



Universidade de Brasília

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

Luiz Domingos Zavarize Neto

**MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DO RECEPTOR B2 DE CININAS PELOS
HORMÔNIOS SEXUAIS EM UM MODELO DE EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL**

Brasília

2020

LUIZ DOMINGOS ZAVARIZE NETO

MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DO RECEPTOR B2 DE CININAS PELOS
HORMÔNIOS SEXUAIS EM UM MODELO DE EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL

Orientador: Prof. Dr. Enrique Roberto Argañaraz

Coorientador: Prof. Dr. Gustavo Adolfo Argañaraz

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular, da Faculdade de Medicina, da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Patologia Molecular.

Luiz Domingos Zavarize Neto

MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DO RECEPTOR B2 DE CININAS PELOS
HORMÔNIOS SEXUAIS EM UM MODELO DE EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular, da Faculdade de Medicina, da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Patologia Molecular.

Aprovada em: 04/03/2020

BANCA EXAMINADORA

Sebastián Olivier Charneau

Pedro Francisco Ângelo Júnior

Enrique Roberto Argañaraz

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer essa dissertação às seguintes pessoas:

Aos meus orientadores, Prof. Gustavo e Prof. Enrique, obrigado principalmente pela paciência e persistência nesse projeto. Obrigado pela oportunidade de aprender, de conhecer outros grupos de pesquisa, de me proporcionar oportunidades de melhorar a minha experiência no mestrado.

Ao laboratório de NeuroVirologia Molecular da UnB por todo o suporte.

À minha mãe que, mesmo não acompanhando de perto o processo da dissertação, sempre esteve disponível para me ouvir e me apoiar nessa vinda a Brasília.

Aos meus namorados, Lucas e Matheus, pelos carinhos na cabeça, comidas, brincadeiras, conselhos e sobretudo pela força e apoio. Ter vocês comigo tornou tudo mais leve, assim como a vida ao lado de vocês. Amo vocês.

Ao meu melhor amigo, Rafael Budni, que acompanhou de perto todos os sufocos e reclamações, além de me incentivar e me apoiar em qualquer decisão que eu tomasse sobre o projeto. Nesses dois anos, ter a tua companhia foi essencial para que tudo desse certo, tanto por vídeo chamadas quanto pelas viagens curtas que fizemos para nos encontrar.

Aos meus amigos Paulo, Gisele, Luiza, Matheus, Patrícia e Cecília o meu muito obrigado. Obrigado por serem amigos tão incríveis, que me receberam em Brasília da melhor forma possível, obrigado pelas ajudas nos momentos mais difíceis que pude passar em uma cidade nova. Por mais conversas, bares e abraços por muitos e muitos anos.

À Universidade de Brasília por toda a infraestrutura.

À FAPDF CAPES e CNPq pelo financiamento da pesquisa.

RESUMO

As cininas são uma classe de peptídeos representadas pela bradicinina (BK), calidina (Lys-BK) e seus metabólitos. As ações biológicas das cininas mediante os receptores (B1 e B2) têm sido relacionadas com a formação de edema, liberação de citocinas, glutamato e produção de prostaglandinas. Estudos prévios mostraram que em tecidos periféricos, os hormônios sexuais regulam a expressão do receptor B2 de cininas. O presente estudo teve como objetivo investigar a expressão do receptor de cinina B2 em ratos Wistar fêmeas não ovariectomizadas (NOVX) e ovariectomizadas (OVX), submetidas ao modelo de epilepsia induzido por pilocarpina. Os ratos Wistar fêmeas NOVX e OVX foram divididos em quatro grupos: I) animais com 5h de status epilepticus (grupo SE); II) animais com cinco dias após o SE (grupo SIL); III) animais com 30 dias após a primeira crise espontânea (grupo CR); e IV) animais tratados com solução salina (SAL) (grupo CTR). Os resultados obtidos mostraram uma menor imunorreatividade do receptor B2 de cininas na formação hipocampal nos grupos SE e SIL, mas não no grupo CR quando comparado com os respectivos grupos CTR em fêmeas NOVX. Estes achados foram confirmados pela técnica de “Western Blotting” observando-se uma diminuição significativa da expressão do receptor B2 de cininas no grupo SE (** p= 0,0039) e no grupo Sil (*p=0,0121), quando comparado com os respectivos grupos CTR. Entretanto, em ratos Wistar fêmeas OVX, mediante imunohistoquímica, se evidenciou uma maior imunorreatividade do receptor do receptor B2 de cininas nos grupos SE e SIL quando comparados com os respectivos grupos CTR. Esses dados foram corroborados mediante a técnica de “Western Blotting”. Foi observado um aumento significativo na expressão do receptor B2 de cininas no grupo SE (**p=0,00035) e no grupo SIL (*p=0.0028) quando comparados com os respectivos grupos CTR. Em resumo, este estudo mostrou que a expressão do receptor de B2 de cininas poderia ser modulada pelos hormônios sexuais (estrogênio e/ou progesterona) em ratos fêmeas durante as fases aguda e silenciosa do modelo de epilepsia da pilocarpina.

Palavras chave: Epilepsia, Cininas, Hormônios sexuais

ABSTRACT

Kinins, a class of polypeptides represented by bradykinin (BK), kallidin (Lys-BK) and their metabolites, acting via B1 and B2 receptors, have been related to inflammation, cytokines action, glutamate release and prostaglandin production. Several studies indicate that in the peripheral tissues, sexual hormones regulate the expression of kinin B2 receptor, reduce cytokine production and inflammatory responses. In the present work aimed to investigate the expression of kinin B2 receptor in non-ovariectomized (NOVX) and ovariectomized (OVX) female rats, submitted to the pilocarpine model epilepsy. Each group of animals, NOVX and OVX, were divided in four groups: a) SE group (animals' euthanized with 5h of status epilepticus); b) SIL group, (animals' euthanized five days after SE); c) CR group, (animals with spontaneous recurrent seizures) and d) CTR group (animals treated with saline solution (SAL)). The results showed, in NOVX, a decrease expression of kinin B2 receptor in the hippocampal formation during the SE (* $p=0.0039$) and SIL (* $p=0.0121$) but not in CR groups when compared with its proper CTR groups. In addition, in NOVX group, the immunohistochemistry showed a decreased immunoreactivity to Kinin B2 receptor, in the hippocampal formation, during the SE and SIL but not in the CR groups, when compared with its proper CTR groups. In contrast, in OVX group, the immunoreactivity to kinin B2 receptor was increased during the SE and SIL groups when compared with its proper CTR groups. The Western Blotting analysis showed an increased expression of kinin B2 receptor in OVX group during the SE (** $p=0.0003$) and SIL groups (* $p=0.0027$), when compared with its proper CTR groups. In summary, this study showed that the expression of kinin B2 receptor could be modulated by sexual hormones in female rats during the acute and silent phases of pilocarpine model of epilepsy.

Keywords: Epilepsy, Kinin, Sex hormones

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Fotomicrografia de cortes coronais do hipocampo de ratos epiléticos, corado pela técnica de Cresil violeta e Neo –Tim.	17
Figura 2 - Representação esquemática do mecanismo de excitotoxicidade em doenças neurológicas.....	19
Figura 3 - Representação esquemática da ativação do sistema calicreína cininas.	23
Figura 4 - Esfregaços vaginais em ratos Wistar fêmeas NOVX e OVX.....	35
Figura 5 - Expressão do RNAm do receptor B2 de cininas no hipocampo de ratos Wistar fêmeas NOVX no grupo SE.....	37
Figura 6 - Expressão do receptor B2 de cininas no hipocampo de ratos Wistar fêmeas NOVX no grupo SE.	38
Figura 7 - Expressão do receptor B2 de cininas no hipocampo de ratos Wistar fêmeas NOVX no grupo SIL.....	39
Figura 8 - Expressão do receptor B2 de cininas nos hipocampos de ratos Wistar fêmeas NOVX no grupo CR.	40
Figura 9 - Fotomicrografias da imunreatividade do receptor B2 de Cininas. no hipocampo de ratos Wistar Fêmeas NOVX de todos os grupos.	41
Figura 10 - Fotomicrografias da imunreatividade do receptor B2 de Cininas. Região de CA1 na formação hipocampal de ratos Wistar Fêmeas NOVX de todos os grupos.....	42
Figura 11 - Fotomicrografias da imunreatividade do receptor B2 de Cininas da Região de CA3 na formação hipocampal de ratos Wistar Fêmeas NOVX de todos os grupos.....	43
Figura 12 - Fotomicrografias da imunreatividade do receptor B2 de Cininas. Região do hilo do giro dentado na formação hipocampal de ratos Wistar Fêmeas NOVX de todos os grupos....	44
Figura 13 - Expressão do RNAm do receptor B2 de cininas nos hipocampos de ratos Wistar fêmeas OVX do grupo SE..	45
Figura 14 - Expressão do receptor B2 de cininas no hipocampo de ratos Wistar fêmeas OVX do grupo SE.	46
Figura 15 - Expressão do receptor B2 de cininas no hipocampo de ratos Wistar fêmeas OVX do grupo SIL.....	46
Figura 16 - Expressão do receptor B2 de cininas no hipocampo de ratos Wistar fêmeas OVX do grupo CR..	47

Figura 17 - Fotomicrografias da imunreatividade do receptor B2 de Cininas no do hipocampo de ratos Wistar Fêmeas OVX de todos os grupos.	48
Figura 18 - Fotomicrografias da imunreatividade do receptor B2 de cininas na região de CA1 na formação hipocampal de ratos Wistar Fêmeas OVX de todos os grupos.....	49
Figura 19 - Fotomicrografias da imunreatividade do receptor B2 de Cininas. Região de CA3 no hipocampo de ratos Wistar Fêmeas OVX de todos os grupos	50
Figura 20 - Fotomicrografias da imunreatividade do receptor B2 de cininas. Região do hilo do giro dentado na formação hipocampal de ratos Wistar Fêmeas OVX de todos os grupos	51

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

AMPA - α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato

BK - Bradicinina

CR - Crônico

CTR - Controle

DAB - 3,3'diaminobenzidina

ELT - Epilepsia do Lobo Temporal

ELTM - Epilepsia do Lobo Temporal Mesial

GLU - Glutamato

IL-1B - Interleucina 1 Beta

IL-6 - Interleucina 1 6

ILAE - International League Against Epilepsy

KA - receptores de cainato

kDA - kilo Daltons

mGluRs - receptores metabotrópicos

NDMA - N-metil-D-asparato

NFkB - fator nuclear kappa b

NOVX - Ratas Não-Ovariectomizadas

OVX - Ratas Ovariectomizadas

PKC - Proteína Quinase C

PLA2 - fosfolipase a2

PLC - fosfolipase C

RNAm - RNA mensageiro

SE - Status epilepticus

SIL - Silencioso

SNC - Sistema nervoso central

TNFa- Fator de necrose tumoral-alfa

SUMÁRIO

RESUMO.....	5
ABSTRACT	6
ÍNDICE DE FIGURAS	7
LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS.....	9
SUMÁRIO	10
1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Epilepsia	12
1.2 Epilepsia do lobo temporal mesial (ELTM)	13
1.3 Epileptogênese na ELTM	15
1.3.1 <i>Status Epilepticus</i> e Excitotoxicidade.....	17
1.3.2 Epileptogênese e Inflamação	19
1.4 Sistema Caliceína-Cinina	21
1.5 Epilepsia e Hormônios Sexuais	24
2. JUSTIFICATIVA & RELEVANCIA.....	26
3. OBJETIVOS	27
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4 MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1 MATERIAIS.....	28
4.1.1 Animais.....	28
4.1.2 Drogas e Reagentes.....	28
4.1.3 Equipamentos	28
4.2 MÉTODOS	29
4.2.1 Cirurgia de Ovariectomia (OVX)	29
4.2.2 Método Lavado Vaginal	29

4.2.3 Indução do modelo experimental de epilepsia pela pilocarpina em ratos Fêmeas Wistar	30
4.2.4 Análise da Expressão do Receptor B2 de Cininas.....	30
4.2.5 Imunohistoquímica	32
4.2.6 Análise da Expressão Gênica.....	33
4.2.7 Análise Estatística.....	34
5. RESULTADOS	35
5.1 Identificação das fases ciclo estral.....	35
5.2 Análises comportamentais após administração da pilocarpina	36
5.3 Expressão do receptor B2 de cininas em ratos fêmeas NOVX	36
5.4 Expressão do receptor B2 de cininas em ratos fêmeas ovariectomizadas (OVX).....	45
DISCUSSÃO	52
CONCLUSÕES.....	57
REFERÊNCIAS.....	58

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epilepsia

A epilepsia é um transtorno neurológico crônico que atinge cerca de 50 milhões de pessoas no mundo, sendo que 40 milhões destas estão em países desenvolvidos. (H, DOMINIC C HEANEY; BRIDGET K MACDONALD, 2002). Sua prevalência fica em torno de 5-10/1.000, apresentando-se, no geral, com uma distribuição bimodal, ou seja, tem picos de incidência no primeiro ano de vida e após 60 anos de idade. (SANDER *et al.*, 2003; FISHER 2014).

O termo epilepsia abrange diversas síndromes, cuja característica principal são as crises recorrentes, não provocadas. (COSTA *et. al*, 1998). O aspecto central da epilepsia é a ocorrência de crises epiléticas, que ocorrem, na maioria das vezes, sem que fatores precipitantes sejam prontamente identificados. As manifestações clínicas da epilepsia se iniciam abruptamente e são muito variáveis, sendo consequências das diferentes regiões do encéfalo envolvidas na hiperexcitabilidade neuronal. Entre elas, se destacam: alteração da consciência, transtornos motores sensitivos e autonômicos (ELGER; SCHMIDT, 2008).

Na prática clínica, o diagnóstico é estabelecido após o paciente apresentar pelo menos duas crises convulsivas não provocadas em um intervalo maior que 24 horas ou pelo menos uma crise não provocada, com probabilidade maior de 60% de apresentar novas crises nos próximos 10 anos devido a presença de fatores de riscos como trauma, infecções, lesões estruturais entre outros. (FISHER *et al.*, 2014).

A epilepsia não é necessariamente uma doença para vida toda, sendo considerada resolvida caso uma pessoa estiver livre de convulsões nos últimos 10 anos e, com pelo menos os últimos 5 anos de uso de medicamentos antiepiléticos ou caso a pessoa tiver passado da idade de uma síndrome epilética dependente da idade. (FISHER *et al.*, 2014).

Os estudos que fornecem conhecimento detalhado do risco de recorrência das crises são poucos; portanto, a maioria dos diagnósticos de epilepsia ainda serão através da documentação de duas crises convulsivas não provocadas em um intervalo maior que 24 horas. (FISHER *et al.*, 2014).

As epilepsias podem refletir uma disfunção de um conjunto de neurônios de parte do encéfalo (crise parcial ou focal), ou de uma área mais extensa, envolvendo simultaneamente os dois hemisférios cerebrais (crise generalizada). (ENGEL, PEDLEY, 2008). A epilepsia do

lobo temporal (ELT) é a forma mais comum de epilepsia focal na população adulta, sendo responsável por 40% de todos os casos de epilepsia em essa população (CENDES e KOBAYASHI, 2000). Mais recentemente, a ELT foi subdividida em mesial e neocortical, ou lateral, de acordo com a origem e semiologia das crises. (FRENCH *et al.*, 1993).

1.2 Epilepsia do lobo temporal mesial (ELTM)

A epilepsia do lobo temporal mesial (ELTM) corresponde a aproximadamente 60% dos casos de ELT. A importância clínica da ELTM decorre da sua alta prevalência e elevada proporção de pacientes com crises epilépticas refratárias ao tratamento medicamentoso.

O tipo de crise mais frequente se apresenta como uma sensação de mal-estar epigástrico ascendente, algumas vezes caracterizada como dor, opressão ou frio na região epigástrica ou torácica. O comprometimento da consciência é frequentemente observado, porém difícil de quantificar; caracterizando-se por graus variados de redução a reatividade e responsividade ao ambiente e aos vários tipos de estímulos. A primeira crise espontânea tende a ser estereotipada ao longo da história de cada paciente e ocorre geralmente no final da infância ou início da adolescência. No começo as crises epilépticas são controladas pelos medicamentos até tornarem-se não responsivas ao tratamento farmacológico. (FRENCH *et al.*, 1993).

Na ELT mesial a lesão neuroanatômica mais comumente encontrada é a esclerose hipocampal que é caracterizada por perda neuronal e gliose. Histologicamente três padrões de perda celular são descritos no hipocampo (BABB *et al.*, 1984; BABB *et al.*, 1989; ISOKAWA *et al.*, 1993). Na esclerose hipocampal clássica do Corno de Annon a perda neuronal é mais intensa no setor de Sommer (região CA1) e na região hilar, e menos intensa na *fascia dentata* e no setor CA2, que é resistente. Por outro lado, a esclerose do Corno de Ammon caracteriza-se por perda neuronal em todos os subcampos do hipocampo e a esclerose do *endofolium* que é caracterizada por perda neuronal, restrita a região do hilo (SERAFINI e LEITE, 2000).

