modelo). Os valores representam médias \pm EPM. Todos os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste Tukey-Kramer, [$F_{(5,33)} = 13.41$; $P = <0,0001$].

(*) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo epilético ($p < 0,001$).

4.7.3. Classe de severidade de crises epiléticas

Os resultados obtidos quanto à classe das CERs apresentadas pelos animais durante o período crônico do modelo após o tratamento durante a epileptogênese, estão representados na figura 49. A análise foi feita de acordo com a tabela de classificação de crises límbicas de Racine (1972) modificada por Shibley e Smith (2002) (Tabela 4).

Quanto ao grau de severidade das CERs, o teste de Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn revelaram que o tratamento com o peptídeo amenizou a severidade das crises [K = 66.77; $p < 0,0001$].

Diferenças significativas foram obtidas entre o grupo epiléptico e os grupos sadio e neurovespina na dose de 8 mg/Kg ($p < 0,05$).

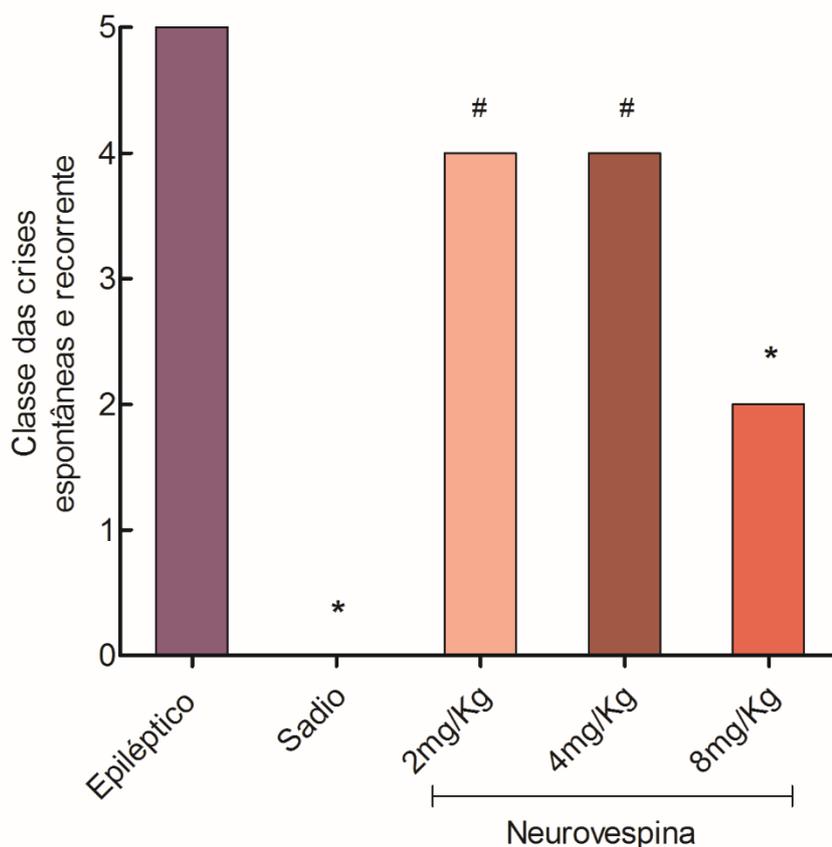


Figura 49. Classe de severidade das CERs após o tratamento durante a epileptogênese (período latente do modelo), de acordo com a classificação de crises límbicas de Racine (1972) modificada por Shibley e Smith (2002), observadas durante o período crônico. Os valores representam **medianas**. Todos os dados foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn, sendo considerado $p < 0,05$.

(*) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo epiléptico ($p < 0,001$).

(#) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo sadio ($p < 0,001$).

4.8. Avaliação do Dano Neural no modelo Neuroprotetor

Nas figuras 50 a 54 estão representados os resultados obtidos quanto à integridade das camadas de células piramidais das regiões CA1 e CA3 e da camada de células granulares do Hilus do Giro Denteado (HGD), após o tratamento com o peptídeo neurovespina ou salina, durante o período latente do modelo de ELT induzido por pilocarpina.

Na análise da densidade óptica, o tratamento com o peptídeo na dose de 8 mg/Kg diminuiu significativamente a morte de células nas camadas CA3, CA1 e HGD enquanto a dose de 4 mg/Kg reduziu significativamente a morte celular nas camadas CA3 e CA1 nos lados direito e esquerdo da formação hipocampal, quando comparado com o grupo epiléptico (Figura 50).

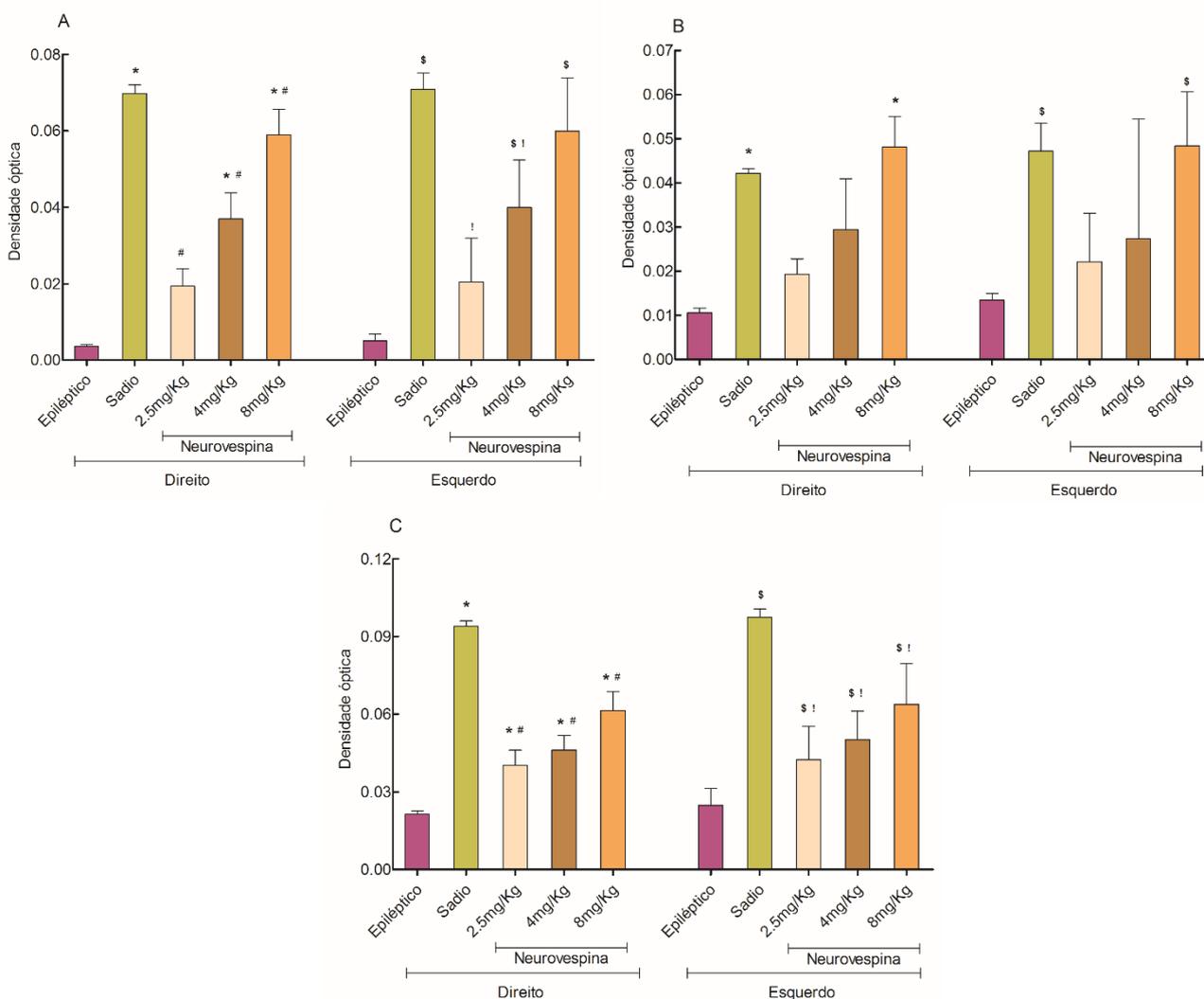


Figura 50. Densidade óptica obtida dos dois hemisférios cerebrais, em três regiões da formação hipocampal: (A) Camada de células piramidais de CA3 [$F_{(5,25)} = 30.59$; $P < 0,0001$]. (B) Camada de células piramidais de CA1 [$F_{(5,25)} = 5.37$; $P < 0,0001$]. (C) Camada de células granulares do Hilus do Giro Denteado [$F_{(5,25)} = 27.21$; $P < 0,0001$].

Os dados passaram pelo teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov e foram submetidos à análise de variância ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste Tukey-Kramer, considerando-se $p < 0,05$.

(*) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo epiléptico no hemisfério direito.

(#) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo sadio no hemisfério direito.

(\$) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo epiléptico no hemisfério esquerdo.

(!) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo sadio no hemisfério esquerdo.