A perda neuronal é acompanhada por gliose levando a uma atrofia do hipocampo. A gliose pode também comprometer a amígdala, o uncus e o giro para-hipocampal. Associado à perda neuronal, também se observa na esclerose hipocampal a dispersão de células granulares (HOUSER, 1990). Esta é caracterizada pela perda de justaposição habitual das células granulares na camada granular do giro denteado, produzindo aumento da espessura e dos espaços intracelulares. Esses dados sugerem a participação de fatores genéticos envolvidos na dispersão de células granulares. Por outro lado, Mello e colaboradores, em estudo experimental com ratos adultos epilépticos após *status epilepticus* induzido pela pilocarpina, propõe que a

dispersão das células granulares seja decorrente da perda neuronal induzida pelas crises epiléticas, que levaria ao estiramento mecânico do tecido. (MELLO *et al.*, 1993).

Nesta mesma região observa-se a reorganização das fibras musgosas, geralmente demonstrada pela técnica de Timm (HOUSER *et al.*, 1990), que identifica os terminais sinápticos destas fibras, devido ao seu alto conteúdo de zinco. Estudos realizados no hipocampo epilético humano identificaram os grânulos de Timm na região supragranular da camada molecular interna do giro dentado, sugerindo uma projeção de fibras musgosas nesta região. (BABB *et al.*, 1991; BABB *et al.*, 1992; SUTULA *et al.*, 1989). Por outro lado, as fibras musgosas no hipocampo humano normal não possuem uma projeção significativa na camada molecular interna do giro dentado (CASSEL e BROWN, 1984). Estes achados foram confirmados utilizando-se anticorpos monoclonais contra distintos antígenos, presentes nas sinapses e demonstraram um aumento na imunorreatividade na camada molecular interna do giro dentado (HONER *et al.*, 1994). Isokawa e colaboradores (1993) utilizaram um corante para traçar as projeções das fibras musgosas na TLE e encontraram evidências de interação aberrante na camada molecular das células granulares, confirmando os resultados da coloração de Timm.

Os dados obtidos a partir de estudos neuropatológicos humanos, associados aos dados advindos da literatura, onde são descritos modelos experimentais, dão suporte à hipótese de fenômenos plásticos de reorganização sináptica seriam o substrato anatômico, responsável pela hiperexcitabilidade hipocampal (McNAMARA, 1994). Assim, a hipótese da reorganização sináptica das fibras musgosas defende a ideia de que a hiperexcitabilidade das células granulares seria uma consequência de um rearranjo patológico de um circuito neural, no qual as células granulares emitiriam colaterais axônios para seu próprio campo dendrítico, resultando assim, em um circuito reverberante (TAUCK e NADLER, 1985). Este rearranjo seria resultante de uma eliminação sináptica, em decorrência da morte de neurônios que normalmente projetam axônios para a camada molecular interna do giro dentado (MCNAMARA, 1994). As sinapses eliminadas poderiam ser substituídas por axônios das células granulares, isto é, as fibras musgosas.

Em humanos, a intensidade do brotamento supragranular das fibras musgosas mostra uma correlação positiva com a severidade das crises (SUTULA *et al.*, 1989) e com a severidade da perda das células no hilo (HOUSER *et al.*, 1990).

Apesar da relação entre esclerose hipocampal e ELTM já estar bem estabelecida na literatura, o mecanismo exato pelo qual a esclerose hipocampal participa da gênese de crises

epilépticas ainda não foi completamente elucidado, assim como todos os eventos celulares e moleculares que facilitam o mecanismo exato através do qual uma de crise epiléptica que conduziria a morte celular.

1.3 Epileptogênese na ELTM

O fenômeno de epileptogênese na ELTM é um processo neurobiológico que facilita o desenvolvimento de crises espontâneas e recorrentes após diversos tipos de insultos ao encéfalo, como por exemplo, o *status epilepticus* (SE), trauma cranioencefálico e convulsões febris. Os insultos ao encéfalo são capazes de gerar eventos que transformam a rede neuronal em um circuito hiperexcitável que favorecerá o surgimento de crises epilépticas espontâneas e recorrentes.

O conhecimento atual da fisiopatologia das epilepsias deve-se ao resultado de vários tipos de abordagens. As clínico-epidemiológicas são de primordial importância para a redução das causas, que mais frequentemente acometem os seres humanos dos países em desenvolvimento. Entretanto, o estudo biológico das epilepsias, efetuado através de modelos experimentais, tem contribuído de maneira fundamental para o desenvolvimento de novos medicamentos e terapias alternativas uma vez que eles tentam desvendar os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na epileptogênese.

Os modelos experimentais que tem atraído maior interesse são os crônicos por mimetizarem com maior fidelidade os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na epilepsia humana. Os modelos animais mais utilizados são os que se assemelham às epilepsias do lobo temporal. Entre esses modelos podemos citar aqueles obtidos pela injeção de pilocarpina (TURSKI *et al.*, 1983a), ácido cainico (BEM-ARI *et al.*, 1979), e o obtido pelo abrasamento amigdaliano. (GODDARD, 1967).

Turski e colaboradores (1983b) demonstram atividade epiléptica, associados a lesões em todo prosencéfalo, após a administração sistêmica de agonistas colinérgicos muscarínicos entre eles a pilocarpina.

As administrações sistêmicas de altas doses de pilocarpina (300-400mg/kg), induz uma série de alterações comportamentais e eletroencefalográficas, indicativas de atividade epiléptica auto mantida. Imediatamente após as administrações de pilocarpina, os animais apresentam automatismos faciais, associadas à salivação moderada, acinesia e tremores generalizados. Cerca de 15-25 minutos depois, este comportamento progride para crises motoras límbicas, onde os animais apresentam intensa salivação, clonias das patas dianteiras

apoiadas sobre as patas posteriores e, finalmente queda. Essas crises motoras límbicas são recorrentes a cada 2-8 minutos, culminando em estado de mal epilético (SE) em 50-60 minutos. Esse estado chega a durar até 18 horas e, no final desse período, os animais não respondem aos estímulos ambientais, retornando gradativamente o seu comportamento normal dentro de 24 horas. Esses episódios caracterizam a fase aguda do modelo experimental de epilepsia induzido por pilocarpina.

A seguir, os animais apresentam uma fase livre de crises (período silencioso), cuja duração varia de 4-44 dias (média de 15 dias), que é caracterizada pela normalização das alterações comportamentais e eletrográficas. Após esta fase, os animais sobreviventes exibem crises espontâneas e recorrentes, que caracterizam o período crônico do modelo. Nesta fase os animais apresentam de 2-15 episódios de crises por mês (média de 2-3 crises por semana) e esta frequência de crises se mantém por toda a vida do animal (CAVALHEIRO et al. 1991; LEITE et al.; 1990).

As alterações na formação hipocampal que seguem à administração de pilocarpina incluem: morte de células piramidais evidente em algumas regiões do hipocampo, principalmente em CA1 e CA3 (FIG 1) (TURSKI et al., 1983b); aumento na liberação de glutamato (CAVALHEIRO et al., 1991) que, por sua vez, está associado à excitotoxicidade e morte neuronal em estruturas límbicas e em várias regiões encefálicas (MELDRUM, 1991); brotamento axonal das fibras musgosas (MELLO et al., 1993); aumento da neurogênese no giro dentado. (PARNENT et al., 1997).

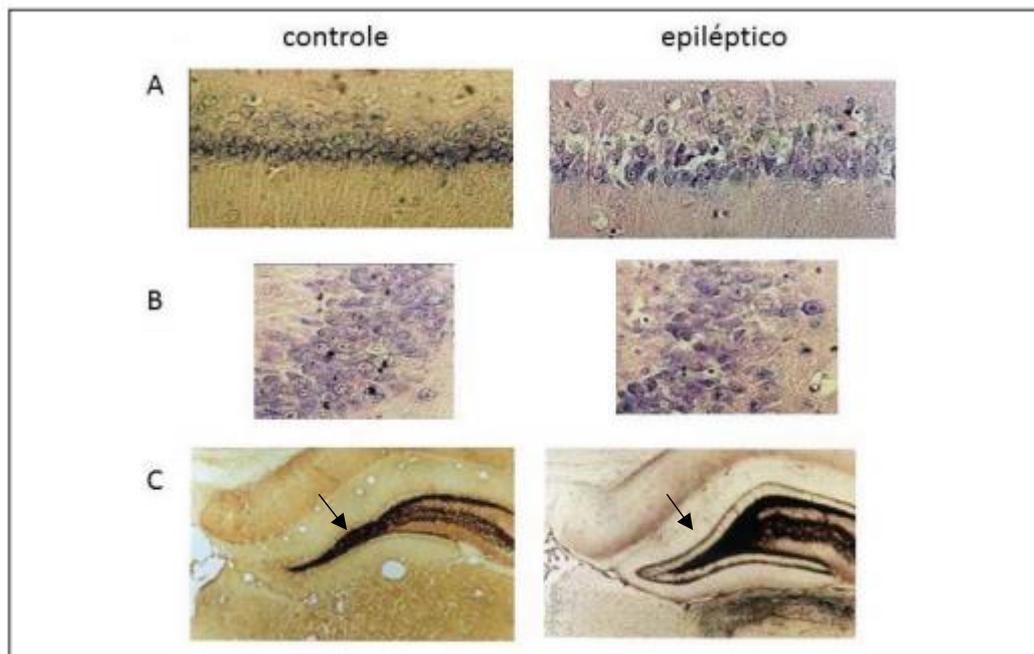


Figura 1 - Fotomicrografia de cortes coronais do hipocampo de ratos epiléticos, corado pela técnica de Cresil violeta e Neo –Tim. A) Coloração de Nissl região CA1 de ratos tratados com salina ratos com epilepsia ; B) coloração de Nissl região de CA3 C) Coloração de Neo-Tim C animais tratados com solução salina e ratos epiléticos. (SANABRIA YDEL C, et al.,2008).

1.3.1 *Status Epilepticus* e Excitotoxicidade

O *status epilepticus* é definido como crises convulsivas contínuas com pelo menos 30 minutos de duração. Uma série descontínua de convulsões (cada uma menor que 30 minutos) pode ser considerada também *status epilepticus*, caso não haja completa recuperação entre as convulsões. O SE pode levar a danos neurológicos permanentes e alterações neuropáticas que facilitariam o desenvolvimento de crises espontâneas e recorrentes (JAMA, 1993; SIMON SHORVON, 2006).

Do ponto de vista fisiopatológico das manifestações clínicas, o SE provoca elevação da temperatura, leucocitose periférica e pleiocitose temporária no líquido cefalorraquidiano. As crises convulsivas, com acometimento bilateral, são acompanhadas por um aumento na concentração plasmática de catecolamina, resultando em alterações na fisiologia sistêmica geral, incluindo hipertensão, taquicardia, arritmia cardíaca, hiperglicemia, acidose e hipertermia. (FIG. 2).

O mecanismo exato pelo qual uma crise de longa duração leva a morte celular ainda não foi completamente elucidado. Acredita-se, principalmente, na liberação de neurotransmissores excitatórios em grande quantidade na fenda sináptica, como o glutamato (GLU). O GLU é o principal neurotransmissor excitatório em mamíferos e está envolvido em

inúmeros eventos fisiológicos. Por exemplo, durante o desenvolvimento e envelhecimento cerebral, integração fisiológica entre as estruturas cerebrais, aprendizado e memória. Entretanto, a liberação em grandes quantidades na fenda sináptica pode gerar um fenômeno conhecido como de excitotoxicidade e disfunções agudas e crônicas no cérebro. (OZAWA; KAMIYA; TSUZUKI, 1998).

Os receptores de GLU são classificados em receptores ionotrópicos e metabotrópicos. Os ionotrópicos representados pelo receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), pelo α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato (AMPA), os receptores kainato (KA) (HOLLMANN, 1994). Os receptores ionotrópicos são aqueles que abrem quando se ligam ao GLU, promovendo o influxo de sódio (Na^+) e/ou Ca^{2+} e uma saída de potássio (K^+), levando a uma despolarização da célula.

Os receptores kainato possuem uma estrutura heteromérica permeável ao Na^+ e às vezes ao Ca^{2+} (HOLLMANN, 1994). A excitotoxicidade promovida pela ativação desse receptor pode ser devido à grande liberação de GLU e ao influxo de Ca^{2+} , que despolariza a membrana e libera Mg^{2+} , que bloqueia a entrada do receptor NMDA, ativando-o subsequentemente. (FERKANY; ZACZEK; COYLE, 1982).

O cálcio em excesso dentro do neurônio pode provocar morte através da estimulação de vários processos como a ativação de enzimas (proteases, lipases, endonucleases), formação de radicais livres e peroxidação de lipídios. O excesso de glutamato em seus receptores também pode ativar enzimas Ca^{2+} dependentes como a fosfolipase A2 (PLA2), fosfolipase C (PLC), proteína quinase C (PKC), proteína quinase II, óxido nítrico sintase (NOS) e endonucleases (SHOFFNER *et al.*, 1993). Este fenômeno conhecido como excitotoxicidade está associado principalmente com a ativação de receptores de glutamato (BEAL, 1992).

Além disso, a ativação de receptores metabotrópicos (mGluRs) (ACPD) pelo GLU pela liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares, porém, eles não medeiam diretamente a

excitotoxicidade, mas moldam esse fenômeno (DUGAN e CHOI, 1999).

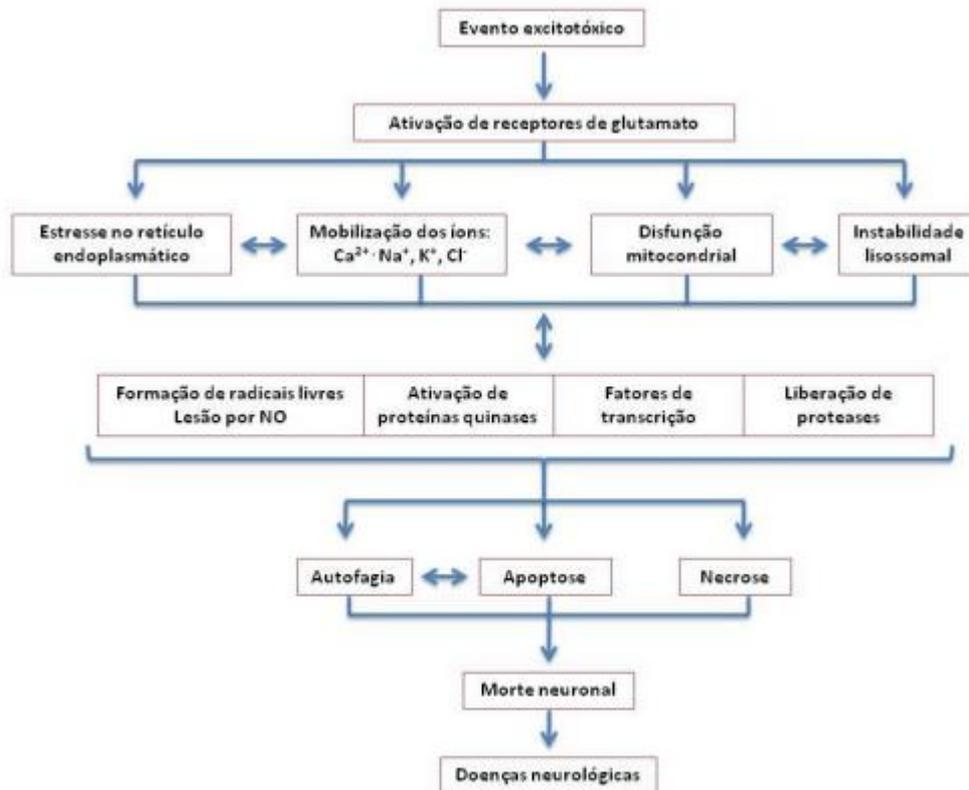


Figura 2 - Representação esquemática do mecanismo de excitotoxicidade em doenças neurológicas. (WANG et al., 2010).

Durante as crises epilépticas, ocorre o desequilíbrio entre a neurotransmissão excitatória (glutamatérgica), e inibitória (GABAérgica) sobre os circuitos neuronais. A diminuição da neurotransmissão GABAérgica e aumento na transmissão glutamatérgica pode causar um desequilíbrio energético e celular como por exemplo, estresse oxidativo e inflamação, o que leva a morte neuronal. (BENARROCH, 2010).

1.3.2 Epileptogênese e Inflamação

O tecido encefálico lesionado libera moléculas que estimulam a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 e TN α , favorecendo a expressão de moléculas de adesão e integrinas na membrana do endotélio vascular. Esse fenômeno facilitaria a adesão leucocitária e quimiotaxia da mesma população celular ao local lesionado. Isso permite, então, a transmigração de células da periférica para o foco lesionado no encéfalo (VEZZANI *et al.*,

2011). No encéfalo são encontrados três tipos celulares distintos: neurônios, a macroglia e a micrógliia. A macroglia é representada pelos oligodendrócitos e astrócitos, responsáveis, respectivamente, pelas funções de mielinização axonal e regulação de permeabilidade da barreira hemato-encefálica (DA COSTA, 1998). A micrógliia é representada pelos macrófagos residentes do SNC. Essas células ativadas liberam citocinas pró-inflamatória como, por exemplo, a IL-1 β (AMBROSI *et al.*, 2017).

Dentre os fatores que podem desencadear o fenômeno de neuroinflamação, pode-se citar a presença de agentes infecciosos, traumas, dano cerebral, isquemias ou doenças crônico-degenerativas (VEZZANI *et al.*, 2011).

Evidências experimentais e clínicas sugerem a relação entre ativação da resposta imune-inflamatória no encéfalo (neuroinflamação) e a epileptogênese assim como, no desenvolvimento de crises epiléticas (VEZZANI *et al.*, 2011; VEZZANI; GRANATA, 2005). A influência da resposta inflamatória na epilepsia foi observada em pacientes resistentes ao tratamento com drogas antiepiléticas, visto que estes apresentaram uma grande redução do número de crises após o uso de anti-inflamatórios (RIIKONEN, 2004).

O padrão de gliose reativa que ocorre de forma tardia inclui a ativação e proliferação de astrócitos e micrógliia (JORGENSEN *et al.*, 1993; KHURGEL e IVY, 1996; NIQUET *et al.*, REPRESA *et al.*, 1995). A micrógliia ativada tem sido descrita como sendo a principal fonte de fatores envolvidos nos processos inflamatória tais como a interleucina 1 β (IL-1 β) em tecido epilético (ZHAO e SCHWARTZ, 1998; YABUUCHI *et al.*, 1993; VEZZANI *et al.*, 1996). Além disso, existem várias evidências envolvendo as citocinas inflamatórias na patogênese da epilepsia tais como: i) a imunorreatividade à IL-1 α está aumentada nos tecidos de pacientes com ELT (SHEENG *et al.*, 1994); ii) ocorre um aumento da imunorreatividade à IL-1 β após crises induzidas no hipocampo pelo ácido caínico. Além disso, essas interleucinas tem efeitos pró-convulsivantes diretos (VEZZANI *et al.*, 1999); iii) altos níveis de RNAm para IL-1 β , IL-1 α , IL-6 e para o fator de necrose tumoral α (TNF α) foram encontradas em várias áreas do cérebro de roedores, após crises induzidas por ácido caínico (MINAMI *et al.*, 1991; YABUCHI *et al.*, 1993; PLATA-SALAM *et al.*, 2000); iv) a liberação de TNF α e a IL-6 de fatias hipocampais de ratos aumenta após crises induzidas pela injeção de ácido caínico na amígdala (de BOCK *et al.*, 1996). Além disso, De Simoni e colaboradores (2000), descrevem um aumento de RNAm para IL-1 β , IL-6, da enzima óxido nítrico sintetase induzida (iNOS) e do TNF α após SE induzido em ratos, por estimulação elétrica do hipocampo ventral. Foi verificado que após 6 horas de SE, a IL-1 β , IL-6 e o TNF α tiveram o nível máximo de

expressão de seu transcrito é ainda o RNAm da IL-1 β se manteve alto em ratos com crises espontâneas (60 dias após o SE), em relação aos animais controles.

Por outro lado, foi descrito que durante o SE, desenvolvido em modelos experimentais, ocorre uma superexpressão do fator de transcrição NF κ B em neurônios, assim como em astrócitos e micróglia. Essa expressão aumentada se mantém ainda duas semanas após o SE, sugerindo a participação do processo inflamatório em eventos pós-ictais, envolvidos na epileptogênese. (LERNER-NATOLI et al., 2000).

No encéfalo após uma lesão se liberam e ativam enzimas proteolíticas que facilitam a ativação o desenvolvimento do fenômeno inflamatório mediante ativação do sistema caliceínas cininas.

1.4 Sistema Caliceína-Cinina

As cininas pertencem a um grupo de peptídeos de 9-11 aminoácidos e incluem a bradicinina, calidina, t-cinina e seus metabólitos ativos, des-Arg⁹-cinina BK e des-Arg¹⁰ Lys-BK. Bradicininina e calidina são geradas através da clivagem proteolítica do precursor cininogênio de alto peso molecular e de baixo peso molecular, pelas caliceínas (FIG. 3). T-cinina foi identificada exclusivamente nos ratos (QADRI; BADER, 2018). Esses peptídeos sofrem rápida degradação metabólica por amino-, carboxi- e endopeptidases encontradas nos tecidos e fluidos biológicos. As cininas exercem seu efeito biológico através da ativação de dois receptores denominados receptores B1 e B2, que foram caracterizados farmacologicamente (COUTURE *et al.*, 2001; REGOLI; BARABÉ, 1980).

As cininas são os agonistas endógenos do receptor B2 predominante, enquanto a des-arg⁹-bradicinina e a des-arg¹⁰-calidina são os agonistas preferenciais para o receptor B1. As evidências atuais sugerem que as caliceínas e algumas proteases ativam diretamente o receptor B2 humano, independente da liberação da bradicinina. Assim, o receptor B2 pode pertencer a um novo grupo de receptores ativados por serina-proteases (HECQUET *et al.*, 2000). Ambos os genes dos receptores da bradicinina foram clonados em humanos e em várias espécies e a previsão de hidrofobicidade para os resíduos indicam que os receptores de bradicinina B1 e B2 têm sete domínios transmembrana da hélice, uma estrutura comum a outros membros da superfamília da rodopsina dos receptores acoplados à proteína G. (COUTURE *et al.*, 2001).

Enquanto o receptor B2 é constitutivo, o receptor B1 geralmente é pouco expresso condições fisiológicas. O receptor B1 é induzido em processos como por exemplo, infecção, algumas endotoxinas bacterianas, citocinas pro-inflamatórias como interleucina 1-B (IL-1B)

e fator de necrose tumoral alfa (TNF α). A indução do receptor B1 por citocinas é controlado pela proteína MAP quinase ativada por mitogênio e pelo fator nuclear transcricional kB (NFKb). (TERZUOLI *et al.*, 2014). Vários mecanismos de transdução de sinal foram descritos para as cininas dependendo do tipo celular. Isso inclui a ativação das fosfolipases A2, C e D com a liberação subsequente de prostaglandinas, óxido nítrico, fosfatos de inositol e diacilglicerol a partir de fosfolípidos de inositol de membrana, levando a mobilização de cálcio intracelular e ativação de várias isoformas da proteína quinase C. (BURCH, 1990).

Apesar das vias clássicas, o receptor B2 também está ligado à ativação das proteínas tirosina quinase e fosfatases, bem como da MAP quinase.

A função do sistema caliceína-cinina na dor, vasodilatação, inchaço, liberação de prostaglandinas, proliferação celular e como marcador de processos inflamatórios periféricos é bem conhecido, entretanto, sua ação no sistema nervoso precisa de mais estudos para melhor entendimento (QADRI; BADER, 2018). Alguns trabalhos mostram que, como outros peptídeos e seus receptores, os receptores de cininas, particularmente o B1, podem estar envolvidos na mobilização de glutamato e na excitotoxicidade. Segundo Bregola *et al.*, (1999), o peptídeo des-Arg9-BK, um potente agonista do receptor B1, foi capaz de aumentar a liberação de glutamato em cérebros de ratos submetidos ao modelo animal de epilepsia induzido por ácido caínico. Mazzuferi e colaboradores também observaram aumento dos níveis extracelulares de glutamato, mediados pelo agonista do receptor B1, apoiando a ideia de que o sistema caliceína-cinina contribuiu para a excitabilidade neuronal epiléptica. (MAZZUFERI *et al.*, 2005) A participação e modulação do receptor B2 de cininas no fenômeno epiléptico estão menos esclarecidas.

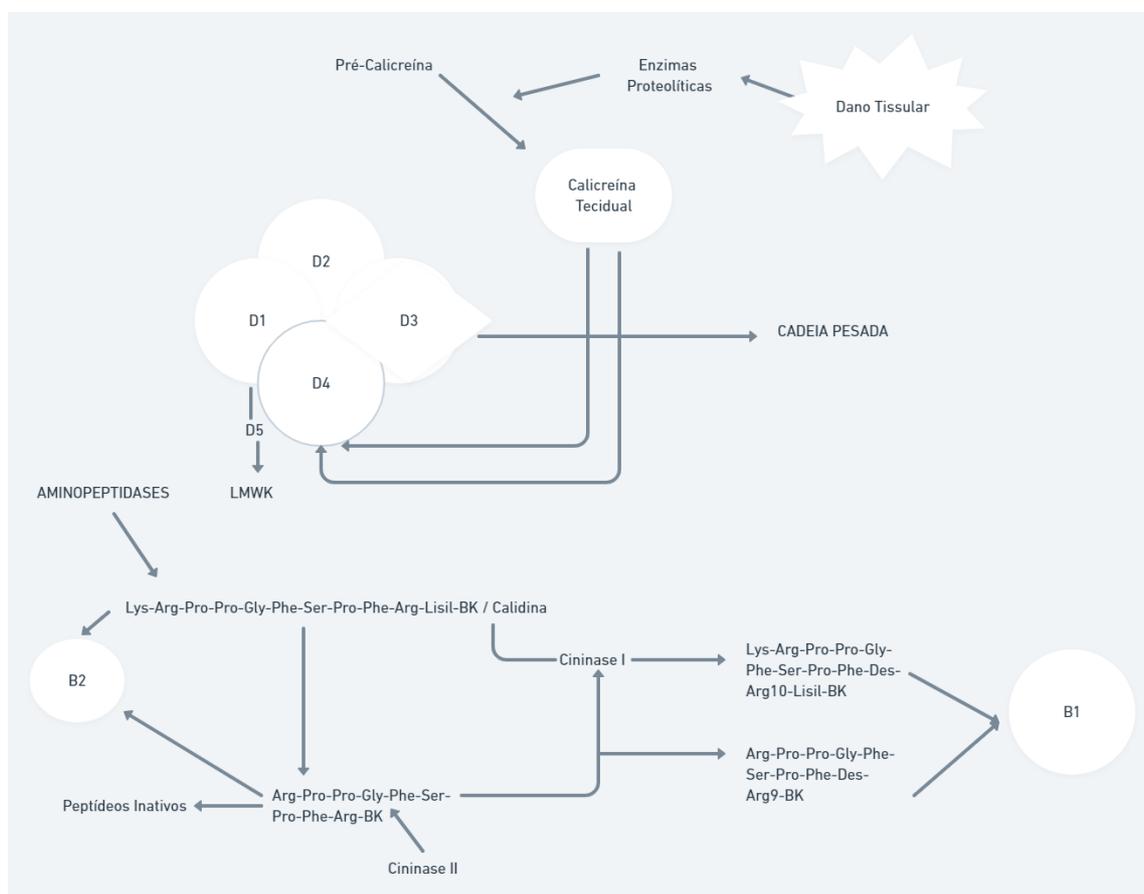


Figura 3 - Representação esquemática da ativação do sistema caliceína cininas. Após o dano tissular, enzimas proteolíticas são liberadas pelos tecidos. D1, D2, D3 e D4 representam os domínios da molécula do cininogênio com várias funções. D1, D2 e D3 constituem

Argañaraz e colaboradores mostraram um aumento significativo na expressão na expressão dos receptores B2 e B1 de cininas no hipocampo de ratos Wistar machos durante as fases agudas, silenciosa e crônica do modelo de epilepsia da pilocarpina (ARGAÑARAZ *et al.*, 2004). Em compensação o estudo de Ongali e colaboradores usando o modelo do abrasamento amigdaliano em ratos machos Sprague-Dawley observaram um declínio significativo dos locais de ligação ao receptor B2 em várias regiões do encéfalo como, por exemplo, nas regiões de CA1, CA2 e CA30. (ONGALI *et al.*, 2003). Com o intuito de estabelecer uma correlação funcional do receptor, Argañaraz e colaboradores mediante uma abordagem comportamental e histológica, observaram que camundongos nocautes para o receptor B2 apresentam maior frequência de crises espontâneas e recorrentes e maior grau de

brotamento de fibras musgosas em relação aos camundongos epiléticos selvagens (ARGAÑARAZ *et al.*, 2004). No entanto, os dados de Rodi e colaboradores mostraram em camundongos nocautes para o receptor B1, no modelo de ácido caínico, uma maior susceptibilidade a crises convulsivas quando comparado com os camundongos selvagem. (RODI *et al.*, 2013).

1.5 Epilepsia e Hormônios Sexuais

Os hormônios sexuais (estrogênio/progesterona) além de seus efeitos em órgãos periféricos participam na modulação da excitabilidade e sobrevida neuronal pela ativação de seus receptores amplamente distribuídos no SNC. Os receptores de estrogênio foram identificados no citoplasma, quando inativos, e no núcleo, quando ativados ou inativados. Os efeitos dos hormônios no SNC são mediados pela ligação a receptores específicos ou por meio de efeitos diretos deles em receptores de neurotransmissões das fendas sinápticas. Foram identificados receptores de estrogênio do tipo alfa e beta no SNC, ambos com uma estrutura similar, porém com distribuições e funções diferentes (MCEWEN, 1991).

Apesar dos receptores de estrogênio estar amplamente expressos no hipocampo de ratos adultos, tanto machos quanto em fêmeas (SAKUMA *et al.*, 2009), sua função ainda não foi totalmente esclarecida. Conforme Green e colaboradores (2000), os estrógenos apresentam inúmeros efeitos celulares, incluindo a ativação dos receptores nucleares específicos, aumento da expressão de proteínas anti-apoptóticas, interação com mecanismos intracelulares dependentes de segundo mensageiro, ativação glutamatérgica, além de manutenção da homeostase do cálcio intracelular e atividade antioxidante (GREEN; SIMPKINS, 2000). O aumento de AMPc com subsequente fosforilação do CREB contribuiria para os efeitos neuroprotetores do estradiol através do aumento da expressão da proteína BCL-2, da ativação da MAP quinase, ERK, ou inibição do Raf-1. Essa via ativada é conhecida ainda por modular outros efeitos celulares, incluindo a despolarização de neurônios hipotalâmicos, crescimento dendrítico e sinapses excitatórias, aumentando a expressão dos receptores NMDA, com aumento da potencialização sináptica no hipocampo (HOJO *et al.*, 2004; KIMOTO *et al.*, 2001).

A possível relação entre os hormônios sexuais e a excitabilidade neuronal tem sido observada e descrita a mais de 150 anos (PRINCE; TSENG, 1993; VELÍŠKOVÁ, 2006). Desde então, inúmeros pesquisadores têm relatado variação na frequência de crises epiléticas, em algumas mulheres, com a variação hormonal durante o ciclo ovárico, condição referida

como epilepsia catamenial. (HERZOG *et al.*, 1997; REDDY e ROGAWSKI, 2009). Além disso, as crises epiléticas ocasionam alterações no eixo hipotálamo-hipofisário que leva a alterações nos níveis sanguíneos dos hormônios sexuais que influenciam na morte neuronal em crises epiléticas. (ZHANG, C. *et al.*, 2009)

Por outro lado, estudos clínicos e experimentais evidenciaram a influência dos hormônios sexuais, na morte neuronal consequência de crises convulsivas e nas síndromes epiléticas. Por exemplo, estudos epidemiológicos sugerem que a prevalência e incidência de crises convulsivas é maior em homens que em mulheres, assim como o risco de desenvolver as síndromes epiléticas (HAUSER *et al.*, 1991; McHUGH e DELANTY, 2008).

Na ELT também foi observado diferenças, entre os pacientes homens e mulheres, quando considerado a extensão do dano neuronal e generalização secundária das crises epiléticas (VELISKOVA; DESANTIS, 2013). Estudos realizados em modelos experimentais confirmam os achados clínicos. Por exemplo, em modelos de ELT como, como da pilocarpina e ácido caínico, as crises clônicas generalizadas se evidenciaram com maior intensidade e com maior frequência em ratos machos quando comparados com ratos fêmeos. (MEJIAS-APONTE *et al.*, 2002). Além disso, repetidas doses de β estradiol teve um efeito pró-convulsivante, assim como, de maior intensidade nas crises após administração de pilocarpina e/ou ácido caínico em ratos machos. Em ratos fêmeas ovariectomizadas o efeito foi contrário, isto é, um efeito anticonvulsivante e menor intensidade das crises convulsivas. (GALANAPOLOU *et al.*, 2003; NICOLETTI *et al.*, 1985).

Estudos também têm mostrado o estrogênio tem efeito na plasticidade neuronal em modelos experimentais. Evidências farmacológicas e comportamentais sugerem que a ativação dos receptores de estrogênio (HECQUET *et al.*, 2000) possui efeito regulatório na plasticidade sináptica do hipocampo, bem como efeito benéfico nos mecanismos cognitivos de roedores. (ARNOLD; BEYER, 2009; ZHANG, C. *et al.*, 2009).

Por outro lado, os efeitos da progesterona em modelos de epilepsia mostraram efeitos dependentes do sexo dos animais. Por exemplo, Nicoletti e colaboradores mostraram que a progesterona tem efeito anticonvulsivo em ratos fêmeas e pró-convulsivo em ratos machos no modelo de epilepsia do ácido caínico (NICOLETTI *et al.*, 1985). Além de isso, Hoffan e colaboradores mostraram em ratos fêmeas ovariectomizadas, que receberam tratamento com progesterona, diminuição na intensidade das crises e a morte neuronal no hipocampo quando comparado com os animais controle no modelo de epilepsia do lobo temporal induzido pelo ácido caínico (HOFFMAN *et al.*, 2003). Estudos mostram que os efeitos nas crises convulsivas

da progesterona parecem mediados pelo efeito alostérico da *allopregnanolona* nos receptores GABA_A.