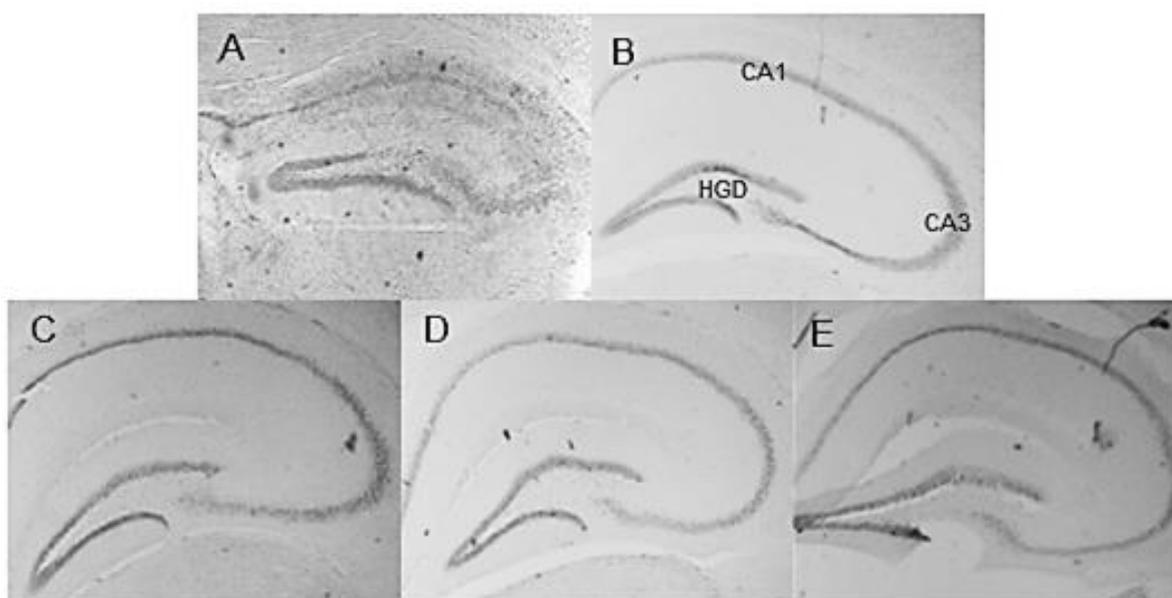


Figura 51. Imagens das secções coronais (50 μ m) da formação hipocampal de camundongos (aumento de 40x), mostrando a organização das camadas celulares, submetidas à técnica de coloração de Nissl. (A) Epiléptico (nota-se uma desorganização e uma perda celular evidente em todas as regiões da formação hipocampal). (B) Sadio. (C) 2.5 mg/Kg do peptídeo neurovespina. (D) 4 mg/Kg do peptídeo neurovespina. (E) 8 mg/Kg do peptídeo neurovespina.

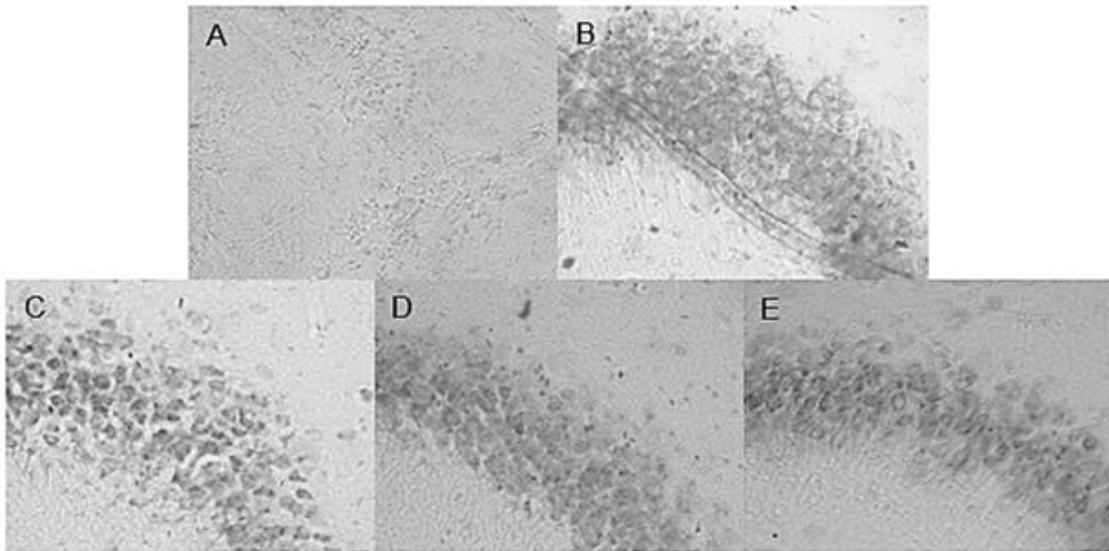


Figura 52. Imagens das secções coronais da camada piramidal da região CA3 da formação hipocampal de camundongos (aumento de 400x), mostrando a sobreposição de células, submetidas à técnica de coloração de Nissl. (A) Epiléptico. (B) Sadio. (C) 2.5 mg/Kg do peptídeo neurovespina. (D) 4 mg/Kg do peptídeo neurovespina. (E) 8 mg/Kg do peptídeo neurovespina.

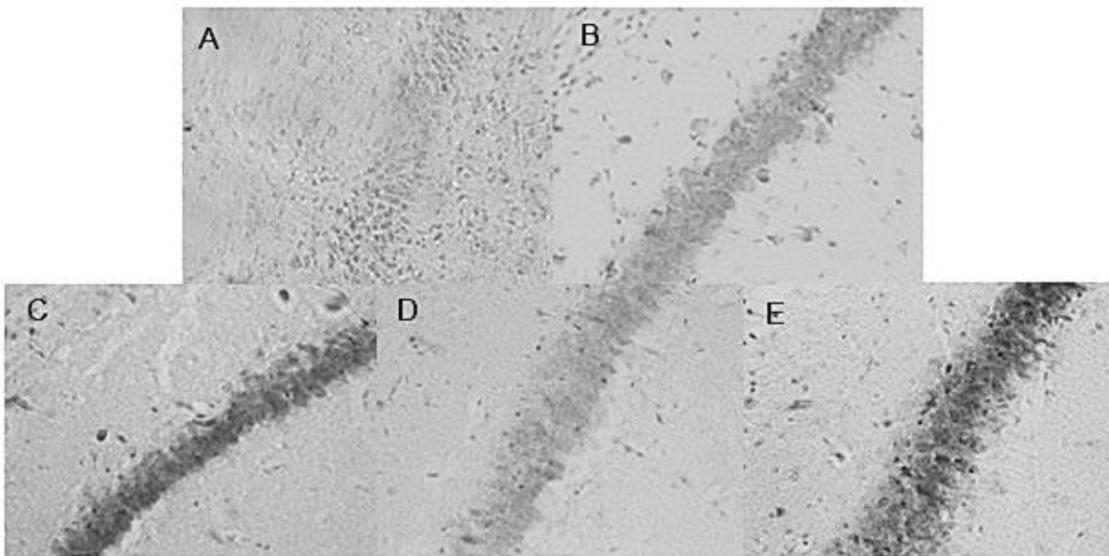


Figura 53. Imagens das secções coronais da camada piramidal da região CA1 da formação hipocampal de camundongos (aumento de 400x), mostrando a sobreposição de células, submetidas à técnica de coloração de Nissl. (A) Epiléptico. (B) Sadio. (C) 2.5 mg/Kg do peptídeo neurovespina. (D) 4 mg/Kg do peptídeo neurovespina. (E) 8 mg/Kg do peptídeo neurovespina.

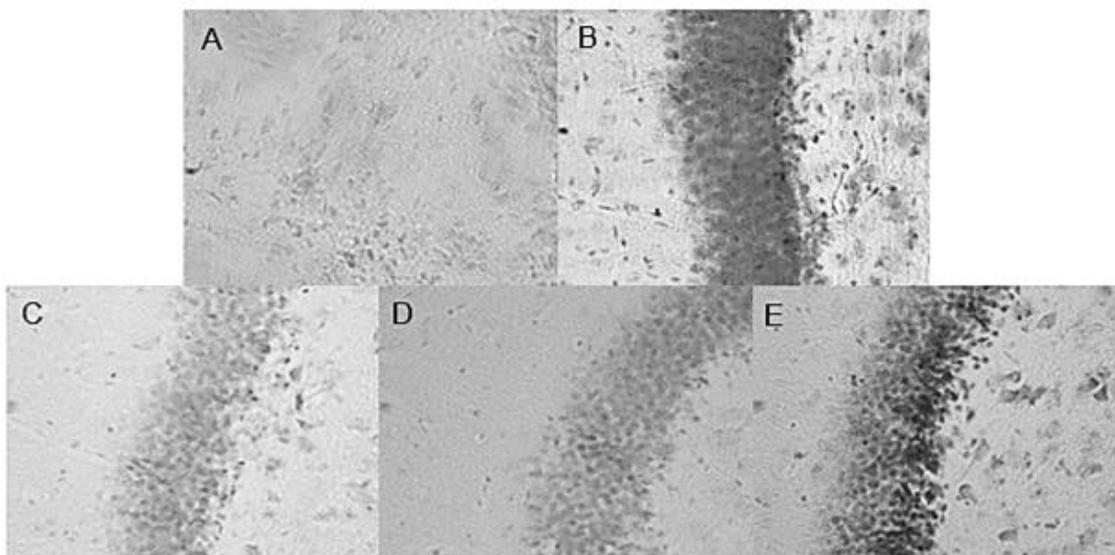


Figura 54. Imagens das secções coronais da camada de células granulares do giro dentado da formação hipocampal de camundongos (aumento de 400x), mostrando a sobreposição de células, submetidas à técnica de coloração de Nissl. (A) Epiléptico. (B) Sadio. (C) 2.5 mg/Kg do peptídeo neurovespina. (D) 4 mg/Kg do peptídeo neurovespina. (E) 8 mg/Kg do peptídeo neurovespina.

4.9. Avaliação da Toxicidade do peptídeo neurovespina

4.9.1. Citotoxicidade

Para avaliação da citotoxicidade, foi feita a correlação entre eritrócitos policromáticos (EPC) e normocromáticos (ENC) em aproximadamente 2000 células de medula óssea. Não foi observado potencial do peptídeo neurovespina em causar dano à linhagem eritrocitária, ou seja, não houve um aumento do número de ENC em relação à EPC (parâmetro utilizado para demonstrar a presença de citotoxicidade ou depressão medular), em nenhuma das doses avaliadas (Tabela 7).

Tabela 7. Resultado do teste de citotoxicidade (relação EPC/ENC) em células de medula óssea de camundongo *Swiss* tratados com o peptídeo neurovespina nas doses de 4, 8 e 12 mg/Kg, administrado via i.p 24 horas antes da eutanásia. O grupo Sadio recebeu solução salina (NaCl 150mM).