Finalmente, durante os anos 80, a hipótese de uma produção local de estrogênio no cérebro de mamíferos foi proposta por Baulieu e colaboradores. (BAULIEU, 1981) A demonstração direta da esteroidogênese no cérebro não foi comprovada inicialmente, devido a níveis muito baixos destas substâncias no sistema nervoso central (HU *et al.*, 1987). Posteriormente esta hipótese foi confirmada com a evidência da síntese de neuroesteróides em regiões como o hipocampo mesmo após a remoção de glândulas periféricas envolvidas na esteroidogênese (HOJO *et al.*, 2004; KIMOTO *et al.*, 2001). A expressão da proteína regulatória da esteroidogênese (StAR), e da enzima aromatase, duas moléculas essenciais à síntese de estrogênios já foi demonstrado no hipocampo de ratos adultos (FESTER *et al.*, 2011). Yague e colaboradores mostraram mediante imuno-histoquímica, a expressão da aromatase na formação hipocampal e a relevância da biossíntese de estrógenos no SNC, em condições fisiológicas. A imunorreatividade a aromatase foi evidente em neurônios piramidais (CA1, CA3), células granulares do hilo do giro dentado e em interneurônios de tecidos procedente de pacientes portadores de epilepsia do lobo temporal e no tecido controle. (YAGUE *et al.*, 2010).

2. JUSTIFICATIVA & RELEVANCIA

A expectativa média de vida da população mundial, e inclusive a brasileira, aumentou nos últimos anos e com isso também houve um aumento da incidência de doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson. Nessas doenças, como na epilepsia do lobo temporal, há um processo inflamatório intenso acompanhado de uma perda neuronal importante. As células da glia, (microglia, astrócitos) especialmente a microglia têm um papel importante na produção e liberação de mediadores inflamatórios como as citocinas pró-inflamatórias. Essas moléculas participam ativamente na morte celular deflagrada pela resposta imune e inflamatória ativada após um insulto no SNC. A possibilidade que os hormônios sexuais regulem a expressão dos componentes do sistema calcitreína-cininas no SNC surge da observação de eventos a nível periférico como, por exemplo: I) O gene da calcitreína humana tem sítios de ligação para o estrógeno e a progesterona no rim e pâncreas (Murray *et al.*, 1990); II) Os níveis do RNAm da calcitreína são maiores em ratos fêmeas quando comparado com ratos machos. Após ovariectomia a diferença entre machos e fêmeas diminui e aumenta novamente a diferença após reposição hormonal com estrogênio (MADEDDU, *et al.*, 1991) III) A expressão do gene da calcitreína diminui após ovariectomia

no fígado e se reestabelece após tratamento com estrogênio. Devido a que a modulação da expressão do receptor B2 de cininas no SNC ainda não foi totalmente elucidada, levantamos a hipótese que a expressão deste receptor possa ser modulada pelos hormônios sexuais (estrogênios e/ou progesterona). Esperamos que este estudo nos permita obter uma melhor compreensão do efeito dos hormônios sexuais (estrogênios e/ou progesterona) no SNC o que por sua vez facilitará o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para prevenir e ou retardar a neurodegeneração melhorando a qualidade de vida da população.

3. OBJETIVOS

Estudar a influência dos hormônios sexuais na expressão do receptor B2 de cininas em ratos Wistar fêmeas ovariectomizadas (OVX) e não ovariectomizadas (NOVX) submetidas ao modelo de epilepsia induzido por pilocarpina.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para atingir o objetivo geral proposto, o estudo foi desenvolvido em etapas, de modo a alcançar os seguintes objetivos específicos:

1. Identificar as fases do ciclo estral em ratos Wistar fêmeas OVX e NOVX;
2. Avaliar a expressão do receptor B2 de cininas, no hipocampo de ratos Wistar fêmeas OVX e NOVX, durante o *SE*;
3. Avaliar a expressão do receptor B2 de cininas, no hipocampo de ratos Wistar fêmeas OVX e NOVX, durante o período silencioso do modelo de epilepsia da pilocarpina;
4. Avaliar a expressão do receptor B2 de cininas, no hipocampo de ratos Wistar fêmeas OVX e NOVX, durante o período crônico do modelo de epilepsia da pilocarpina.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os protocolos experimentais utilizados nestes trabalhos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Brasília, UnBDOC nº 149670/2015. Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento do animal, de acordo com a International Ethical Guidelines (CIOMS/OMS, 1985).

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Animais

Foram utilizados ratos fêmeos da raça Wistar albinas adultas pesando 200-250g mantidas em condições controladas com ciclo claro/escuro (12/12h), temperatura de $21\pm 2^{\circ}\text{C}$, com livre acesso à água e ração por todo o período do experimento. Os animais foram provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina da UnB e mantidos no lugar durante toda a realização do experimento.

4.1.2 Drogas e Reagentes

Foram utilizadas drogas de diversas procedências. Da Synth (São Paulo, Brasil) foram utilizados sulfeto de sódio, álcool, xilol e o paraformol. O anticorpo monoclonal anti-receptor B2 de BK foi obtido da Transduction Laboratories (Lexington, KY, EUA). O kit ABC foi obtido da Vectastain Elite (Burlingame, CA, EUA). As soluções de Avidina e Biotina foram provenientes da Dako (Vila Real, CA, EUA). A agarose foi adquirida da BioRad Laboratories (Hercules, CA, EUA). O Triton X-100, o EDTA, o Tris-HCl, a metilescopolamina, as lâminas silanizadas, o MOPS, o acetato de sódio, a formamida e o 3,3' diaminobenzidina foram provenientes da Sigma (St Louis, MO, EUA). Da Merck (Darmstadt, Alemanha) foram utilizados, o cloreto de sódio, o bicarbonato de sódio, o fosfato de sódio monohidratado, o peróxido de hidrogênio, o isopropanol, o cloreto de potássio, a sacarose, o nitrato de prata, a goma arábica, o citrato de sódio monohidratado, o ácido cítrico, a hidroquinona, o entellan e a pilocarpina. A albumina, a saponina, os anticorpos secundários biotinilados, o formaldeído foi adquirido da Calbiochem (Biosciences, inc., La Jolia, CA, EUA). Provenientes da Pharmacia Biotech utilizaram a acrilamida, a glicina e o ácido bórico (Uppsala, Sweden). Da Life Technologies, utilizamos o TRIzol (Grand Island, N.Y., USA) e o clorofórmio (Carlsbad, CA).

4.1.3 Equipamentos

Além dos equipamentos normalmente utilizados em laboratório, tais como: balança analítica, pHmetro e agitador magnético foram utilizados os seguintes aparelhos:

- Micrótomo da Jung CM1800-LEICA
- Microscópio confocal- LSM510 da CARL ZEISS
- Homogeneizador – VirSonic 60 da Virtis
- Centrífuga – Eppendorf – 5804R

- Cuba de Eletroforese – Life Technologies – Horizon 11-14, série 11069
- Densitômetro UVITEC Cambridge

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Cirurgia de Ovariectomia (OVX)

Para a retirada dos ovários dos ratos fêmeas Wistar, foi utilizada a cirurgia de ovariectomia. O anestésico foi aplicado por via intraperitoneal. Após a anestesia, foi feita a tricotomia na região dorsal entre o rebordo costal inferior e a coxa, fazendo a assepsia desta região com álcool. O animal foi colocado em decúbito ventral, e foi realizada uma incisão de aproximadamente três centímetros na pele e tecido subcutâneo a cerca de um centímetro lateralmente à linha mediana. Foi divulsionado a parede muscular até ter acesso a cavidade abdominal, localizando o ovário em meio a uma massa gordurosa. A retirada do ovário foi realizada após a ligadura da extremidade da tuba uterina, seccionando entre a ligadura e o ovário. Após este procedimento, foi colocado o útero dentro da cavidade abdominal, suturando a parede muscular e, em seguida, a pele. Foi repetido o mesmo procedimento do outro lado do animal e foi repetida a assepsia no final do procedimento. Após a cirurgia, os animais receberam Dipirona (200mg/kg) e Meloxicam (0,2mg/kg).

4.2.2 Método Lavado Vaginal

Nos ratos Wistar fêmeas (n=30) antes de ser induzido o SE foi realizado o lavado vaginal para verificação da fase do ciclo estral. Os esfregaços vaginais foram coletados com uma pipeta de plástico, preenchidos com 0,2 ml de soro fisiológico (NaCl a 0,9%), colocando a ponta na vagina dos ratos fêmeas, de forma cuidadosa para evitar a estimulação do colo do útero. As coletas e análises das secreções vaginais foram realizadas diariamente, três vezes ao dia. Três gotas de conteúdo vaginal de cada animal foram colocadas em uma lâmina para permitir a análise no microscópio de amplificação de 10x e 40x sem o uso de coloração. Uma lâmina de vidro foi usada para cada animal.

4.2.3 Indução do modelo experimental de epilepsia pela pilocarpina em ratos Fêmeas Wistar

Com o objetivo de identificar as fases do ciclo estral nos ratos Wistar fêmeas (NOVX e OVX), antes de induzir a condição de SE, foi realizado o esfregaço vaginal nesses animais. Após identificar a fase estro do ciclo estral os animais NOVX e a fase diestro nos animais OVX se procedeu a induzir o SE. Os animais NOVX e OVX foram pré-tratados com uma injeção subcutânea de metil-escopolamina na dose de 1mg/kg, Trinta minutos após foi administrada pilocarpina na dose 320 mg/Kg por via intraperitoneal, (PILO, Sigma, St Louis, MILLSTONE) e/ou solução salina (cloreto de sódio 0,9%).

A partir do quadro comportamental observado os ratos fêmeas Wistar NOVX e OVX, foram divididos em quatro grupos:

A) Grupo SE: animais que, após tratamento com pilocarpina, apresentaram crises convulsivas auto-mantidas e que foram eutanasiados com 5h de SE

B) Grupo SIL: animais que, após a fase de SE voltaram à normalidade comportamental e foram eutanasiados com 5 dias após a injeção da pilocarpina

C) Grupo CR: animais que, após as fases SE e silenciosa, apresentaram crises convulsivas espontâneas e recorrentes. Estes animais foram eutanasiados 30 dias após a primeira crise espontânea e recorrente, durante o período interictal evitando deste modo a possível interferência da crise epiléptica com os resultados.

D) Grupo CTR: Estes animais foram pré-tratados com metil-escopolamina, porém trinta minutos após, receberam solução salina (Cloreto de sódio 0,9%) em substituição a pilocarpina.

4.2.4 Análise da Expressão do Receptor B2 de Cininas

Para a análise da expressão do receptor B2 de cininas, foi utilizada a técnica de *Western Blot*. Os animais foram decapitados e seus encéfalos foram imediatamente retirados sobre placa de gelo. Os hipocampos foram rapidamente removidos e congelados a -80°C.

A) Preparo e Homogeneização dos Tecidos

Os tecidos foram homogeneizados em 3 volumes de tampão de Lise (NaCl 0,1M, Tris-HCl 0,0,1M, pH 7.6, EDTA pH 8, NP 40 1% e glicerol 10%). Imediatamente antes de homogeneizar o tecido, foram adicionados a este tampão, PMSF 10uM, Metavanadato 1mM, NaF 0,0,5M, ácido okadaico 2nM e uma mistura de inibidores de protease (aprotinina 0,08mM, Leupeptina 2mM, Bestatina 4mM, Pepstatina A 1,5mM e E64 1mM, Sigma).

As amostras foram então homogeneizadas por ultrassom (Virsonic 60 da Virtis), e a concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry et al., 1951.

B) Separação de Proteínas em gel de poliacrilamida e SDS (SDS-Page)

Após a homogeneização, as amostras foram diluídas em tampão Laemmly, fervidas por 50 minutos e então armazenadas em freezer -80°C. Inicialmente, foi feita uma curva padrão para obtenção de quantidade ideal de proteína proveniente do hipocampo a ser utilizada na eletroforese e *Western Blot*.

Foi realizada então uma eletroforese em gel de resolução 10% composto por (30%) acrilamida e metil-bisacrilamida (Pharmacia Biotech), Tris 1,5M pH 8,8, Dodecil Sulfato de Sódio 10% persulfato de amônio 10%, Temed (Pharmacia Biotech) e água bidestilada. Para obtenção desta curva padrão foi realizada então a eletroforese utilizando-se de 5ug a 40ug de proteína hipocampal homogeneizada. Uma solução padrão contendo proteínas conhecidas de pesos moleculares diferentes (Caleidoscópio, Bio-Rad) foi aplicada ao gel para identificação da banda presente na amostra de interesse. O tampão de corrida foi composto de 25mM Tris-HCl (pH8,3), 200mM de glicina (USB) e 1% de SDS. O sistema de eletroforese (Bio-Rad: Mini Protean, 7,5x10cm) foi ajustado para trabalhar a 80V, 30mA por 120 minutos.

A seguir, as proteínas foram transferidas eletricamente para uma membrana de nitrocelulose (GE) utilizando-se tampão tris (25mM, pH 8,3), contendo 193mM de glicina e 20% metanol. A transferência foi realizada a 50V com duração de 60 minutos (Bio-Rad: Mini trans-blot cell 7,6 X 10cm).

Posteriormente, as membranas foram incubadas por 2 horas, a temperatura ambiente em uma solução de leite 5% em PBS-T 0,1M pH 7,4 + 0,01% Tween 20 (Sigma) e mantida sob leve agitação, para bloqueio dos sítios inespecíficos. Em seguida, a membrana foi então incubada com anticorpo primário (Anti-B2 de cinians 1:1000 BD), diluído em solução de leite 2% em PBS-T pH 7,4 e mantida à temperatura de 4°C durante a noite.

Após a incubação as membranas foram lavadas (3x5 min) em PBS-T 0,1M (pH 7,4), em seguida as membranas foram colocadas em uma solução contendo o anticorpo secundário biotilado (anti-mouse BD), na diluição de 1:2000, por um período de 2 horas à temperatura ambiente e sob leve agitação. As membranas foram lavadas novamente (3x5 min) em PBS-T 0,1M (pH 7,4) e então colocadas em uma solução do Kit ABC por 90 minutos. Ao final, as membranas foram novamente lavadas e submetidas ao processo para imunodeteção das bandas empregando o Kit de quimioluminescência ECL (GE). A revelação da membrana foi feita em um fotodocumentador.

Em seguida, as respectivas bandas identificadas nas membranas foram quantificadas com o auxílio do densitômetro e os dados plotados utilizando-se a razão entre a densidade óptica (D.O) da proteína do receptor B2 de cininas e a D.O da β -actina correspondentes para corrigir possíveis erros durante o procedimento.

4.2.5 Imuno-histoquímica

Para a realização da técnica de imuno-histoquímica, inicialmente os ratos fêmeas Wistar NOVX e OVX foram anestesiados (pentobarbital (60 mg/kg) e perfundidos transcardiacamente com tampão fosfato-salina (PBS) 0,1M, seguido de paraformoldeído 4% em PBS. Posteriormente foram removidos os encéfalos imediatamente após a perfusão, deixados na mesma solução fixadora (paraformoldeído) entre 18-24 horas e por mais 24 horas em solução de sacarose 30% em PBS a 4°C. A seguir os encéfalos foram congelados em 2-metilbutano (-20°C) e estocados a -70°C até serem processados. Os encéfalos foram cortados em criostato e fatias de 45 μ m foram coletadas e lavas 3 vezes em PBS 0,1M pH7,4. Após este procedimento, as fatias foram incubadas com solução de peróxido de hidrogênio 1% (Merck) por 10 minutos, para o bloqueio da atividade das peroxidases endógenas no tecido. Em seguida, as fatias foram incubadas em solução de albumina bovina 10% (Calbiochem) em PBS+Triton X-100 0,3% (Sigma) por 2 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, os cortes foram incubados em solução com albumina 2% contendo o anticorpo primário anti-B2 (Purified Mouse Anti-B2 Bradykinin Receptor) na concentração de 1:1000, à temperatura de 4°C *overnight*. Após três lavagem consecutivas, as fatias foram incubadas em uma solução contendo o anticorpo secundário biotilado (Calbiochem), na diluição de 1:250 por um período de 2 horas a temperatura ambiente. Em seguida as fatias foram colocadas em uma solução do kit ABC (complexo avidina-biotina Vector) por 90 minutos. Posteriormente, as fatias foram reveladas com 3,3'-diaminobenzidina (DAB) 1mg/ml (Sigma) em Tris-HCl 0,05M (Sigma) (pH7,6) e peróxido de hidrogênio (Merk) 1ul/ml. O DAB é um substrato cromogênio da enzima peroxidase, que confere ao sítio onde se encontra complexo estreptavidina-peroxidase uma cor castanha amarelada ao sofrer a ação dessa enzima, permitindo a visualização da imuno-marcação. Por fim, as fatias foram montadas, desidratadas, diafenizadas e cobertas com lamínulas, usando-se Estellan.

Após esses procedimentos, as lâminas foram analisadas em microscópio óptico e fotografadas.

4.2.6 Análise da Expressão Gênica

4.2.6.1 Extração de RNA total de estruturas cerebrais

Os animais dos grupos experimentais foram decapitados e os cérebros foram retirados sobre placa de gelo. Para a extração do RNA total do tecido, os hipocampos bilaterais foram dissecados rapidamente, congelados em nitrogênio líquido e estocado à -80°C.

O RNA total obtido do hipocampo de acordo com o protocolo original do reagente TRIzol, respeitando-se as quantidades relativas aos ml de TRIzol por grama de tecido. Inicialmente, as amostras no volume adequado de TRIzol foram homogeneizadas mecanicamente, e incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos.