Tratamento	EPC	ENC	EPC/ENC
Controle (solução salina)	1000	807 ± 42,13	1,23
Neurovespina (4 mg/Kg)	1000	817,75 ± 46,81	1,22
Neurovespina (8 mg/Kg)	1000	856,66 ± 26,75	1,16
Neurovespina (12 mg/Kg)	1000	812,46 ± 16,75	1,26

Os dados correspondem à média ± erro padrão da média (EPM). EPC = eritrócito policromático; ECN = eritrócito normocromático. Todos os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste Tukey.

4.9.2. Genotoxicidade

Para avaliação da genotoxicidade, foram contados os micronúcleos (MN) em eritrócitos PCE e NCE em 2000 células de medula óssea.

Não foi observado potencial do peptídeo neurovespina em causar alterações cromossômicas na linhagem eritrocitária, ou seja, não houve uma quantidade acima do normal de micronúcleos em eritrócitos PCE ou NCE em nenhuma das doses avaliadas (figura 55).

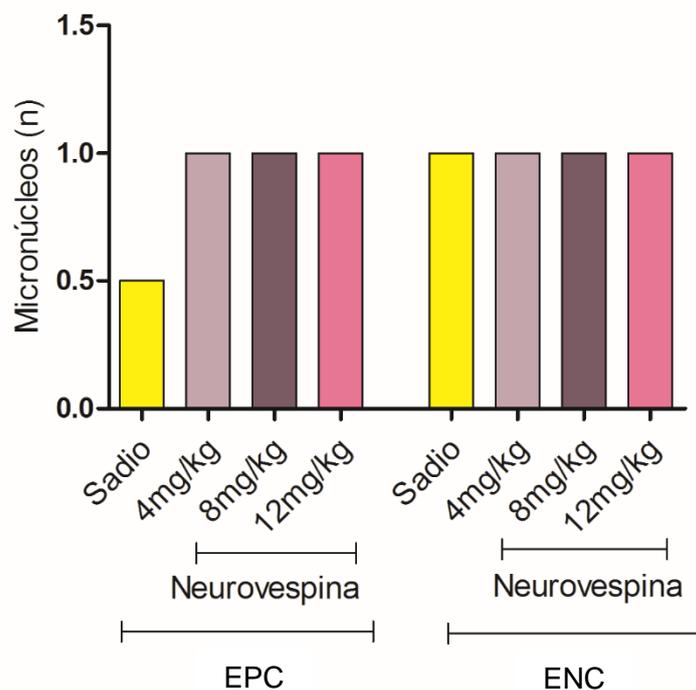


Figura 55. Micronúcleos (n) em eritrócitos EPC ou ENC. Os dados correspondem a **medianas**. PCE = eritrócito policromático; NCE = eritrócito normocromático. Os dados passaram pelo teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov e foram submetidos à análise de variância ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste Tukey-Kramer, considerando-se $p < 0,05$. ($K = 3.560$).

4.9.3. Hematotoxicidade

Para avaliação da hematotoxicidade, foi feita a análise do sangue obtido em um hematímetro automatizado para contagem de eritrócitos e leucócitos, dosagem do hematócrito, hemoglobina, volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e hemoglobina corpuscular média (HCM) (Tabela 8).

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em nenhum dos parâmetros avaliados.

Tabela 8. Parâmetros hematológicos para camundongos machos.

Parâmetros	Controle	4 mg/Kg do peptídeo neurovespina	8 mg/Kg do peptídeo neurovespina	12 mg/Kg do peptídeo neurovespina
Leucócitos (mm ³)	6,08 ± 2,15	6,95 ± 2,45	4,4 ± 1,36	7,74 ± 2,95
Eritrócitos (x10 ⁶ mm ³)	9,16 ± 3,23	9,2 ± 3,25	8,5 ± 3,0	10,63 ± 3,75
Hemoglobina (g/dL)	13,8 ± 5,8	14,4 ± 5,1	12,4 ± 4,3	15 ± 3,6
Hematócrito (%)	37 ± 1,32	35 ± 1,21	33 ± 1,14	39 ± 1,40
VCM (fL)	36 ± 1,3	37 ± 1,3	37 ± 1,3	37 ± 1,3
HCM (pg)	15 ± 0,53	16 ± 0,56	15 ± 0,51	15 ± 0,53
CHCM (%)	40,8 ± 1,44	41,6 ± 1,47	38 ± 1,34	40,3 ± 1,42
Plaquetas (x10 ³ / µL)	458 ± 78,5	414 ± 57,4	394 ± 56,7	517 ± 36,8

VCM: Volume corpuscular médio, HCM: Hemoglobina corpuscular média, MCHC: Concentração de hemoglobina corpuscular médio.

5. DISCUSSÃO

Desde 1937, os modelos animais têm sido a base para identificação de novas terapias para o tratamento da epilepsia sintomática (Bialer; White, 2010; Löscher; Schmidt, 2011; Löscher *et al.*, 2013; White; Löscher, 2014). A descoberta bem-sucedida de vários novos antiepilépticos desde a década de 1990 corrobora o papel dos modelos experimentais na identificação de novos fármacos promissores (Bialer; White, 2010; White; Löscher, 2014).

Esses modelos são utilizados para testar a segurança e eficácia de novos compostos antes dos ensaios em seres humanos (Golyala; Kwan, 2016) e visa identificar novos FAE, avaliar a atividade antiepiléptica contra diferentes tipos de crises ou epilepsia, investigar se o novo fármaco tem vantagens em relação aos existentes, caracterizar a eficácia pré-clínica durante a administração crônica, demonstrar como a epilepsia pode levar a disfunções cerebrais crônicas e estimar concentrações plasmáticas nos primeiros ensaios clínicos (Löscher, 2011).

Além disso, são úteis para estudar a epileptogênese, sendo cruciais na descoberta de terapias que possam impedir ou modificar o desenvolvimento da epilepsia após lesões cerebrais (Löscher, 2011; White; Löscher, 2014; Barker-Haliski *et al.*, 2015).

Até o momento, nenhum dos FAE disponíveis foi capaz de prevenir a epileptogênese (White; Löscher, 2014; Barker-Haliski *et al.*, 2015) e reduzir significativamente a prevalência de epilepsias refratárias ao tratamento e os efeitos adversos (Löscher; Schmidt, 2011; Stables *et al.*, 2012).

Um estudo realizado com cinco mil pacientes europeus, que faziam uso de FAE rotineiramente, verificou que 88% dos pacientes apresentavam pelo menos um efeito adverso (Perucca *et al.*, 2009).

Esses efeitos adversos variam desde disfunções no SNC, prejuízos na memória, tremores, fadiga, sintomas gastrointestinais, osteoporose, depressão, náuseas, alterações de peso, podendo levar ao óbito por anemia aplástica ou falência hepática (Carpay *et al.*, 2005; Perucca *et al.*, 2009; Luoni *et al.*, 2011). Ademais, diversos estudos têm sugerido que os FAEs também estão associados a efeitos psicotrópicos (Ketter *et al.*, 1996; Mula *et al.*, 2003; Weintraub *et al.*, 2007; Piedad *et al.*, 2012).

Em 2014, Kinderen e colaboradores, através de um estudo sobre o custo gerado para as famílias de pacientes com epilepsia e para os governos com gastos médicos relacionados aos efeitos adversos dos FAEs, demonstraram que do ponto de vista econômico, o controle dos efeitos adversos é tão importante quanto o controle das crises em relação ao tratamento de pacientes com epilepsia, uma vez que, esse custo é extremamente alto, não só para a sociedade, mas também para os pacientes.

Na busca por novos FAEs mais eficazes e com menores taxas de efeitos adversos, a avaliação deve ser mais aprimorada e preferencialmente ocorrer em modelos animais com epileptogênese (Löscher ; Brandt, 2010; White; Löscher, 2014). Em especial, porque o cérebro epiléptico apresenta alterações substanciais em sua estrutura e função, permitindo que esses modelos sejam estreitamente relacionados com a epilepsia humana (Löscher, 2011).

Entre os inúmeros modelos disponíveis, o modelo de ELT pós-status epilepticus (SE), devido ao período latente necessário para desenvolver crises

espontâneas e recorrentes (CERs), representa um dos três mais utilizados na busca de terapias antiepilépticas e antiepileptogênicas (White, 2012; White; Löscher, 2014; Barker-Haliski *et al.*, 2015).

Nesse modelo, a ocorrência de CERs (Sharma *et al.*, 2007; Rattka *et al.*, 2013; Barker-Haliski *et al.*, 2015) se correlaciona em grande parte com a neuropatologia associada a ELT humana (Löscher, 2011; Sadeghi *et al.*, 2016), tais como: alterações histológicas, eletrofisiológicas, bioquímicas, farmacológicas e comportamentais (Turski *et al.*, 1984, Berkeley *et al.*, 2002; Shibley; Smith, 2002; Löscher, 2011; Sadeghi *et al.*, 2016). Ademais, ocorre neurodegeneração nas camadas CA1 e CA3 da formação hipocampal e dispersão das células granulares no giro dentado (Houser, 1990; Mathern *et al.*, 1997; Bertram, 2009).

Apesar do lançamento quase anual de novos FAE nos últimos 25 anos, a epilepsia permanece descontrolada em mais de dois terços dos pacientes (Golyala; Kwan, 2016), evidenciando a necessidade da continuação da busca de novos fármacos. Além disso, a ELT está associada à farmacorresistência em mais de dois terços dos casos, reforçando a necessidade da busca por novos fármacos. (Semah *et al.*, 1998; Römermann *et al.*, 2015).

Nesse contexto, o presente estudo utilizou o modelo animal com indução de epileptogênese pela pilocarpina, a fim de aprofundar o conhecimento acerca da ação antiepiléptica e neuroprotetora do peptídeo neurovespina.