Foram adicionados 0,2ml de clorofórmio para cada ml de TRIzol inicial, agitando vigorosamente por 15 segundos. A amostra foi novamente incubada a 30°C, por mais dois minutos. Todo esse período permitiu a lise celular total bem como a remoção de proteínas associadas ao RNA. Centrifugamos a amostra a 12.000g por 15 minutos a 4°C. A solução mostrou duas fases separadas por uma interfase branca, rica em DNA. As proteínas se encontram majoritariamente na fase vermelha fenólica inferior, enquanto o RNA total ficou na fase superior, geralmente incolor. A fase superior, adicionamos 0,5ml de isopropanol para cada ml de TRIzol inicial. Para a precipitação, aguardamos 10 minutos à temperatura ambiente e então submetemos a uma centrifugação a 12.000g por 10 minutos a 4°C. Descartamos o sobrenadante e o precipitado foi lavado com etanol 70% (preparado com água livre de DNase RNase). A mistura foi centrifugada a 7.500g por 5 minutos. Aguardamos a secagem total do precipitado à temperatura ambiente e ressuspinemos o RNA em um volume de água ultrapura.

4.2.6.2 Análise do RNA

O RNA extraído foi suspenso em água ultrapura em um volume adequado entre 20-25 µl para se obter uma concentração aproximada de 1 µg/ul de RNA de cada amostra. Para quantificação foi utilizado o aparelho NanoDrop One/One (Thermo-Scientific). Imediatamente após quantificado o RNA foi analisado em relação a integridade e a possível contaminação com DNA genômico em gel de agarose. Para isso, foi preparado uma eletro-separação das amostras em gel de agarose em condições denaturantes, seguindo a fórmula de 100ml de gel nas seguintes condições: 1,2g de agarose dissolvidos em 70ml de água por aquecimento, adição de 10ml de tampão MOPS 10x (0,2 M MOPS pH 7, 10mM de EDTA, 50mM de acetato de

sódio). A solução foi resfriada a aproximadamente 60°C adicionado 5,4ml de formaldeído. Após polimerização, deixamos o gel por 30 minutos a 4°C. As amostras foram preparadas adicionando-se a cada uma 3,5µl de formaldeído, 10µl de formamida e tampão MOPS (1x). Para a completa desnaturação, as amostras foram aquecidas por 70°C por 10 minutos e imediatamente colocadas no gelo por 3 minutos. Centrifugamos brevemente para coletar água condensada e adicionamos 2,5µg de brometo de etídeo e tampão de amostra (1X) em cada amostra.

A corrida eletroforética por realizada aplicando-se uma voltagem variável de não mais de 5 V/cm, sendo a corrida efetuada em MOPS (1X) a 4°C. A integridade do RNA foi confirmada pela presença das duas principais bandas ribossomais 28S e 18S na altura aproximadamente de 4.7kb e 1.9kb. Para apenas visualização e análise, utilizamos de 200ng a 1µg de RNA total.

4.2.6.3 Ensaio de transcrição reversa (RT-PCR) e PCR em tempo real (qPCR)

Com o objetivo de se obter o cDNA das amostras de RNA foi realizado o ensaio RT-PCR. Prévio ao ensaio de RT-PCR as amostras foram tratadas com a enzima DNase (Promega) e seguido o protocolo do fabricante. Posteriormente, se procedeu a realizar a reação de RT-PCR. Para reação foi usado 2µg de RNA total o qual foi adicionado a 4µl do Máster Mix SuperScript IV VILO (ThermoFisher Scientific), o qual utiliza oligonucleotídeos iniciadores randômicos. Os parâmetros utilizados no termociclador (Bio-Rad) foram: 25° C por 10 minutos, 50° C por 10 minutos, 85° C por 5 minutos e 4C. Posteriormente, o DNA complementar (cDNA) foi utilizado para a quantificação mediante a técnica de PCR quantitativa em tempo real (qPCR). Para a reação foi utilizado 400ng do cDNA, que foi adicionado a 5µl do Kit TaqMan Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems) e as sondas TaqMan para os receptor B2 de cininas e para o gene GAPDH (Applied Biosystems). Na reação foi realizada no aparelho StepOne Plus Real Time PCR System (Applied Biosystems) com os seguintes ciclos: 95° C por 20 minutos, 95° C por 1 segundo e 60° C por 20 segundos, sendo que os últimos dois ciclos se repetem 40 vezes.

4.2.7 Análise Estatística

Foi utilizado o teste t-student para comparar os grupos. O software utilizado foi o SPSS 20.0. Resultados com $p > 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5. RESULTADOS

5.1 Identificação das fases ciclo estral

Com o objetivo de identificar as fases do ciclo estral, em ratos Wistar fêmeas OVX e NOVX, foram analisados os tipos celulares nos esfregaços vaginais. Foram identificadas as seguintes fases do ciclo estral: a) metaestro, b) diestro, c) proestro e d) estro. Na fase metaestro, foram identificadas células epiteliais, cornificadas e alguns poucos leucócitos (Fig. 4A). Na fase diestro foram identificados predominantemente tipos celulares com morfologia leucócitos (Fig. 4B). Na fase proestro, foi observado o comportamento de lordose característico do cio. Em esta fase foram identificadas células epiteliais nucleadas (Fig. 4C). Na fase estro quando acontece à ovulação, cio, foram identificadas apresenta células cornificadas anucleadas (Fig. 4D).

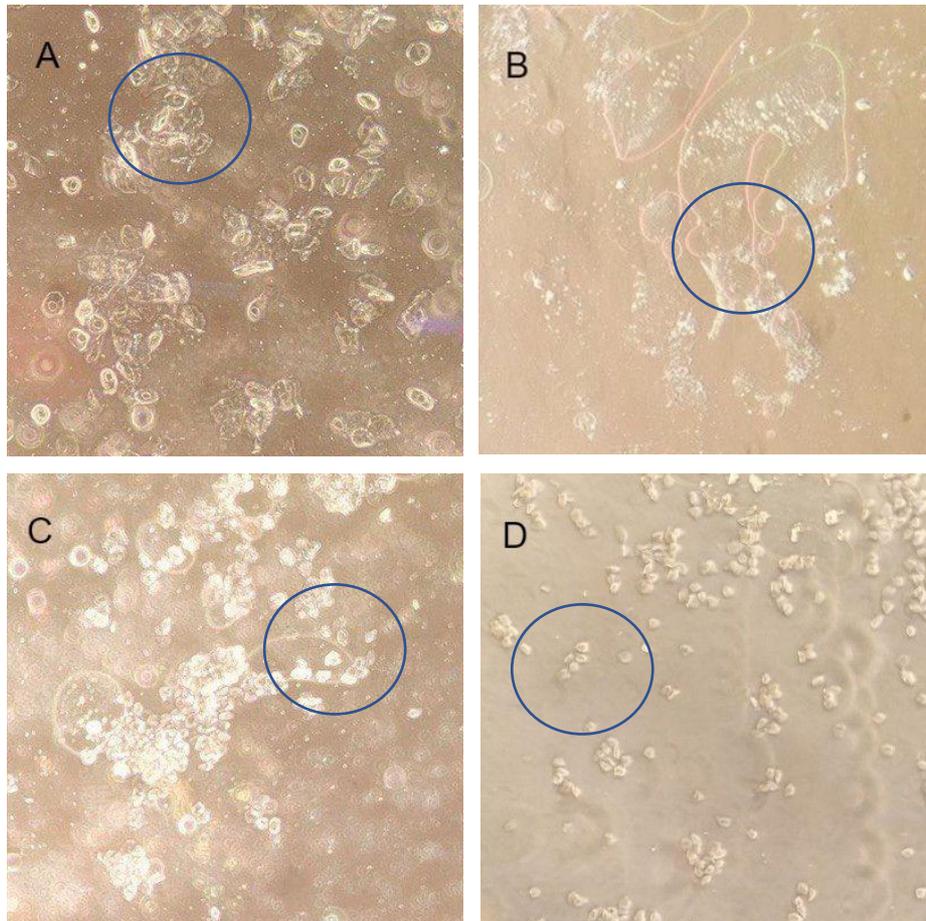


Figura 4 - Esfregaços vaginais em ratos Wistar fêmeas NOVX e OVX. Lâminas nas diferentes fases do ciclo estral de Wistar NOX e OVX; A) Metaestroestro: se células epiteliais cornificadas, alguns leucócitos; B) Diestro: abundancia de leucócitos; C) Proestro: células epiteliais nucleadas. D) Estro: células cornificadas anucleadas. Aumento de 20x.

5.2 Análises comportamentais após administração da pilocarpina

A confirmação da indução do *status epilepticus* foi avaliada por análise comportamental. Poucos minutos após a administração da pilocarpina os animais apresentaram movimentos mastigatórios, hipocinesia, salivação, tremores generalizados, clonias das patas anteriores apoiadas nas patas superiores e crises límbicas parciais e generalizadas. Aproximadamente 30 minutos após a injeção da pilocarpina as crises evoluíram para o SE (fase aguda). Os animais com SE, após um período em média de 18hs, apresentaram um comportamento normal com duração em média de 15 dias (fase silenciosa). O aparecimento de crises espontâneas deu início a fase crônica do modelo de epilepsia. Dessa (forma foi possível confirmar resultados prévios de Cavalheiro e cols 1994; Leite e cols 1990).

5.3 Expressão do receptor B2 de cininas em ratos fêmeas NOVX

5.3.1 Expressão gênica do receptor B2 de cininas no hipocampo de ratos Wistar fêmeas, no grupo SE.

Em um primeiro momento, os níveis de expressão gênica do receptor B2 de cininas foram avaliados mediante a técnica de qPCR, nos hipocampos de ratos Wistar fêmeas nos grupos SE e CTR. A expressão do RNAm do receptor B2 de cininas nos hipocampos do grupo SE mostrou uma diminuição significativa quando comparado com o grupo CTR ($p= 0.0284$ $n=3$) (Fig. 5).

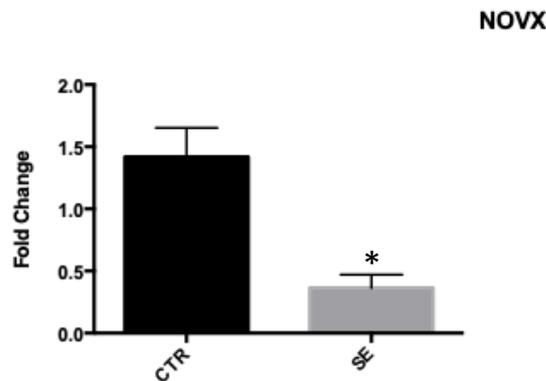


Figura 5 - Expressão do RNAm do receptor B2 de cininas no hipocampo de ratos Wistar fêmeas NOVX no grupo SE. Os níveis de expressão dos mRNAs nos hipocampus de ratos Wistar fêmeas NOVX nos grupos SE (5hs de SE) e CTR (animais tratados Sal) foram avaliados mediante q PCR. Os valores estão expressos como média + desvio padrão *p=0.028 Teste T-Student (n=3).

Com o intuito de confirmar os resultados anteriores, foram avaliados os níveis de expressão proteica do receptor B2 de cininas no hipocampo de ratos Wistar fêmeas NOVX, pela técnica de “Western Blotting”. Foram detectadas bandas de 42 e de 44 KDa correspondentes ao receptor B2 de cininas. A análise por densitometria óptica após normalização com a expressão do gene de β -actina mostrou uma diminuição significativa na expressão do receptor B2 de cininas no grupo experimental SE (5HSE) quando comparado com o grupo CTR **p=0.0039. Teste estatístico: T Student N=4. (Fig. 6).

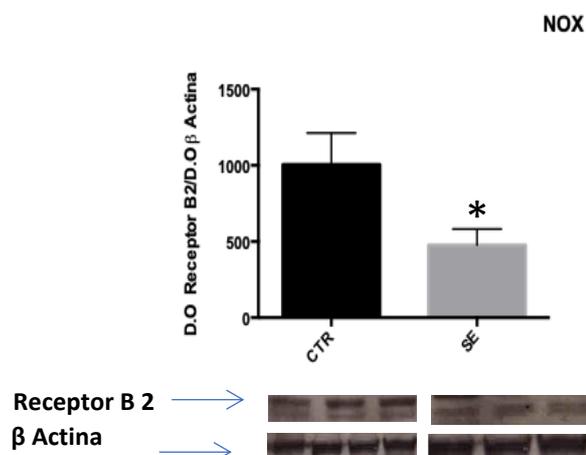


Figura 6 - Expressão do receptor B2 de cininas no hipocampo de ratos Wistar fêmeas NOX no grupo SE. A expressão do receptor B2 de cininas em ratos NOX nos grupos CTR e SE foi avaliada mediante a técnica de Western Blotting. Os valores estão expressos como média + desvio padrão **p=0.00039 Teste T-Student (n=4).

5.3.2 Expressão proteica do receptor B2 de cininas nos hipocampus de ratos Wistar Fêmeas no grupo SIL.

Os níveis de expressão do receptor B2 de cininas no hipocampo de ratos Wistar Fêmeas no grupo silencioso foram avaliados pela a técnica de “Western Blotting”. A análise por densitometria óptica das bandas de 42 e de 44 KDa correspondentes ao receptor B2 de cininas e após normalização com a expressão do gene de β-actina mostrou uma diminuição significativa na expressão do receptor do receptor B2 de cininas no grupo silencioso, quando comparado com o grupo CTR *p=0.012. Teste estatístico: T Student n=4. (Fig. 7) .

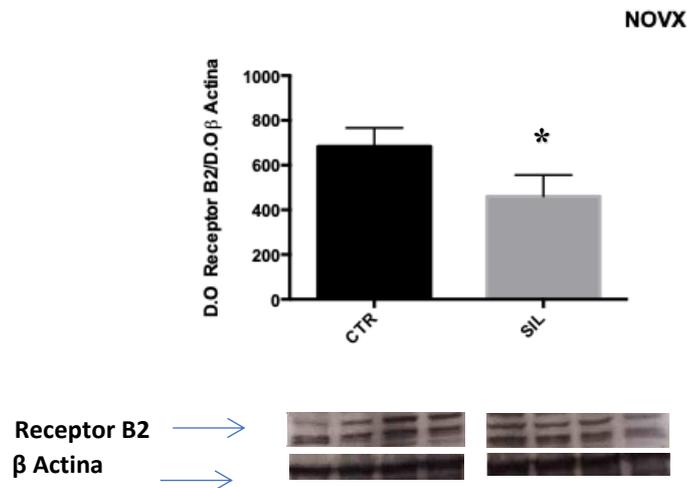


Figura 7 - Expressão do receptor B2 de cininas no hipocampo de ratos Wistar fêmeas NOVX no grupo SIL. A expressão do receptor B2 de cininas em ratos NOVX nos grupos CTR e SIL foi avaliada mediante a técnica de “Western Blotting”. Os valores estão expressos como média + desvio padrão *p=0.0012. Teste T-Student (n=4).

5.3.3 Expressão proteica do receptor B2 de cininas no hipocampo de ratos Wistar Fêmeas no grupo crônico

Os níveis de expressão do receptor B2 de cininas no hipocampo de ratos Wistar Fêmeas no grupo crônico foram avaliados pela a técnica de “Western Blotting”. A análise por densitometria óptica das bandas de 42 e de 44 KDa correspondentes ao receptor B2 de cininas e após normalização com a expressão do gene de β-actina não mostrou diferença significativa na expressão do receptor do receptor B2 de cininas no grupo CR, quando comparado com o grupo CTR *p=0.012. Teste estatístico: T Student N=4 (Fig. 8).

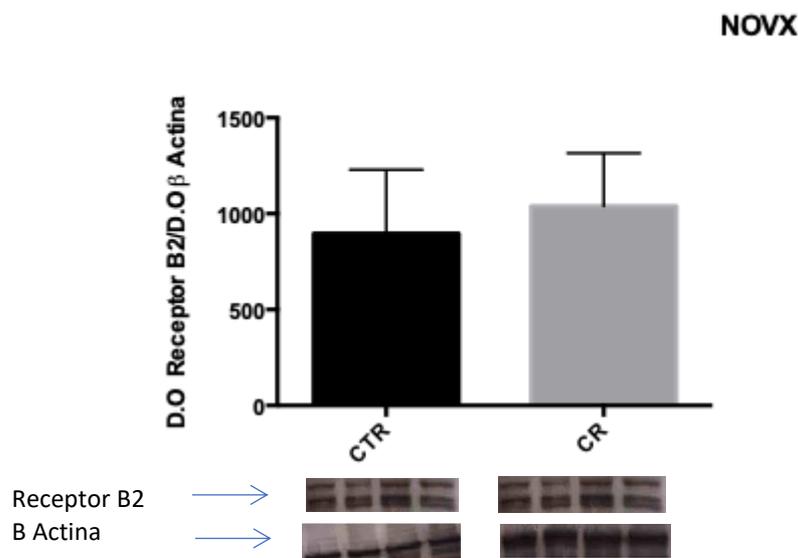


Figura 8 - Expressão do receptor B2 de cininas nos hipocampus de ratos Wistar fêmeas NOVX no grupo CR. A expressão do receptor B2 de cininas em ratos NOVX nos grupos CTR e CR foi avaliada mediante a técnica de “Western Blotting”. Os valores estão expressos como média \pm desvio padrão $p=0.53$. Teste T-Student ($n=4$).