Na avaliação da atividade antiepiléptica, os animais foram tratados diariamente durante o período crônico do modelo. Nesse período, os animais já se tornaram epiléticos e apresentam CERs. Todas as doses testadas do

peptídeo neurovespina foram capazes de promover uma potente atividade antiepiléptica.

Esse efeito pode ser detectado por diferentes focos de avaliação no modelo: duração (s), quantidade (n) e classe das CERs, sempre fazendo a comparação com os grupos: epilético, DZP e sadio.

Nesse modelo, à medida que as crises tornam-se mais frequentes, os danos vão aumentando progressivamente, visto que, as crises são responsáveis pelo aumento do dano neuronal. Sendo assim, uma avaliação do efeito do tratamento com o peptídeo no decorrer de cada dia do período crônico foi de extrema importância.

Nessa avaliação, constatou-se que as CERs foram se agravando com o passar dos dias. No entanto, o peptídeo neurovespina, nas doses de 2 e 4 mg/Kg, mantiveram seu efeito antiepiléptico durante todos os dias, diminuindo, significativamente, a duração, a quantidade e a classe de severidade das crises. Interessantemente, o fármaco DZP não apresentou eficiência similar no decorrer dos dias de observação.

O fármaco DZP foi escolhido devido à via de administração ser a mesma (injetável) e por ser bastante utilizado na prática clínica. Além disso, sabe-se que não existem fármacos antiepilépticos disponíveis que são eficientes no controle total de crises espontâneas e recorrentes, tornando a comparação praticamente inviável.

Na tentativa de elucidar o tempo de ação do peptídeo no organismo do camundongo, foi feita uma avaliação logo após a sua administração (fase I) e após um período de 5 horas (fase II).

Nas doses de 1 e 2 mg/Kg, os animais começaram a apresentar CERs na fase I após o 10º e 12º dia do período crônico, respectivamente, no entanto, a duração, a quantidade e a classe de severidade das crises foram menores em relação à fase II.

Na dose de 4 mg/Kg, os camundongos não apresentaram crises na fase I. Esses resultados demonstram que o peptídeo, a partir de 5 horas da administração, começa a perder sua efetividade. Provavelmente, isso ocorre devido à sua metabolização e eliminação. Um tratamento mais eficiente pode ser realizado aumentando o número de doses do peptídeo, por exemplo, utilizando três doses diárias, visto que, os roedores geralmente metabolizam rapidamente a maioria dos fármacos, o que encurta a meia-vida dos FAE, havendo a necessidade de múltiplas administrações diárias do composto.

Na avaliação da diferença de densidade óptica, devido a secção de 50 µm apresentar grande sobreposição de células, optou-se pelo cálculo da densidade de células. A análise de densidade de neurônios na formação hipocampal demonstrou diferenças significativas em todas as regiões e doses avaliadas em comparação com os animais doentes tratados com salina (grupo epiléptico).

Nesse grupo de animais epiléticos, todas as camadas sofreram perda celular e desorganização da citoarquitetura evidentes após o SE, indicando que o modelo experimental proposto foi adequado, visto que, produziu alterações morfológicas distintas quando comparado aos animais que não foram submetidos ao insulto inicial (grupo sadio).

Com o intuito de avaliar o desempenho do peptídeo durante a fase I do modelo antiepilético (primeiras cinco horas após administração dos

compostos), foi utilizada a análise eletroencefalográfica, que é muito rica em informações, tais como foco epilético, sincronização e tipos de ondas e complementa as observações comportamentais.

Nessa avaliação, após a obtenção dos dados comportamentais no modelo antiepilético, foi feita uma curva dose-reposta, onde foi considerada a proteção contra crises: quantidade de animais que não apresentaram crises nas primeiras 5 horas após o tratamento – Fase I do modelo e que não apresentaram crise máxima (classe 5 da tabela 4) durante a fase II do modelo. A partir desses dados, foi obtida a DE_{90} do peptídeo (3.43 mg/Kg). Essa foi a dose utilizada para avaliação dos registros eletroencefalográficos, pois representa um único ponto dentro da curva dose-resposta.

Na análise do EEG, os camundongos que foram submetidos ao insulto inicial e que foram tratados com salina durante o período crônico, apresentaram crises eletroencefalográficas durante todos os dias avaliados do período amostral. Os camundongos tratados com DZP também apresentaram de crises. Diferentemente, os animais sadios e os tratados com a DE_{90} do peptídeo não apresentaram crises durante o período avaliado, corroborando os dados obtidos na avaliação comportamental, ou seja, o peptídeo neurovespina é capaz de proteger os animais contra CERs durante a fase I do modelo.

Ainda em relação ao modelo de epileptogênese induzido por pilocarpina, após o insulto inicial, é sabido que a epilepsia adquirida é seguida por um "período latente" (Löscher, Brandt, 2010; White, 2012; White; Löscher, 2014). Esse período latente proporciona uma "janela de oportunidade" em que uma potencial terapêutica neuroprotetora poderia ser administrada com o intuito de

prevenir, retardar ou modificar o processo epileptogênico desencadeado pelo insulto inicial (White; Löscher, 2015).

Nesse sentido, para avaliar a atividade neuroprotetora do peptídeo, os animais foram tratados diariamente durante o período latente do modelo. Os resultados demonstraram que as doses de 4 e 8 mg/Kg foram capazes de promover uma notória atividade antiepileptogênica. Esse efeito pode ser detectado por diferentes focos do modelo: duração (s), quantidade (n) e classe de severidade das CERs, avaliados durante o período crônico do modelo, sempre comparando com os grupos epilético e sadio.

Nessa avaliação, em comparação com o grupo epilético, constatou-se que a duração, a quantidade e as classes das CERs foram significativamente menores no grupo tratado com a dose de 8 mg/Kg, enquanto que a dose de 4 mg/Kg reduziu significativamente a duração a quantidade das CERs. Ou seja, apesar da diminuição, os animais apresentaram crises durante o período crônico.

De acordo com White e Löscher (2015), o tratamento ideal com o composto que está sendo estudado deve começar imediatamente após o início do SE e continuar durante o período latente. No entanto, o tratamento foi administrado 5 horas após o SE ter sido induzido. O SE ocasiona danos irreversíveis na formação hipocampal, ou seja, uma administração do peptídeo imediatamente após o início do SE poderia ter diminuído esses danos iniciais e causado um efeito neuroprotetor mais proeminente. No entanto, dificilmente os pacientes conseguem o tratamento imediatamente após o insulto, ou seja, esse tempo foi escolhido fazendo referência ao tempo entre um possível insulto e a possibilidade do início do tratamento pelo paciente.

Além disso, como supracitado, os roedores geralmente metabolizam rapidamente a maioria dos fármacos. Apesar de a administração ter sido diária, só foi feita uma vez por dia. Talvez se a administração tivesse sido feita em várias doses diárias, a atividade neuroprotetora fosse mais eficiente.

Existem pouquíssimos estudos que examinam se o composto com atividade antiepilética também seria capaz de modificar a progressão da epilepsia, ou seja, se teria um efeito neuroprotetor (White; Löscher, 2015).

Um estudo com a rapamicina, um composto natural obtido a partir da bactéria *Streptomyces hygroscopicus*, demonstrou que esse composto possuía uma atividade antiepilética quando avaliado em dois modelos animais pós SE (Zeng *et al.*, 2009; Buckmaster *et al.*, 2009). No entanto, Heng e colaboradores (2013) demonstraram que ela não era capaz de modificar o desenvolvimento da doença, ou seja, não possuía um efeito neuroprotetor.

Alguns FAE disponíveis no mercado, particularmente valproato e topiramato, demonstraram atividade neuroprotetora em modelos animais (Löscher; Schmidt, 2012), ou seja, a pesquisa da atividade epilética associada à atividade neuroprotetora é de extrema importância porque representariam duas alternativas terapêuticas, uma para os pacientes portadores de epilepsia de difícil controle e outra para indivíduos com fatores de risco para desenvolver a doença.

Com o intuito de estimar a quantidade de neurônios presentes na formação hipocampal após o tratamento com o peptídeo no período latente, foi feita a análise da diferença de densidade óptica entre as camadas celulares e as regiões de fundo das secções de tecido encefálico coradas com Nissl. Essa análise demonstrou diferenças significativas em todas as regiões avaliadas na

dose de 8 mg/Kg quando comparado com os animais doentes tratados com salina (grupo epiléptico). Nas outras doses também foram observadas uma redução do dano neural.

Ademais, como o peptídeo neurovespina mostrou-se muito promissor e poderá tornar-se um medicamento no futuro, estudos não clínicos de segurança farmacológica de dose única (aguda) foram conduzidos.

Para estudos de segurança farmacológica, um parâmetro essencial é a avaliação da hematotoxicidade, realizada através da análise do sangue periférico, obtida por meio de hemograma completo (Bloom; Brandt, 2008).

Outro teste essencial nesse estudo é o de proliferação de eritrócito em medula óssea, sendo utilizados para avaliar a toxicidade de agentes químicos ou outras substâncias sobre a linhagem eritrocítica tanto de animais experimentais como de seres humanos (Pereira *et al.*, 2004).

O teste de micronúcleo (genotoxicidade) em eritrócitos policromáticos (EPC) e normocromáticos (ENC) de roedores é realizado para avaliar se um dado agente apresenta potencial de causar danos cromossômicos. Durante a divisão celular, os micronúcleos (MN), que são estruturas resultantes de cromossomos inteiros ou fragmentos cromossômicos, não conseguem se ligar às fibras do fuso e, assim, são excluídos do núcleo das células filhas, permanecendo no citoplasma das células (Ribeiro, 2003).

O teste do micronúcleo é amplamente aceito pelas agências internacionais e instituições governamentais, sendo preconizado pelo ANVISA, como requisito para avaliação da toxicidade para registro de produtos químicos, farmacêuticos ou usados no meio ambiente (Ribeiro, 2003; Vasquez, 2010).

Na avaliação de micronúcleos (MN) em eritrócitos policromáticos (EPC) e normocromáticos (ENC) de camundongos, 24h após a administração de diferentes doses do peptídeo neurovespina (4, 8 e 12mg/Kg), não foram observadas diferenças significativas entre os números de MNs detectados nos grupos tratados e no grupo controle negativo, revelando que o composto estudado não apresenta potencial genotóxico.

Adicionalmente à genotoxicidade, o teste em medula óssea permite avaliar também a citotoxicidade do composto estudado. A toxicidade é indicada quando ocorre uma redução significativa na porcentagem de EPC (Ribeiro *et al.*, 2003).

Observou-se, no presente estudo, que os valores encontrados na relação EPC/ENC nos grupos tratados (4, 8 e 12 mg/Kg) não demonstraram redução na frequência de EPC, sendo esta relação semelhante à detectada nos grupo controle negativo. Este achado evidencia que o peptídeo neurovespina não gerou citotoxicidade na medula óssea dos camundongos.

Na avaliação dos parâmetros hematológicos, em comparação com o grupo controle, não houve alteração significativa em nenhum dos componentes após administração do peptídeo, demonstrando que o mesmo não causa hematotoxicidade. Os dados hematológicos não foram comparados aos da literatura, uma vez que, é imprescindível que cada laboratório ou biotério estabeleça o respectivo conjunto próprio de valores de referência dos animais saudáveis, pois o equipamento utilizado, a metodologia empregada, a linhagem, gênero e idade de cada espécie utilizada influenciam diretamente nos resultados obtidos (Dantas *et al.*, 2006).

6. CONCLUSÕES

O peptídeo neurovespina, em relação à avaliação da atividade antiepiléptica foi capaz de reduzir a frequência, a duração e a gravidade das crises espontâneas e recorrentes em todas as doses avaliadas. Além disso, a neurodegeneração nas regiões avaliadas da formação hipocampal também foi diminuída, demonstrando que o peptídeo pode representar uma alternativa terapêutica às epilepsias de difícil controle.

Na avaliação das crises eletroencefalográficas, a administração da DE₉₀ do peptídeo impediu que os animais apresentassem crises nas quatro primeiras horas após sua administração.

Adicionalmente, nos testes de toxicidade aguda, o peptídeo não apresentou potencial genotóxico, citotóxico ou hematotóxico, demonstrando sua segurança farmacológica. Faz-se necessário continuar os testes de toxicidade para avaliar se o composto apresenta potencial imunotóxico.

Na avaliação da atividade de evitar o desenvolvimento da doença (neuroprotetora), o peptídeo neurovespina nas doses de 4 e 8 mg/Kg foi capaz de reduzir a frequência, a duração e a gravidade das crises. Somado a isso, a neurodegeneração foi diminuída em todas as regiões analisadas da formação hipocampal, na dose de 8 mg/Kg.

Uma análise da neurodegeneração através de testes específicos de marcação neuronal, como a imunofluorescência, será essencial no futuro para corroborar os dados obtidos através da coloração de Nissl.

Sendo assim, a capacidade do composto estudado de prevenir o desenvolvimento de epilepsia em camundongos representa uma esperança futura.

De uma perspectiva translacional, as terapias eficazes na prevenção ou modificação do processo epileptogênico em modelos animais, um dia poderão ser utilizadas para a população humana com risco de desenvolver a doença, representando o "Santo Graal" da pesquisa em epilepsia.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABN (2014). Disponível em: <http://abneuro.org.br/comunicados/detalhes/662/epilepsia-como-identificar-e-prestar-os-primeiros-socorros>. Acesso em 28 de março de 2015.

Adewole, AM; Ileke, KD; Oluyede, PO (2013). **Perception and knowledge of bee venom therapy as an alternative treatment for common ailments in southwestern Nigeria**. J. Res. Sci. 9: 235-240.

Andrade-Valença, LPA; Valença, MM; Velasco, TV; Leite JP (2006). **Epilepsia do Lobo Temporal Mesial Associada à Esclerose Hipocampal**. J. Epilepsy. Clin. Neurophysiol. 12(1): 31-36.

Anvisa (2013). Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos.

Arida, RM; Scorza, FA; Peres, CA; Cavalheiro, EA (1999). **The course of untreated seizures in the pilocarpine model of epilepsy**. Epilepsy Res. 34: 99-107.

Avoli, M (2014). **Mechanisms of epileptiform synchronization in cortical neuronal networks**. Curr. Med. Chem. 21: 653–662.

Barr, A; Young, CE; Phillips, AG; Honer, WG (2006). **Selective effects of typical antipsychotic drugs on SNAP-25 and synaptophysin in the hippocampal trisynaptic pathway**. Int. J. Neuropsychopharmacol. 9(4): 457-463.

Baker, GA et al. (1997). **Quality of life of people with epilepsy: an european study**. Epilepsia. 38: 353-62.

Baptista-Saidemberg, NB et al. (2010). **Protonectin(1-6): a novel chemotactic peptide from the venom of the social wasp *Agelaia pallipes pallipes***. Toxicon. 56: 880-889.

Beate, Diehl; John, S (2015). **Temporal lobe epilepsy**. Disponível em: <http://www.epilepsysociety.org.uk/sites/default/files/attachments/Chapter13Diehl2015.pdf>

Benes, FM; Lim, B; Matzilevich, D; Subburaju, SE; Walsh, JP (2008). **Circuitry-based gene expression profiles in GABA cells of the trisynaptic pathway in schizophrenics versus bipolars**. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 105(52): 20935-20940.

Berg, AT; Berkovic, SF et. al. (2010). **Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009**. Epilepsia 51(4): 676-685.

Bekerley, JL; Decker, MB; Levey, ALC (2002). **The role of muscarinic acetylcholine receptor-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 in pilocarpine-induced seizures.** J. Neuroch. 82: 192–201.

Bertram, EH (2009). **Temporal lobe epilepsy: where do the seizures really begin?** Epilepsy Behav. 14:32–7.

Bialer, M; White, HS (2010). **Key factors in the discovery and development of new antiepileptic drugs.** Nat. Rev. Drug. Discov. 9:68–82.

Bialer, M et al. (2015). **Progress report on new antiepileptic drugs: A summary of the Twelfth Eilat Conference (EILAT XII).** Epilepsy Res. 111: 85-141.

Blümcke, I; Löbach, M; Wolf, HK; Wiestler OD (1999). **Evidence for developmental precursor lesions in epilepsy-associated glioneuronal tumors.** Microsc. Res. Tech. 46(1): 53-58.

Bogdanov, S (2015). **Bee venom: composition, health, medicine: a review.** Peptides. (1): 1-20.

Bradford, MM (1976). **A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** Anal. Biochem. 72: 248–254.

Brodie, MJ et al. (2011). **Antiepileptic drug therapy: Does mechanism of action matter?** E&B. 21: 331–34

Brodbeck, VL et al (2011). **“EEG source imaging: a prospective study in 152 operated patients,”** Brain. 134(10): 2887–2897.

Buckmaster, PS, Ingram EA, Wen X (2009). **Inhibition of the mammalian target of rapamycin signaling pathway suppresses dentate granule cell axon sprouting in a rodent model of temporal lobe epilepsy.** J Neurosci. 29: 8259-8269.

Cameron, MC; Zhan, RZ; Nadler, JV. (2011). **Morphologic integration of hilar ectopic granule cells into dentate gyrus circuitry in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy.** J Comp. Neurol. 519: 2175– 92.

Carter, JA et al. (2004). **Increased prevalence of epilepsy associated with severe falciparum malaria in children.** Epilepsia. 45: 978-981.

Carpay, JA; Aldenkamp, AP; van Donselaar, CA (2005). **Complaints associated with the use of antiepileptic drugs: results from a community-based study.** Seizure. 14(3): 198-206.

Carpio, A; Hauser, WA (2009). **“Epilepsy in the developing world,”** Curr. Neurol. Neurosci. Rep. 9(4): 319–326.

Cavalheiro,, EA *et al.* (1991). **Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures.** *Epilepsia*. 32: 778-82.

Cendes F *et al.* (2014). **Epilepsies associated with hippocampal sclerosis.** *Acta Neuropathol*. 128: 21–37.

Chang, BS; Lowenstein, DH (2003). **Epilepsy.** *N. Engl. J. Med.* 349(13): 1257-66.

Choy, WN (2001). **Regulatory Genetic toxicology tests.** In: CHOY, W.N. (Ed.). **Genetic toxicology and cancer risk assessment.** New York: Marcel Dekker. 93-113.

Clasadonte, J *et al.* (2016). **Molecular analysis of acute and chronic reactive astrocytes in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy.** *Neurob. Dis.* 91:315-25.

Coras, R; Blümcke, I (2014). **Clinico-pathological subtypes of hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy and their differential impact on memory impairment.** *Neuroscience*. 1-9.

Couto, LL; dos Anjos, LC *et al.* (2012). **Anticonvulsant and anxiolytic activity of the peptide fraction isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*.** *Pharmacogn Mag.* 8(32): 292-9.

Cross, JH (2014). **Setting the scene: definition of prolonged seizures, acute repetitive seizures, and status epilepticus. Do we know why seizures stop?** *Epileptic Disord*, 16(Suppl. 1): 2-5.

Cunha, AO *et al.* (2005). **Anticonvulsant effects of the wasp *Polybia ignobilis* venom on chemically induced seizures and action on GABA and glutamate receptors.** *Comparative Biochemistry and Physiology: Part C Tox. Pharm.* 141 (1): 50-7.

Dantas, JA; Ambiel, CR; Cuman, RKN; Baroni, S; Bersani-Amado, CA (2006). **Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná.** *Acta Sci. Health Sci.* 28(2):165-170.

Dohtsu, K; Okumura, K; Hagiwara, K; Palma, MS; Nakajima, T. (2013). **Isolation and sequence analysis of peptides from the venom of *Protonectarina sylveirae* (hymenoptera-vespidae).** *Nat Toxins*. 1(5): 271-6.

Dos Anjos, LC (2013). **Avaliação da atividade antiepiléptica e da expressão neuronal de c-fos de dois peptídeos sintetizados a partir da *Occidentalina-1202* isolada da vespa social *Polybia occidentalis*.** Dissertação de mestrado, Universidade de Brasília, Brasil.