5.3.4 Expressão proteica do receptor B2 de cininas no tecido de hipocampo de ratos Wistar fêmeas NOVX

Com objetivo de confirmar resultados anteriores e identificar a localização da expressão do receptor B2 de cininas, no tecido da formação hipocampal, foi utilizada a técnica de imunohistoquímica. Embora os resultados mostraram um padrão de marcação semelhante em toda à formação hipocampal, houve intensidade de marcação diferente entre os quatro grupos analisados (Fig. 9). Diferentemente, nos grupos SE e SIL foi evidenciada uma imunoreatividade menos intensa para o receptor B2 nas células piramidais (CA1 e CA3), nas células granulares e do hilo do giro dentado na formação hipocampal, quando comparada com os respectivos grupos CTR (Fig. 9, 10, 11,12). A imunoreatividade para o receptor B2 foi localizada tanto no citoplasma e na membrana plasmática das células piramidais no hipocampo, nas células granulares e do hilo do giro dentado.

Um detalhe ampliado da marcação das células piramidais nas regiões de CA1 e CA3, das células granulares e do hilo do giro dentado na formação hipocampal dos grupos estudados e mostrado nas figuras 10, 11 e 12.

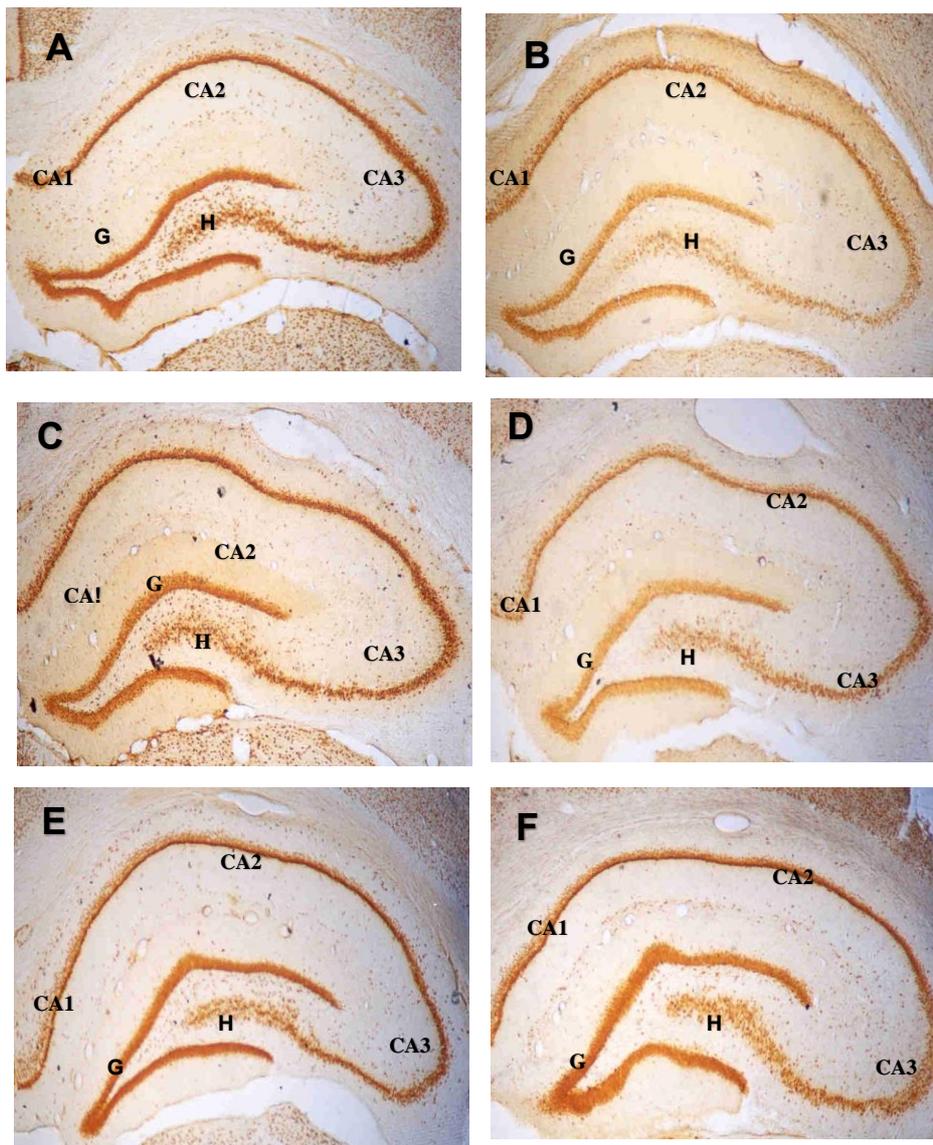


Figura 9 - Fotomicrografias da imunreatividade do receptor B2 de Cininas, no hipocampo de ratos Wistar Fêmeas NOVX de todos os grupos. A, C, E Hipocampo de ratos Wistar Fêmeas CTR (tratadas com solução fisiológica) B, D, F Hipocampo de ratos Wistar Fêmeas nos grupos SE, SIL e CR respectivamente. CA1, CA2, CA3, G (células granulares), H (hilo do giro dentado). Ampliação 2,5X

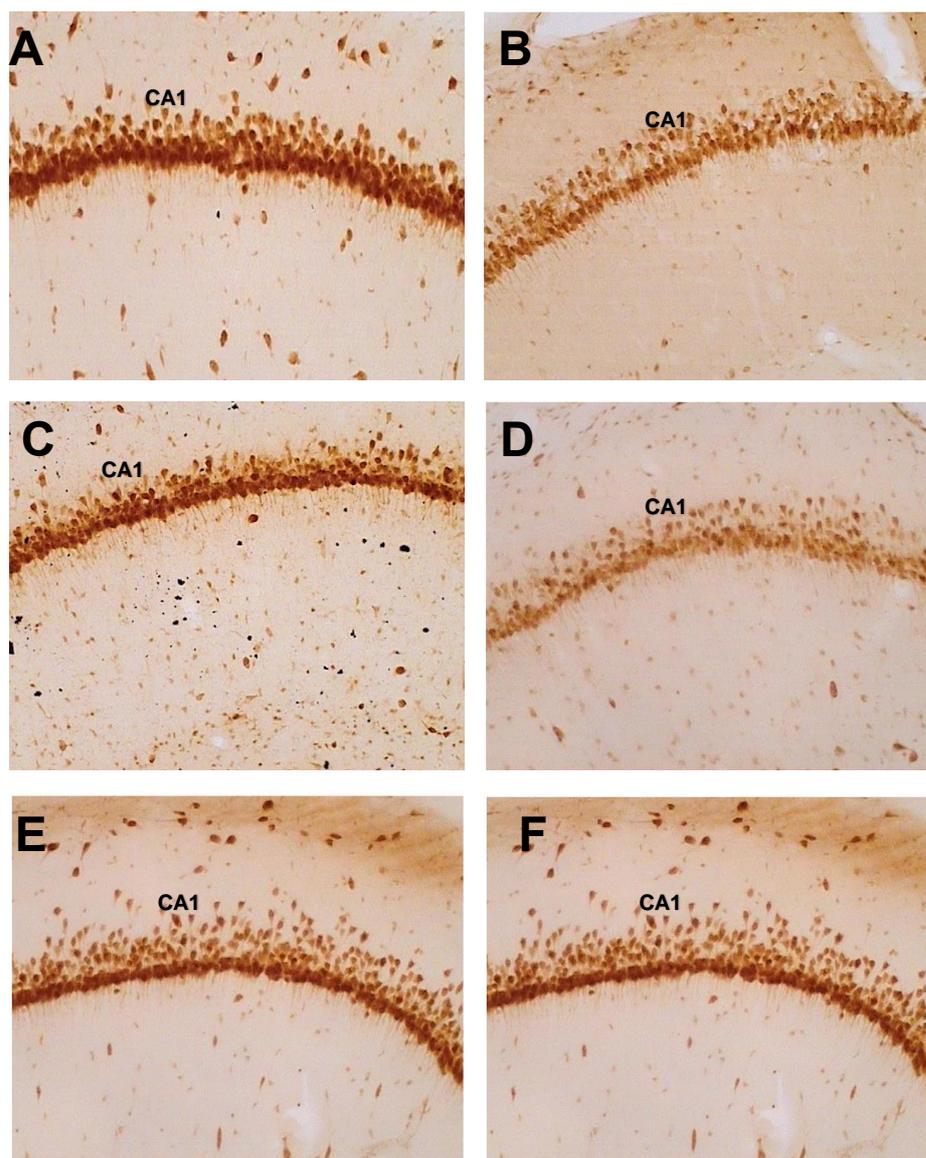


Figura 10 - Fotomicrografias da imunreatividade do receptor B2 de Cininas. Região de CA1 na formação hipocampal de ratos Wistar Fêmeas NOVX de todos os grupos. A, C, E Hipocampo de ratos Wistar Fêmeas dos grupos CTR (tratadas com solução fisiológica) B, D, F, Hipocampo de ratos Wistar Fêmeas nos grupos SE, SIL e CR. CA1 – células piramidais. Ampliação 20X.

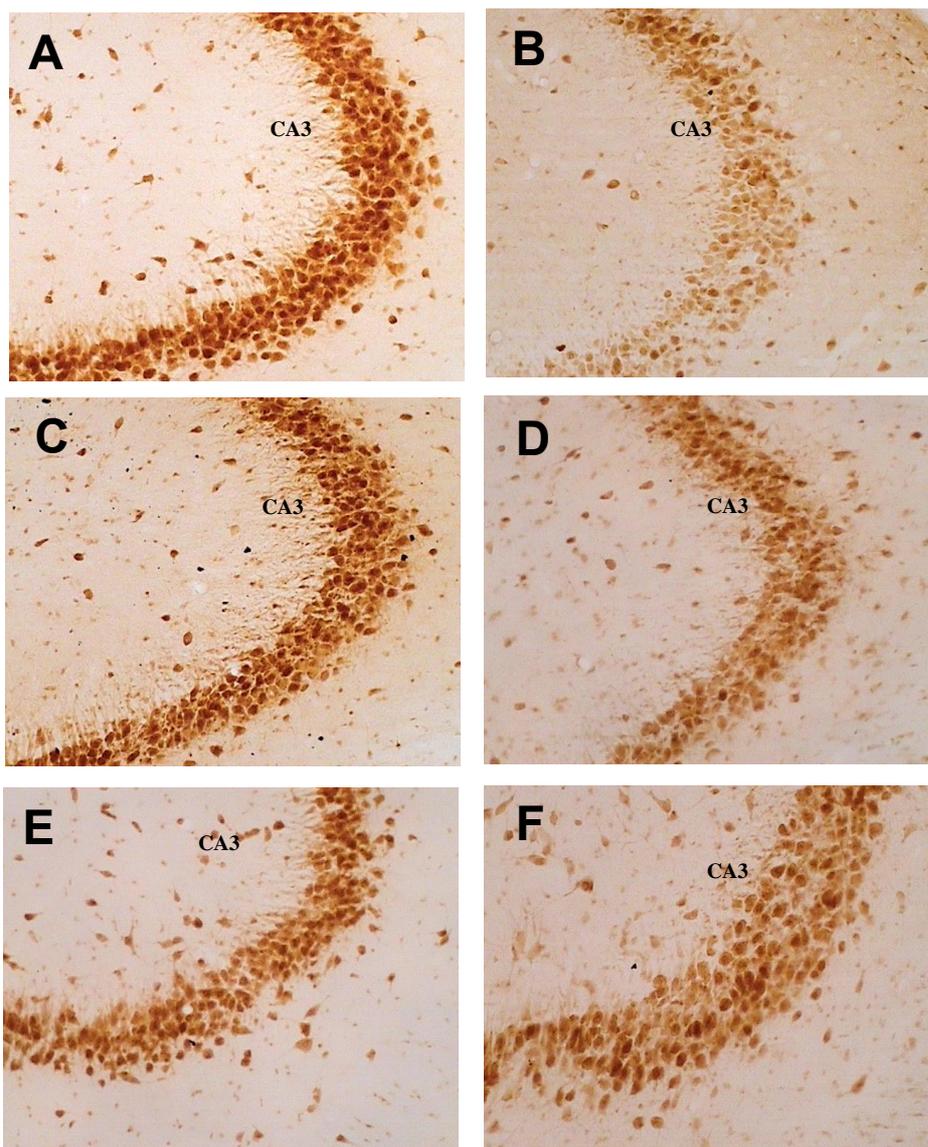


Figura 11 - Fotomicrografias da imunreatividade do receptor B2 de Cininas da Região de CA3 na formação hipocampal de ratos Wistar Fêmeas NOVX de todos os grupos. A, C, E Hipocampo de ratos Wistar grupos CTR (tratadas com solução fisiológica) B, D, F Hipocampo de ratos Wistar Fêmeas dos grupos SE, SIL e CR. CA3 células piramidais. Ampliação 20X.

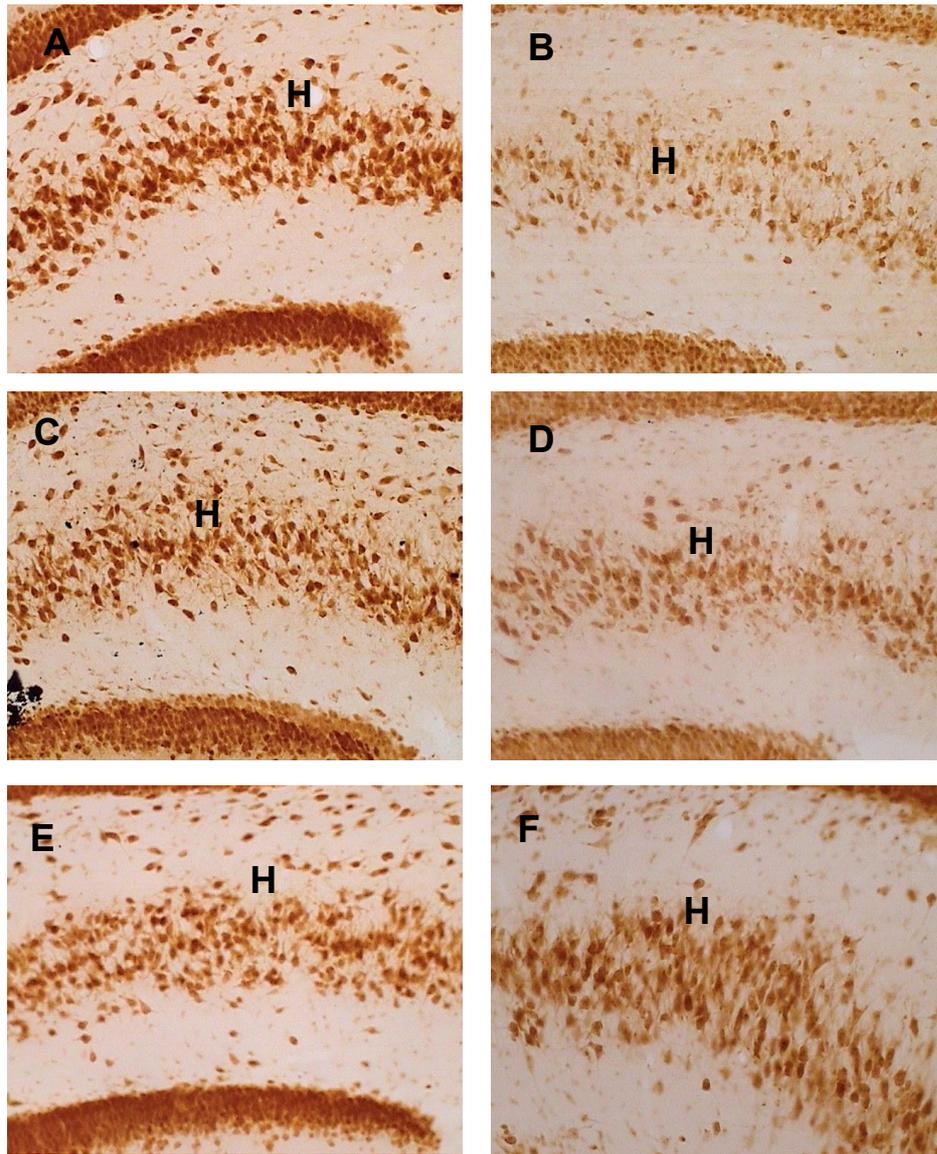


Figura 12 - Fotomicrografias da imunreatividade do receptor B2 de Cininas. Região do hilo do giro dentado na formação hipocampal de ratos Wistar Fêmeas NOVX de todos os grupos. A, C, E Hipocampo de ratos Wistar Fêmeas dos grupos CTR (tratadas com solução fisiológica). D, F, F Hipocampo de ratos Wistar fêmeas dos grupos SE, SIL e CR. H: células do hilo do giro dentado. Ampliação 20X.

5.4 Expressão do receptor B2 de cininas em ratos fêmeas ovariectomizadas (OVX)

5.4.1 Expressão gênica dos receptores B2 de cininas nos hipocampus de ratos Wistar fêmeas OVX, do grupo SE

Em um primeiro momento, os níveis de expressão gênica do receptor B2 de cininas foram avaliados mediante a técnica de qPCR, nos hipocampus de ratos Wistar fêmeas nos grupos SE e CTR. A expressão do RNAm do receptor B2 de cininas nos hipocampus do grupo SE não mostrou diferença significativa quando comparado com o grupo CTR *p= 0.42 n=3 (Fig. 13).