Edvard, IM (2011). **The multi-laned hippocampus**. *Nature Neuroscience*. 14: 07–408.

Eisenstein, M (2014). **Unrestrained excitement**. *Nature*. 511: 4-6.

Eftekhari, YS et al.(2013). **Bumetanide reduces seizure frequency in patients with temporal lobe epilepsy**. *Epilepsia*. 54(1): 9–12.

Emanuelli, T; Rocha, JBT; Pereira, ME; Nascimento, PC; Souza, DO; Beber, FA. (1998). **Delta-aminolevulinatase dehydratase inhibition by 2,3-dimercaptopropanol is mediated by chelation of zinc from a site involved in maintaining cysteinyl residues in a reduced state**. *Pharmacol. Toxicol.* 83, 95-103.

Engel, J. Jr. et al (1993). **Long-term monitoring for Epilepsy**. *Eletroencephalogr Clin Neurophysiol*. 87: 437-58.

Engel, J (1995). **Concepts of epilepsy**. *Epilepsia*. 36: 23-29.

Engel, J (2001a). **A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology**. *Epilepsia*. 42:796:803.

Engel, J (2001b). **Mesial temporal lobe epilepsy: what have we learned?** *Neuroscientist*. 7: 340-52.

Faught, E et al. (2012) **Incidence and prevalence of epilepsy among older U.S. Medicare beneficiaries**. *Neurology*. 78, 448–453.

Fernandes, MJS (2013). **Epilepsia do lobo temporal: mecanismos e perspectiva**. *Estud. Av.* 27(77): 85-98.

Fisher, RS et al. (2005). **Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE)**. *Epilepsia*. 43(4): 470-472.

Fisher, RS; Leppik, Y (2008). **Debate: When does a seizure imply epilepsy?** *Epilepsia*. 49(Suppl. 9): 7-12.

Fisher ,RS (2015). **Redefining epilepsy**. *Curr Opin Neurol*. 28: 130–135.

Gastaut, H; Gastaut, JL; Goncalves e Silva, GE; Fernandez Sanchez, GR (1975). **Relative frequency of different types of epilepsy: A study employing the classification of the international league against epilepsy**. *Epilepsia*. 16: 457-61.

Glover, RL. **ILAE type 3 hippocampal sclerosis in patients with anti-GAD-related epilepsy**. *Neurology: Neuroimmunology & Neuroinflammation*. 1-4.

Gravitz, I (2014). **Sociology: shedding the shame**. *Nature*. 511: 10-11.

Gomes, FMMG. **Avaliação antiepiléptica do peptídeo Neuropolybina no modelo crônico de Epilepsia do Lobo Temporal induzido por pilocarpina em camundongos.** Dissertação de mestrado – Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, 2016.

Goldenberg, M (2010). **Overview of Drugs Used For Epilepsy and Seizures: Etiology, Diagnosis, and Treatment.** P&T. 35(7): 392:415.

Goodrich-Hunsaker, N; Hunsaker, ME; Kesner, R (2008). **The interactions and dissociations of the dorsal hippocampus subregions: how the dentate gyrus, CA3, and CA1 process spatial information.** Behavioral Neuroscience. 122(1): 16-26.

Guerrini, R (2006). **Epilepsy in children.** Lancet. 367: 499-524.

Hamilton, SE et al (1997). **Disruption of the m1 receptor gene ablates muscarinic receptor-dependent M current regulation and seizure activity in mice.** Proc Natl Acad Sci USA. 94: 13311–13316.

Hayashi, M; Tice, RR; Macgregor, JT (2003). **In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay.** Mutagênese Ambiental. Ed Ulbra. Canoas.

Hamelin, S; Depaulis A (2015). **Revisiting hippocampal sclerosis in mesial temporal lobe epilepsy according to the “two-hit” hypothesis.** Neurol, 1474: 1-9.

Heng K, Haney MM, Buckmaster OS (2013). **High-dose rapamycin blocks mossy fiber sprouting but not seizures in a mouse model of temporal lobe epilepsy.** Epilepsia; 54:1535-1541.

Henze, DA; Urban, NN; Barrionuevo, G (2000). **The multifarious hippocampal mossy fiber pathway: a review.** Neuroscience, 98(3): 407-27.

Houser, CR (1990). **Granule cell dispersion in the dentate gyrus of humans with temporal lobe epilepsy.** Brain Res. 535(2):195–204.

Golyala Ambica, Kwan Patrick (2016). **Drug development for refractory epilepsy: The past 25 years and beyond.** SEIZURE: European Journal of Epilepsy. Dec 6. pii: S1059-1311(16)30290-4. doi: 10.1016/j.seizure.2016.11.022. [Epub ahead of print]

ILAE. (2009). **Revised terminology and concepts for organization of the epilepsies:** Report of the Commission on Classification and Terminology, In: *ILAE website*, 28 July 2009, Available from: www.ilae-epilepsy.org/visitors/centre/ctf/ctfoverview.cfm

Isnard J, Bourdillon P (2015). **Morphological imaging of the hippocampus in epilepsy.** Neurol. 1415 1-9.

Jasper, R; Locatelli, GO; Pilati, C; Locatelli, C (2012). **Evaluation of biochemical, hematological and oxidative parameters in mice exposed to the herbicide glyphosate-RoundupR**. *Interdiscip Toxicol.* 5(3): 133–140.

Kesner, R (2007). **Behavioral functions of the CA3 subregion of the hippocampus**. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, NY)*, 14(11): 771-81.

Ketter TA, Malow BA, Flamini R et al. (1996). **Felbamate monotherapy has stimulantlike effects in patients with epilepsy**. *Epilepsy Res.* 23(2): 129-137.

Kinderen RJ et al (2014). **Side-effects of antiepileptic drugs: the economic burden**. *Seizure.* Mar 23(3):184-90.

Kobow, K et al (2009). **Increased reelin promoter methylation is associated with granule cell dispersion in human temporal lobe epilepsy**. *J Neuropathol Exp Neurol*, 68(4): 356–364.

Kovacs, R; Heinemann, U; Steinhauser, C. (2012). **Mechanisms underlying blood-brain barrier dysfunction in brain pathology and epileptogenesis: role of astroglia**. *Epilepsia*, 53(Suppl6):53–59.

Kwan, P; Brodie, MJ (2000). **Early identification of refractory epilepsy**. *N Engl J Med.* 342:314-319.

Kwan, P; Sills, GJ; Brodie, MJ (2001) **The mechanisms of action of commonly used antiepileptic drugs**. *Pharmacol Ther* 90 (1): 21-34.

Kwan P, et al. (2011). **Drug-Resistant Epilepsy**. *N ENGL J MED* 365;10:919-926.

Li, T et al (2016). **Intraperitoneal injection of IL-4/IFN- γ modulates the proportions of microglial phenotypes and improves epilepsy outcomes in a pilocarpine model of acquired epilepsy**. *Brain Research*, 1657: 120-129.

Liu, JX; Liu, Y; Tang, FR (2011). **Pilocarpine-induced status epilepticus alters hippocampal PKC expression in mice**. *Acta Neurobiol Exp.* 2011, 71: 220–232.

Liu, X; Yang, Z; Yin, Y; Deng, X (2014). **Increased expression of Notch1 in temporal lobe epilepsy: animal models and clinical evidence**. *Neural Regeneration Research.* 9(5): 526-533

Lo-Castro, A; Curatolo, P (2014) **Epilepsy associated with autism and attention deficit hyperactivity disorder: is there a genetic link?** *Brain Dev.* 36, 185–193.

Löscher, W (1997). **Animal models of intractable epilepsy**. *Prog Neurobiol.* 53(2):239-58.

Löscher, W; Brandt C (2010). **Prevention or modification of epileptogenesis after brain insults: experimental approaches and translational research.** Rev. Pharmacol. 62:668-700.

Löscher W, Schmidt D (2011). **Modern antiepileptic drug development has failed to deliver: ways out of the current dilemma.** Epilepsia. 52(4): 657–678.

Löscher W (2011). **Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs.** Seizure. 20:359–368.

Löscher, W (2012). **Strategies for antiepileptogenesis: Antiepileptic drugs versus novel approaches evaluated in post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy.** Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies. 1-14.

Löscher, W; Klitgaard, H; Twyman RE; Schmidt, E (2013). **New avenues for anti-epileptic drug discovery and development.** Nature Reviews Drug Discovery. 12:757–776.

Luoni C, Bisulli F, Canevini MP et al. (2011) **Determinants of health-related quality of life in pharmaco-resistant epilepsy: results from a large multicenter study of consecutively enrolled patients using validated quantitative assessment.** Epilepsia. 52(12): 2181-2191.

Mac-gregor, JT (1983). **Micronuclei in Circulating Erythrocytes: A Rapid Screen for Chromosomal Damage During Routine Toxicity Testing in Mice.** In: HAYES, A.W; SCHNELL R.C; AND MIYA, T.S. Developments in Science and Practice of Toxicology. Ed Elsevier, Amsterdam. 555–558.

Magloczky Z. (2010). **Sprouting in human temporal lobe epilepsy: excitatory pathways and axons of interneurons.** Epilepsy Res, 89: 52–9.

Margineanu DG, Klitgaard H (2009). **Mechanisms of drug resistance in epilepsy: relevance for antiepileptic drug discovery.** Expert Opin Drug Discov. 4:23–32

Marcangelo, MJ; Ovsiew, F (2007). **Psychiatric aspects of epilepsy.** Psychiatr Clin North Am. 30(4):781-802.

Mathern, GW; Kuhlman, PA; Mendoza, D; Pretorius, JK (1997). **Human fascia dentata anatomy and hippocampal neuron densities differ depending on the epileptic syndrome and age at first seizure.** J Neuropathol Exp Neurol. 56(2):199–212.