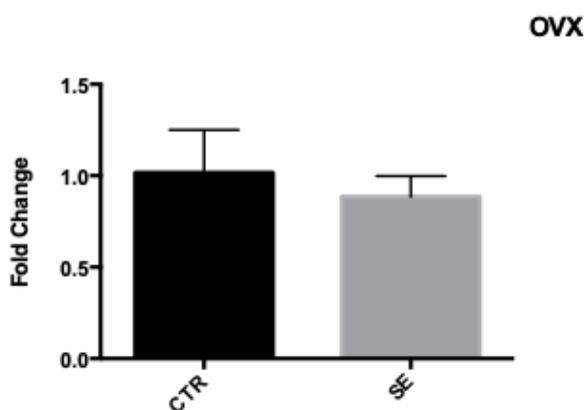


Figura 13 - Expressão do RNAm do receptor B2 de cininas nos hipocampus de ratos Wistar fêmeas OVX do grupo SE. Os níveis de expressão dos mRNAs nos hipocampus de ratos Wistar fêmeas OVX nos grupos SE e CTR foram avaliados mediante qPCR. Os valores estão expressos como média + desvio padrão *p=0.42. Teste T-Student (n=3).

Com o intuito de confirmar os resultados anteriores, foram avaliados os níveis de expressão proteica do receptor B2 de cininas no hipocampo de ratos Wistar fêmeas NOVX, pela técnica de “Western Blotting”. Foram detectadas bandas de 42 e de 44 KDa referente ao receptor B2 de cininas. A análise pela densitometria óptica após normalização com a expressão do gene de β -actina mostrou uma diminuição significativa na expressão do receptor B2 de cininas no grupo experimental SE quando comparado com o grupo CTR **p=0.0035. Teste estatístico: T Student N=4. (Fig. 14).

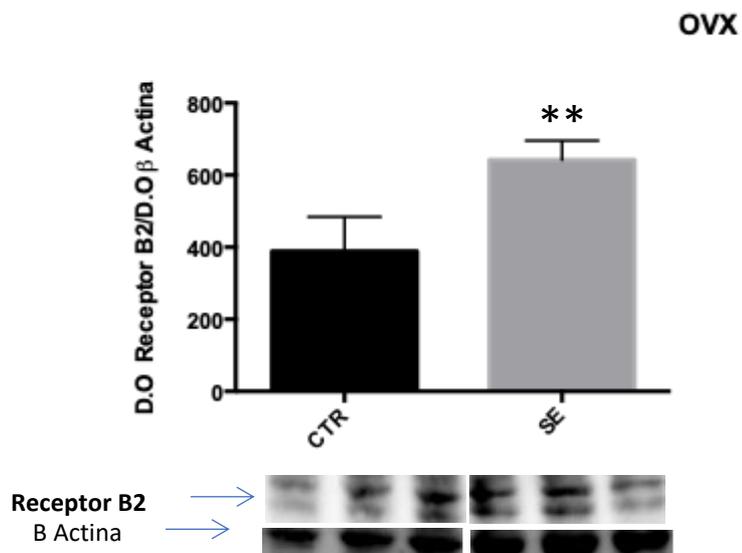


Figura 14 - Expressão do receptor B2 de cininas no hipocampo de ratos Wistar fêmeas OVX do grupo SE. A expressão do receptor B2 de cininas nos ratos fêmeas OVX dos grupos CTR e SE foi avaliada mediante a técnica de “Western Blotting”. Os valores estão expressos como média + desvio padrão ** $p=0.00035$ Teste T-Student (n=4)

5.4.2 Expressão do receptor B2 de cininas nos hipocampus de ratos Wistar Fêmeas OVX no grupo SIL

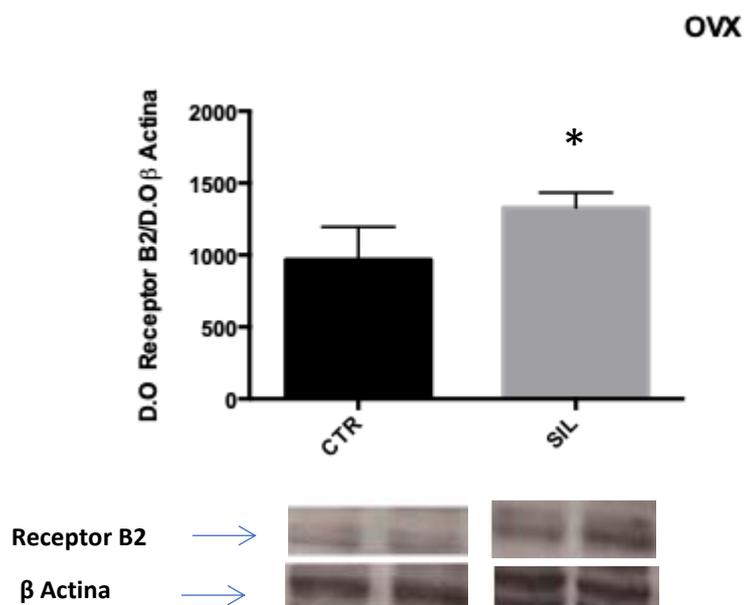


Figura 15 - Expressão do receptor B2 de cininas no hipocampo de ratos Wistar fêmeas OVX do grupo SIL. A expressão do receptor B2 de cininas em ratos fêmeas OVX nos grupos CTR e SIL foi avaliada mediante a técnica de “Western Blotting”. Os valores estão expressos como média + desvio padrão * $p=0.00278$ Teste T-Student (n=4).

5.4.3 Expressão do receptor B2 de cininas nos hipocampos da ratos Wistar Fêmeas OVX do grupo CR

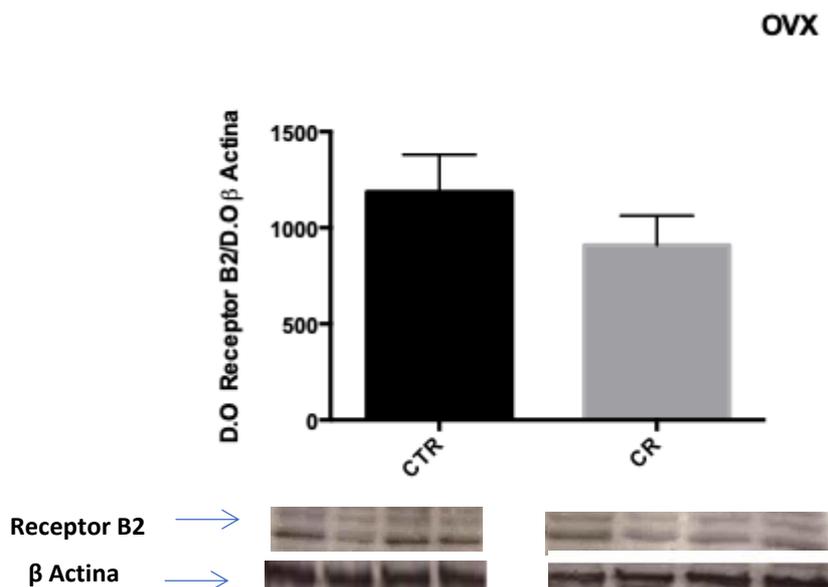


Figura 16 - Expressão do receptor B2 de cininas no hipocampo de ratos Wistar fêmeas OVX do grupo CR. A expressão do receptor B2 de cininas em ratos fêmeas OVX nos grupos CTR e CR foi avaliada mediante a técnica de "Western Blotting". Os valores estão expressos como média + desvio padrão $p=0.006$ Teste T-Student ($n=4$).

5.4.4 Imunoreatividade para o receptor B2 de cininas em ratos Wistar Fêmeas ovariectomizadas

Com objetivo de confirmar resultados anteriores e identificar a localização da expressão do receptor B2 de cininas, no tecido da formação hipocampal, foi utilizada a técnica de imunohistoquímica. Embora os resultados mostraram um padrão de marcação semelhante em toda a formação hipocampal, houve intensidade de marcação diferente entre os quatro grupos analisados (Fig. 17). Diferentemente, nos grupos SE e SIL foi evidenciada uma imunoreatividade menos intensa para o receptor B2 nas células piramidais (CA1 e CA3), nas células granulares e do hilo do giro dentado na formação hipocampal, quando comparada com os respectivos grupos CTR (Figura 17, 18, 19, 20). A imunoreatividade para o receptor B2 foi localizada tanto no citoplasma e na membrana plasmática das células piramidais no hipocampo, nas células granulares e do hilo do giro dentado.

Um detalhe ampliado da marcação das células piramidais nas regiões de CA1 e CA3, das células granulares e do hilo do giro dentado na formação hipocampal dos grupos estudados e mostrado nas figuras 18, 19 e 20.

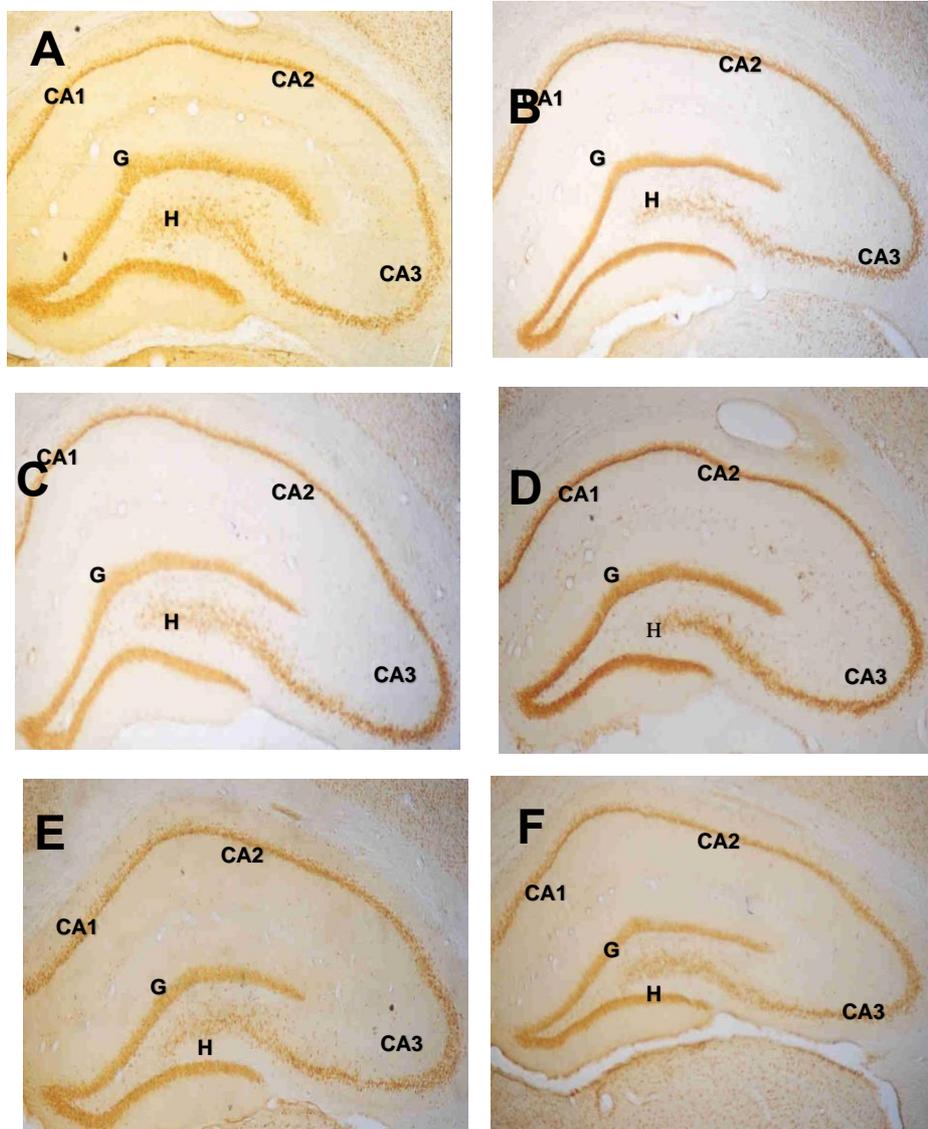


Figura 17 - Fotomicrografias da imunreatividade do receptor B2 de Cininas no do hipocampo de ratos Wistar Fêmeas OVX de todos os grupos. A, C, E Hipocampo de ratos Wistar Fêmeas CTR (animais tratadas com solução fisiológica) B, D, F Hipocampo de ratos Wistar Fêmeas dos grupos SE, SIL e CR. Ampliação 2,5X

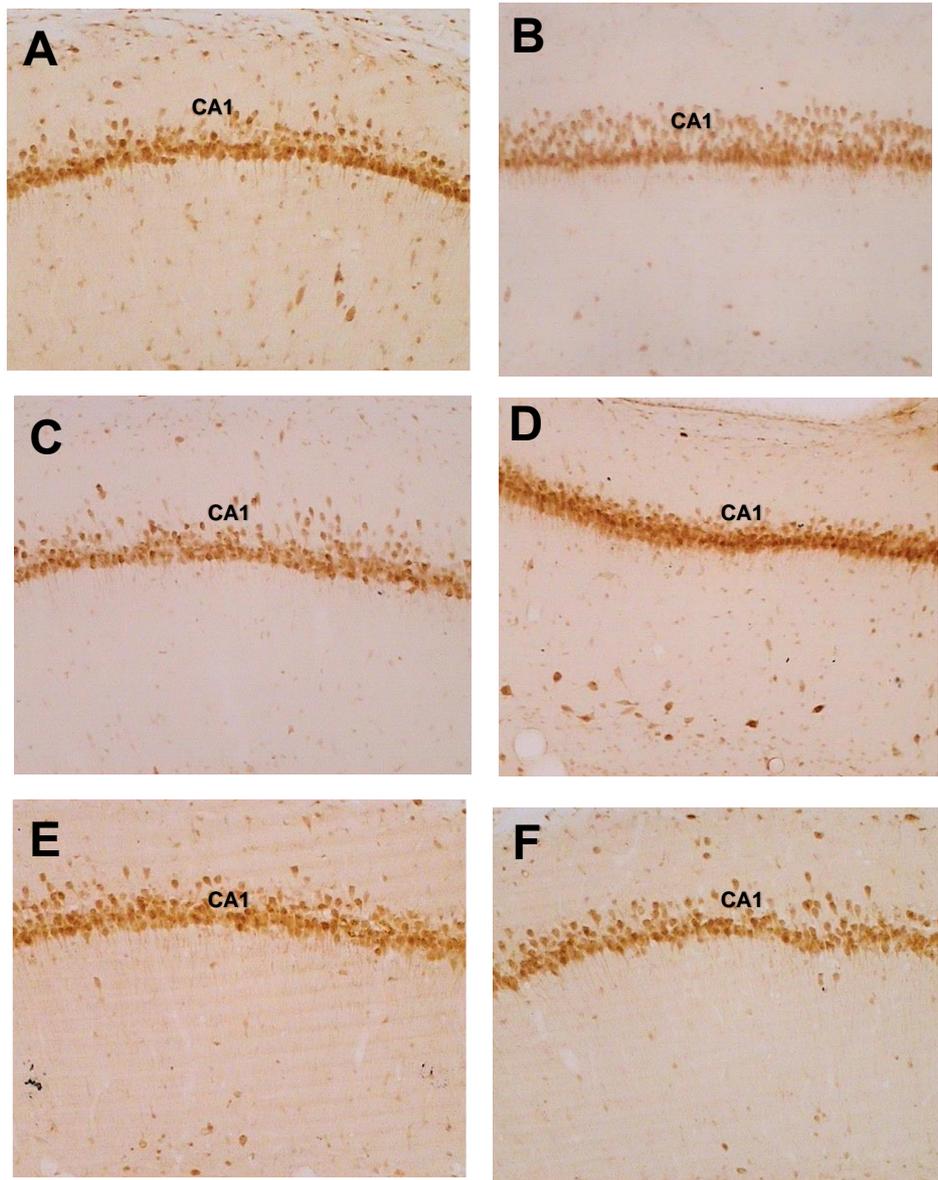


Figura 18 - Fotomicrografias da imunreatividade do receptor B2 de cininas na região de CA1 na formação hipocampal de ratos Wistar Fêmeas OVX de todos os grupos A, C, E Hipocampo de ratos Wistar Fêmeas CTR (animais tratadas com solução fisiológica) B, D, F Hipocampus de ratos Wistar fêmeas dos grupos SE, SIL e CR. Ampliação 20x.