Martinian, L; Catarino, CB; Thompson, P; Sisodiya, SM; Thom, M (2012). **Calbindin D28K expression in relation to granule cell dispersion, mossy fiber sprouting and memory impairment in hippocampal sclerosis: a surgical and post mortem series.** Epilepsy. 98: 14–24.

Matuja, WB et al. (2001) Risk factors for epilepsy in a rural area in Tanzania: a community-based case-control study. *Neuroepidemiology*. 20:242-247.

Meldrum BS, Rogawski MA (2007) **Molecular targets for antiepileptic drug development**. *Neurotherapeutics*. 4(1): 18-61.

Mortari MR et al. (2005) **Anticonvulsant and behavioural effects of the denatured venom of the social wasp *Polybia occidentalis* (Polistinae, Vespidae)**. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 97(5):289-95.

Mortari MR et al. (2007a). **Inhibition of acute nociceptive responses in rats after i.c.v. injection of Thr⁶-bradykinin, isolated from the venom of the social wasp**. *Polybia occidentalis*. *Br J Pharmacol*. 151(6):860-869.

Mortari, MR (2007b). **Atividade neurobiológica e caracterização química da peçonha da vespa social *Polybia occidentalis* (Hymenoptera, Vespidae): identificação de peptídeos antinociceptivos e anticonvulsivantes**. Tese, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Moser, E (2011). **The multi-laned hippocampus**. *Nature Neuroscience*. 14: 407–408.

Mula M, Trimble MR, Yuen A et al. (2003). **Psychiatric adverse events during levetiracetam therapy**. *Neurology*. 61(5): 704-706.

Müller, CJ; Bankstahl, M; Gröticke, I; Löscher, W (2009). **Pilocarpine vs. lithium–pilocarpine for induction of status epilepticus in mice: Development of spontaneous seizures, behavioral alterations and neuronal damage**. *European Journal of Pharmacology*. 619:15–24.

Nashef L, Hindocha N, Makoff A (2007). **Risk factors for sudden death in epilepsy (SUDEP)**. *Epilepsia*. 48:859-871.

Niedermeyer, E (1990). **The Epilepsies: Diagnosis and Management**. Baltimore: Urban & Schwarzenberg.

Neves, G; Cooke, SF; Bliss, TVP (2008). **Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality**. *Nature Reviews. Neuroscience*, 9: 65-75.

Ngugi AK, Bottomley C, Kleinschmidt I, Sander JW, Newton CR. (2010). **Estimation of the burden of active and life-time epilepsy: a meta-analytic approach**. *Epilepsia*. 51:883–890.

Nicita F, et al. (2012). **The genetics of monogenic idiopathic epilepsies and epileptic encephalopathies**. *Seizure*. 21(1):3-11.

Ottman R et al. (2008) **Altered language processing in autosomal dominant partial epilepsy with auditory features**. *Neurology*. 71:1973–1980.

Nicoletti, A; Bartoloni, A; Sofia, V et al (2005). **Epilepsy and neurocysticercosis in rural Bolivia: a population-based survey.** *Epilepsia*. 46:1127-1132.

Nicoletti, A et al. (2007). **Epilepsy and toxocariasis: a case-control study in Burundi.** *Epilepsia*. 48:894–899.

Panayiotopoulos, CP (2012). **The new ILAE report on terminology and concepts for the organization of epilepsies: Critical review and contribution.** *Epilepsia*. 53(3):399–404.

Paxinos G, Watson C (2007) **The rat brain in stereotaxic coordinates.** 6th edition. Academic Press, Inc, Sidney.

Pemberton, R.W. (1999). **Insects and other arthropods used as drugs in Korean traditional medicine.** *J Ethnopharmacol*. 65: 207-216.

Pereira, EVP et al (2004). **Análise da frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados em camundongos (mus domesticus domesticus), tratados com enzicoba (cobamamida).** *Arq. Ciênc. Saúde Unipar, Umuarama*, 8(1).

Perucca, P; Carter, J; Vahle, V; Gilliam, FG (2009) **Adverse antiepileptic drug effects: toward a clinically and neurobiologically relevant taxonomy.** *Neurology*. 72(14): 1223-1229.

Piedad, J; Rickards, H; Besag, FM; Cavanna, AE (2012). **Beneficial and adverse psychotropic effects of antiepileptic drugs in patients with epilepsy: a 81 summary of prevalence, underlying mechanisms and data limitations.** *CNS Drugs*. 26(4): 319-335.

Pieroni, JP et al (2009). **Terceirização da P&D de Medicamentos: panorama do setor de testes pré-clínicos no Brasil.** *BNDES Setorial*, Rio de Janeiro, 29: 131-158.

Pinto, G.C (2010). **Doenças do cérebro: hiperatividade e Epilepsia.** São Paulo, (3): 6-35.

Preux PM, Druet-Cabanc M (2005). **Epidemiology and aetiology of epilepsy in sub-Saharan Africa.** *Lancet Neurol*. 4: 21–31.

Purple day. Disponível em: <http://www.purpleday.org/index.html>. Acesso em 26 de março de 2015.

Racine RJ (1972) **Modification of seizure activity by electrical stimulation. II: Motor seizure.** *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 32(3): 281-94.

Rao, R; Murthy, RK (1993). **Characteristics of [3 H] glutamate binding sites in rat cerebellum.** *Biochemistry and Molecular Biology International*. 30: 861–866.

Rattka M, Brandt C, Loscher W (2013). **The intrahippocampal kainate model of temporal lobe epilepsy revisited: epileptogenesis, behavioral and cognitive alterations, pharmacological response, and hippocampal damage in epileptic rats.** *Epilepsy Res.* 103(2–3): 135–52.

Ratzliff, AH (2002). **Mossy cells in epilepsy: rigor mortis or vigor mortis?** *Trends in Neuroscience.* 25(3): 140-144.

Reddy, DS; Kuruba, R (2013). **Experimental Models of Status Epilepticus and Neuronal Injury for Evaluation of Therapeutic Interventions.** *Int. J. Mol. Sci.*, 14:18284-18318

Ren, WHP (2009). **Anesthetic management of epileptic pediatric patients.** *Int Anesthesiol Clin.* 47:101-116.

Ribeiro, LR (2003). **Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo.** In: Ribeiro, LR; Salvadori, DMF; Marques, EK. (Eds.) *Mutagênese Ambiental.* Canoas: Editora Ulbra. 173-200.

Rouach, N; Koulakoff, A; Abudara, V; Willecke, K; Giaume, C (2008) **Astroglial metabolic networks sustain hippocampal synaptic transmission.** *Science.* 322:1551–5.

Römermann, K et al. (2014). **Pilocarpine-Induced Convulsive Activity Is Limited by Multidrug Transporters at the Rodent Blood-Brain Barrier.** *J Pharmacol Exp Ther.* 353:351–359.

Römermann, K; Bankstahl, JP; Löscher, W and Bankstahl M (2015). **Pilocarpine-Induced Convulsive Activity Is Limited by Multidrug Transporters at the Rodent Blood-Brain Barrier.** *J Pharmacol Exp Ther.* 353:351–359.

Sadeghi, L et al (2016). **Hippocampal asymmetry: Differences in the left and right hippocampus proteome in the rat model of temporal lobe epilepsy.** *Journal of Proteomics.* 5(154): 22-29.

Schumacher, TB et al. (1998). **Effects of phenytoin, carbamazepine, and gabapentin on calcium channels in hippocampal granule cells from patients with temporal lobe epilepsy.** *Epilepsia.* 39(4): 355-63.

Scorza, FA; Cavalheiro, EA (2004). **Epilepsias: aspectos sociais e psicológicos.** *R Cult, R IMAE,* 5(11): 48-53.

Scorza, FA *et al.*, (2005). **Estudo qualitativo da formação hipocampal de animais hipertensos com Epilepsia.** *Arq. Neuro-Psiquiatr.* 63.

Scott, RC (2014). **What are the effects of prolonged seizures in the brain?** *Epileptic Disord.* 16(Suppl. 1):6-11.

Seifert, G; Carmignoto, G; Steinhäuser, C. (2010). **Astrocyte dysfunction in epilepsy**. Brain Res Rev. 2010;63:212–21.

Shahrim, Z; Baharuddin, PJNM; Yahya, A; Muhammad, H; Bakar, RA; Ismail, Z (2006). **The in vivo rodent micronucleus assay of kacip fatimah (Labisia pumila) extract**. Trop Biomed. 23: 214-219.

Sharma, AK; Reams, RY; Jordan, WH; Miller, MA; Thacker, HL; Snyder, PW (2007). **Mesial temporal lobe epilepsy: pathogenesis, induced rodent models and lesions**. Toxicol Pathol. 35(7): 984–99.

Scheffer, IE et al. (2008) **Epilepsy and mental retardation limited to females: an under-recognized disorder**. Brain 131: 918–927

Shorvo, SD (2011). **The etiologic classification of epilepsy**. Epilepsia, 52(6): 1052–1057.

Simonato, M *et al.*, (2012). **Finding a better drug for epilepsy: Preclinical screening strategies and experimental trial design**. Epilepsia, 53(11): 1860–1867.

Singui, P (2011). **Infectious causes of seizures and epilepsy in the developing world**. Developmental Medicine & Child Neurology 53: 600–609.

Sinhorin, VD.; Carpes, MJ.; Roehrs, C; Zimmer, MF; Sauzem, PD; Rubin, MA; Correia, CR; Mello, CF (2003). **D,L-cis-2,3-Pyrrolidine dicarboxylate alters [3H]-L-glutamate binding and induces convulsions in mice**. Pharmacology, Biochemistry and Behavior. 76: 295-299.

Sloviter, RS (1991). **Permanently altered hippocampal structure excitability, and inhibition after experimental status epilepticus in the rat: the “dormant basket cell” hypothesis and its possible relevance to temporal lobe epilepsy**. Hippocampus. 1:41-66.

Sloviter, RS (2005). **The neurobiology of temporal lobe epilepsy: too much information, not enough knowledge**. C R Biol. 328: 143-43.

Sloviter RS, Bumanglag AV, (2013). **Defining “epileptogenesis” and identifying “antiepileptogenic targets” in animal models of acquired temporal lobe epilepsy is not as simple as it might seem**. Neuropharmacology. 69: 3-15.

Souza, DO; Ramírez, G (1991). **Effects of guanine nucleotides on kainic acid binding and on adenylate cyclase in chick optic tectum and cerebellum**. Journal of Molecular Neuroscience. 3: 39-45.

Stables, JP et al. (2002) **Models for epilepsy and epileptogenesis: report from the NIH workshop, Bethesda, Maryland**. Epilepsia 43:1410 –1420.

Stephen, LJ; Kwan, P; Brodie, MJ (2001). **Does the cause of localisation-related epilepsy influence the response to antiepileptic drug treatment?** *Epilepsia*. 42: 357-62.

Sutula, TP (2004) **Mechanisms of epilepsy progression: current theories and perspectives from neuroplasticity in adulthood and development.** *Epilepsy Res.* 60(2-3): 161-171.

Tauck, DL; Nadler, JV (1985) **Evidence of functional mossy fiber sprouting in hippocampal formation of kainic acid-treated rats.** *J Neurosci.* 5:1016–1022.

Taylor, CP.; Dudek, E. **Excitation of hippocampal pyramidal cells by an electrical field effect.** *Jornal of neurophysiology*, 52: 126-142, 1984.

Télez-Zenteno, JF; Hernández-Ronquillo, L (2012). **A Review of the Epidemiology of Temporal Lobe Epilepsy.** *Epilepsy Research and Treatment*, 2012:1-5.

Tellez-Zenteno, JF; Patten, SB; Jette, N; Williams, J; Wiebe, S. (2007). **Psychiatric comorbidity in epilepsy: a population-based analysis.** *Epilepsia*, 48, 2336–2344.

Thom, M (2014). **Review: Hippocampal sclerosis in epilepsy: a neuropathology review.** *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 40:520–543.

Tian G-F, Azmi H, Takano T, Xu Q, Peng W, Lin J, et al. **Anastrocytic basis of epilepsy.** (2005). *Nat Med*, 11:973–81.

Thom M. (2014). **Review: hippocampal sclerosis in epilepsy: a neuropathology review.** *Neuropathol Appl Neurobiol*, 40:520–43.

Trinka E, et al. (2015). **A definition and classification of status epilepticus – Report of the ILAE Task Force on Classification of Status Epilepticus.** *Epilepsia*, 56(10):1515–1523.

Turski, WA; Cavalheiro, EA; Bortolotto, ZA.; Mello, LM; Schwarz, M; Turski, L (1984). **Seizures produced by pilocarpine in mice: A behavioral, electroencephalographic and morphological analysis.** *Brain Res.* 321:237–253

Turski, L; Cavalheiro, EA; Sieklucka-Dziuba, M; Ikonomidou-Turski, C; Czuczwar, SJ; Turski, WA (1986). **Seizures produced by pilocarpine: Neuropathological sequelae and activity of glutamate decarboxylase in the rat forebrain.** *Brain Res.*, 398, 37–48.

Urban, NN; Henze, DA; Barrionuevo, G (2001). **Revisiting the role of the hippocampal mossy fiber synapse.** *Hippocampus*, 11(4):408-17.

Vajda, FJE; Eadie MJ. **The clinical pharmacology of traditional antiepileptic drugs.** *Epileptic Disord.*, 16 (4): 395-408.

Van EA, (2014). **Neuroscience forefront review role of blood–brain barrier in temporal lobe epilepsy and pharmacoresistance.** *Neuroscience* 277 455–473.

Van Strien; NM; Cappaert, NL; Witter, MP (2009). **The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network.** *Nature Reviews Neuroscience*, 10(4):272-82.

Vezzani A (2015). **Infections, inflammation and epilepsy.** *Acta Neuropathol*

Walczak, TS et al. (2001). **Incidence and risk factors in sudden unexpected death in epilepsy: a prospective cohort study.** *Neurology*, 56:519–525.

Weintraub D, Buchsbaum R, Resor Jr SR et al. (2007). **Psychiatric and behavioral side effects of the newer antiepileptic drugs in adults with epilepsy.** *Epilepsy Behav* 10(1): 105-110.

Webster KM, Semple BD et al. (2017). **Inflammation in epileptogenesis after traumatic brain injury.** *Journal Of Neuroinflammation*, 14(10): 1-17.

White, HS (2012). **Animal models for evaluating epileptogenesis.** In: Noebels JL, Avoli M, Rogawski MA, Olsen RW, Delgado-Escueta AV (eds) *Jasper's basic mechanisms of the epilepsies.* 4th edition. Oxford University Press, New York, 1041-1054.

White HS, Löscher W. (2014). **Searching for the Ideal Antiepileptogenic Agent in Experimental Models: Single Treatment Versus Combinatorial Treatment Strategies.** *Neurotherapeutics* 11:373–384.

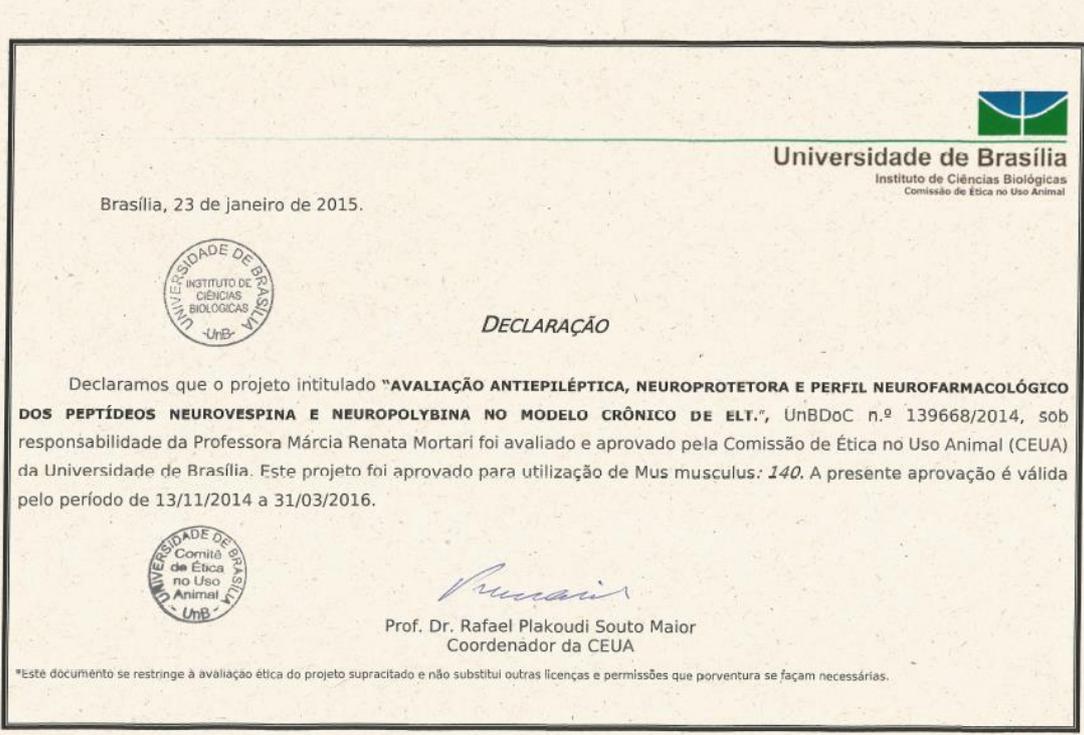
Wieser, HG (2004). **“ILAE commission report. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis,”** *Epilepsia* 45(6):695-714.

Zeng LH, Xu L, Gutmann DH, Wong M (2008). **Rapamycin prevents epilepsy in a mouse model of tuberous sclerosis complex.** *Ann Neurol*; 63:444-453.

Zeng LH, Rensing NR, Wong M (2009). **The mammalian target of rapamycin signaling pathway mediates epileptogenesis in a model of temporal lobe epilepsy.** *J Neurosci*; 29:6964-6972.

8. ANEXOS

8.1. Anexo 1 - Declaração do CEUA



Brasília, 23 de janeiro de 2015.

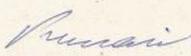

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso Animal



DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "**AVALIAÇÃO ANTIÉPILEPTICA, NEUROPROTETORA E PERFIL NEUROFARMACOLÓGICO DOS PEPTÍDEOS NEUROVESPINA E NEUROPOLYBINA NO MODELO CRÔNICO DE ELT.**", UnBDoC n.º 139668/2014, sob responsabilidade da Professora Márcia Renata Mortari foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de *Mus musculus*: 140. A presente aprovação é válida pelo período de 13/11/2014 a 31/03/2016.




Prof. Dr. Rafael Plakoudi Souto Maior
Coordenador da CEUA

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

8.2. Anexo 2 - Autorização de Acesso e de Remessa de Componente do Patrimônio Genético.

 <p>Autorização de Acesso e de Remessa de Componente do Patrimônio Genético</p> <p>O Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, nos termos Deliberação 246/2009, do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético, autoriza a instituição identificada no verso deste documento a acessar e remeter componente do Patrimônio Genético com a finalidade de pesquisa científica.</p> <p>Brasília, 19 de Novembro de 2013</p> <p>Raquel de Andrade Lima Coelho Diretor de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde PO 161/2010</p>	<p>Processo: 010476/2013-0 Validade: 19/11/2013 a 01/08/2018 Instituição: UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA CNPJ: 000.381.740/0001-43 Pesquisador: Márcia Renata Mortari CPF: 828.885.151-72 RG: 1507428 - SSP / DF</p> <p><i>Para visualizar a versão digital da Autorização de Acesso e de Remessa de Componente do Patrimônio Genético, V.Sa. poderá utilizar a ferramenta disponibilizada pelo CNPq para esse fim na página http://servicosweb.cnpq.br/visualizador/ e informar o número do protocolo 8904338536066393 para recuperá-la do banco de dados do CNPq</i></p>
--	---