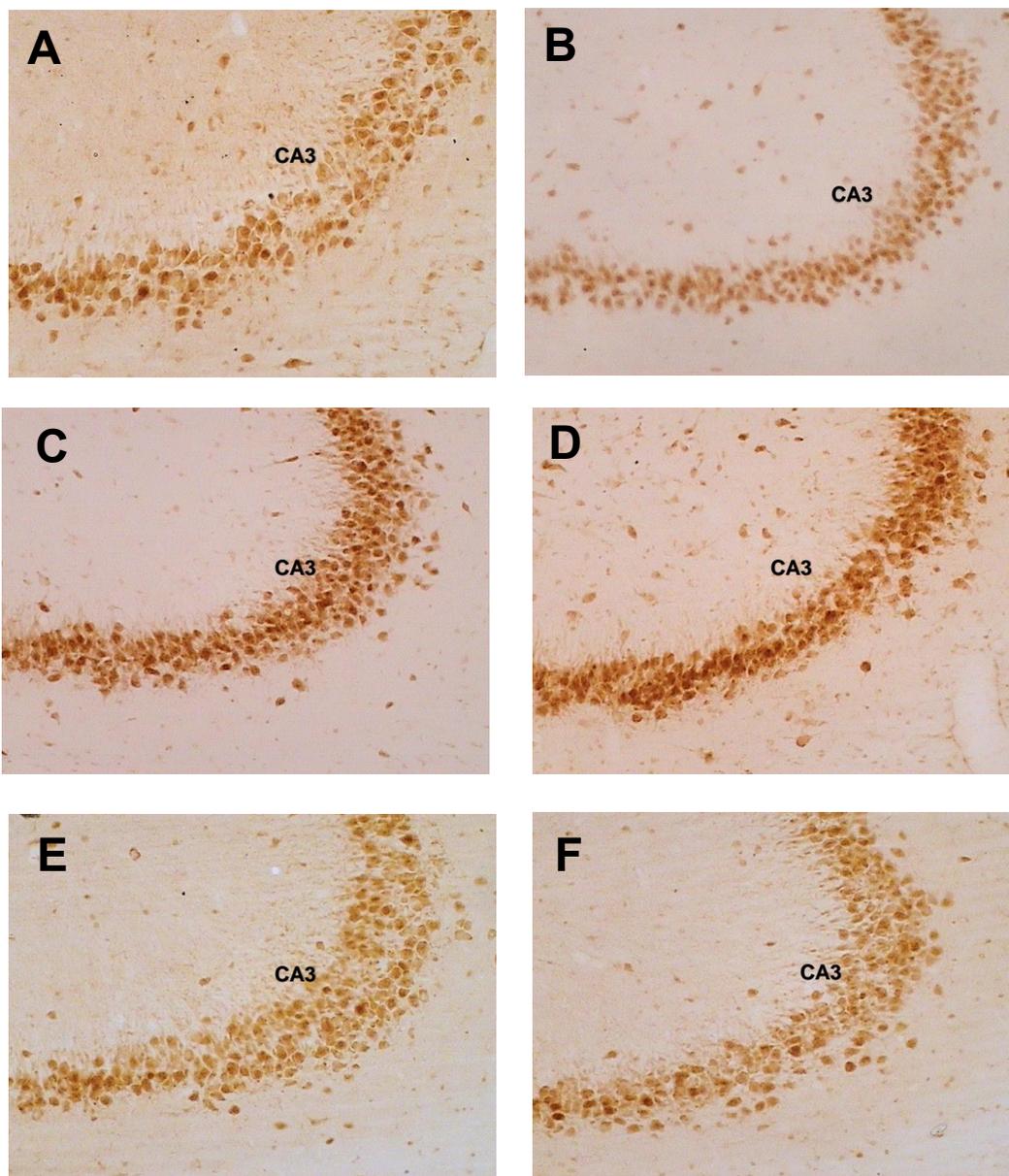


Figura 19 - Fotomicrografias da imunreatividade do receptor B2 de Cininas. Região de CA3 no hipocampo de ratos Wistar Fêmeas OVX de todos os grupos A, C, E Hipocampo de ratos Wistar Fêmeas nos grupos CTR (animais tratados com solução fisiológica); B, D, F Hipocampo de ratos Wistar fêmeas nos grupos SE, SIL e CR. Ampliação de 20x.

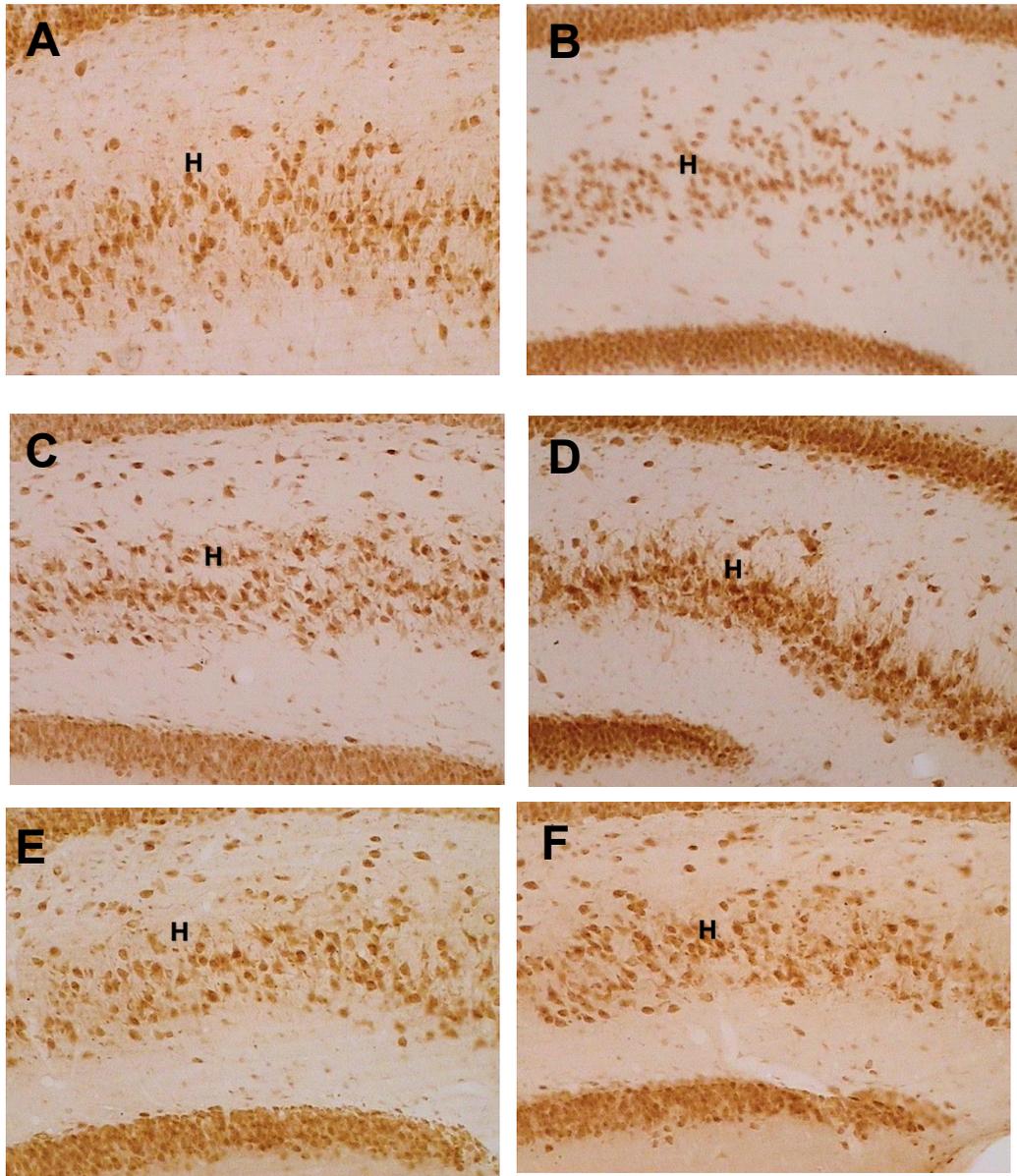


Figura 20 - Fotomicrografias da imunreatividade do receptor B2 de cininas. Região do hilo do giro dentado na formação hipocampal de ratos Wistar Fêmeas OVX de todos os grupos A, B, E Hipocampo de ratos Wistar Fêmeas nos grupos controle CTR. B, D, F Hipocampo de Ratos Wistar Fêmeas nos grupos SE, SIL e CR. Ampliação de 20X.

DISCUSSÃO

Nesse estudo, abordamos a hipótese de que os hormônios sexuais (estrogênio e/ou progesterona) modulariam a expressão do receptor B2 de cininas no modelo de epilepsia induzido pela pilocarpina. Este trabalho mostrou pela primeira vez a expressão do receptor B2 de cininas, em ratos Wistar fêmeas não ovariectomizadas - NOVX e ovariectomizadas - OVX, durante as diferentes fases do modelo experimental de epilepsia, induzido por pilocarpina.

Para avaliar esta hipótese em ratos Wistar OVX, após ovariectomia bilateral, foi induzida a condição de estado de *status epilepticus* durante 5 horas (5hSE). O SE foi induzido quatro dias após a cirurgia, tempo considerado necessário para observar os efeitos da diminuição da concentração dos hormônios sexuais (EDWARDS *et al.*, 1999). No presente estudo o efeito da cirurgia (ovariectomia) foi confirmado mediante o esfregaço vaginal, observando-se a persistência de células compatíveis com fase diestro do ciclo estral, característico de ratos Wistar ovariectomizados.

Posteriormente, foi avaliada a expressão do receptor B2 de cininas no hipocampo de ratos Wistar fêmeas (NOVX). Os ratos Wistar fêmeas NOVX apresentaram uma diminuição na expressão do receptor B2 de cininas, na formação hipocampal, nos grupos SE (com 5h de SE) e SIL, em relação ao grupo controle CTR. Entretanto, foi detectado um aumento da expressão do receptor nos grupos SE e SIL em ratos Wistar fêmeas OVX em relação ao grupo CTR. Já na fase crônica (CR) não foram observadas diferenças significativas entre os ratos fêmeas NOVX nem OVX em relação aos grupos CTR.

Estes resultados contrastam com dados prévios obtidos por nosso grupo, em ratos Wistar machos submetidos às mesmas condições de insulto ao encéfalo (ARGAÑARAZ *et al.*, 2004). Em este estudo foi observado um aumento significativo da expressão do transcrito e da proteína do receptor B2 em ratos Wistar machos após 6h de SE nas diferentes fases do modelo de epilepsia da pilocarpina. No entanto, Ongali e colaboradores (2003) reportaram uma diminuição na expressão do receptor B2 no hipocampo de ratos submetidos ao modelo do abasamento de epilepsia do lobo temporal. A diferença entre ambos os estudos pode ser devida muito provavelmente, a características próprias da fisiopatologia de cada modelo utilizado. (ONGALI *et al.*, 2003)

No modelo de epilepsia do lobo temporal da pilocarpina, nossos dados sugerem que a expressão diferencial do receptor B2 de cininas em ratos Wistar fêmeas quando comparado com ratos Wistar machos, após um insulto no SNC, poderia estar relacionada aos hormônios sexuais (estrogênio e/ou progesterona).

A diminuição da expressão do receptor B2 em Ratos fêmea Wistar NOVX e o aumento em ratos Wistar OVX podem ser correlacionados com achados clínicos e experimentais relacionados à epilepsia mesial do lobo temporal (VELISKOVA; DESANTIS, 2013). A expressão em astrócitos do receptor B2 o qual após ativação pela ligação do agonista natural a bradicinina, libera glutamato na fenda sináptica (DELMAS *et al.*, 2002; HÖSLI *et al.*, 1992; ZHANG, Z. *et al.*, 2010). Por sua vez, a ligação deste aminoácido excitatório aos receptores NMDA na membrana dos neurônios adjacentes aumentaria a excitabilidade neuronal e a susceptibilidade a crises convulsivas. Além de isso, o GLU em excesso na fenda simpática pode levar a perda da homeostase do cálcio intracelular e a morte neuronal (PARPURA *et al.*, 1994). Ainda, após ativação do receptor B2 nas células de Schwann aumenta também a liberação de glutamato na fenda sináptica (JEFTINIJA *et al.*, 1996). Dentro deste contexto, é razoável hipotetizar que a menor expressão, do receptor B2 em ratos fêmeas NOVX nos grupos SE e SIL, poderia levar a menor liberação de GLU pelos astrócitos, diminuindo os efeitos nocivos em neurônios adjacentes, levando a uma menor morte neuronal e brotamento supragranular de fibras musgosas no hipocampo dos animais NOVX quando comparados com OVX. (VALENTE *et al.*, 2002). Estes dados juntos com a diminuição da expressão do receptor B2 nos ratos NOVX poderiam explicar a menor atrofia hipocampal observada na epilepsia do lobo temporal mesial em mulheres quando comparado com homens (BRIELLMANN; BERKOVIC; JACKSON, 2000). No entanto, não podemos excluir a participação de outros tipos celulares além das células da glia (astrócitos, células de Schwann).

Por outro lado, levando em consideração que a ativação do receptor B2, pela bradicinina, participa da resposta inflamatória no SNC (THORNTON *et al.*, 2010), a qual por sua vez, é um importante fator envolvido na patogênese da epilepsia do lobo temporal (VEZZANI; GRANATA, 2005) é plausível que a ativação do receptor B2 induza, em astrócitos e microglia, a liberação de citocinas pró-inflamatórias, óxido nítrico e outros mediadores da resposta inflamatória após uma lesão no SNC (PITKÄNEN; LUKASIUK, 2011; THORNTON *et al.*, 2010; VEZZANI; GRANATA, 2005). Assim, a maior expressão do receptor B2 em ratos fêmeas OVX, no grupo SE e SIL, poderia ser correlacionado com maior resposta inflamatória, maior morte neuronal nas crises de longa duração (SE) e menor período de latência para a primeira crise espontânea e recorrente (VALENTE *et al.*, 2002). Em compensação nos ratos Wistar fêmeas NOVX haveria uma menor resposta inflamatória, o que levaria a menor morte neuronal e com menos esclerose no hipocampo como observado em

mulheres quando comparado com homens (BRIELLMANN; BERKOVIC; JACKSON, 2000). Além disso, a maior expressão e consequente ativação do receptor B2 nos ratos fêmeas OVX poderia também aumentar a atividade da PLA₂ e PLC, o que levaria a uma maior produção de ácido araquidônico, com o consequente aumento na produção de radicais livres, e assim, favorecer a morte celular por estresse oxidativo nos grupos SE e SIL (BELLISSIMO *et al.*, 2001).

Estudos realizados em modelos de epilepsia do lobo temporal (ELT) também mostraram que a morte neuronal induzida por crises límbicas pode ser influenciada por hormônios sexuais (estrogênios e/ou progesterona). A reposição hormonal com estradiol, em ratos Wistar fêmeas, diminuiu a morte neuronal no hipocampo como consequência de crises de longa duração (GALANOPOULOU; ALM; VELÍŠKOVÁ, 2003). Por outro lado, o pré-tratamento com estradiol, em ratos fêmeas Wistar OVX com SE mostrou um efeito positivo, isto é, diminuição da morte neuronal no hipocampo, quando comparado com os animais OVX sem reposição hormonal.

Dentro deste contexto a modulação negativa na expressão do receptor B2 em ratos fêmea NOVX e positiva em ratos OVX, nos grupos SE e SIL, poderia ter efeitos de neuroprotetores mediados pelos hormônios sexuais (estrogênio) (GALANOPOULOU; ALM; VELÍŠKOVÁ, 2003). A expressão diferencial do receptor B2, em áreas vulneráveis a morte neuronal (CA1, CA3, células granulares e do hilo do giro dentado) no hipocampo em ratos Wistar fêmea NOVX e OVX vem ao encontro com essa hipótese. Em nosso estudo, mediante imunohistoquímica, ficou evidente a menor imunoreatividade (expressão do receptor B2) nos grupos SE e SIL nos ratos fêmeas NOVX quando comparados com os mesmos grupos nos ratos fêmeas OVX. Esses resultados confirmaram a localização do receptor B2 de cininas na formação hipocampal, evidenciada previamente por alguns estudos (ARGAÑARAZ *et al.*, 2004; RAIDOO *et al.*, 1997; WU *et al.*, 2012). Além de isso, a diminuição da imunoreatividade do receptor B2 em regiões do hipocampo vulneráveis à morte neuronal nos grupos SE e SIL nos ratos fêmeas NOVX poderiam ser consequência do efeito de neuroproteção dos hormônios sexuais (estrogênios) observados após reposição de esse hormônio em ratos fêmeas OVX e NOVX (GALANOPOULOU; ALM; VELÍŠKOVÁ, 2003). No entanto, não é possível descartar a participação de outras moléculas/fatores intermediárias na expressão do receptor B2 de cininas.

Os mecanismos envolvidos na expressão gênica do receptor B2 de cininas no SNC não estão totalmente elucidados. No entanto, há evidências de que a expressão gênica do receptor B2 possa ser regulada por fatores tróficos. Lee e colaboradores (2002) mostraram que o NFG (Fator Neurotrófico Derivado da Glia) aumenta a expressão do RNAm e do receptor B2, em neurônios do gânglio da raiz dorsal (DRG). Por outro lado, já está bem estabelecido que o NGF é expresso por neurônios no encéfalo e sua expressão pode ser influenciada pela atividade neuronal (ZAFRA *et al.*, 1990). Usando o modelo de lesão hiliar, Gall e Isackson (1989) foram os primeiros autores a mostrar que o RNAm do NGF aumenta após crises límbicas. Estudos posteriores têm confirmado esses resultados mediante indução de crises límbicas pela injeção de ácido caínico ou pilocarpina (ZAFRA *et al.*, 1990). Por outro lado, estudos, realizados em camundongos nocautes para o receptor B1, mostraram a relevância do receptor B2 de cininas no fenômeno epiléptico (RODI *et al.*, 2013). Esses animais mostraram maior sensibilidade ao aparecimento de descargas epileptiforme “in vivo” e “in vitro”. “In vivo” utilizando um antagonista peptídico não seletivo do receptor B2 (LF16-0687) foi observado diminuição na severidade das crises límbicas induzidas mediante ácido caínico em esses animais. O efeito do antagonista do receptor B2 também foi evidenciado nos camundongos selvagens submetidos a crises de longa duração (RODI *et al.*, 2013). Estes dados em conjunto, sugerem que a modulação negativa na expressão do receptor B2 em ratos fêmeas NOVX poderia estar associada a menor atividade epileptiforme nas crises de longa duração e conseqüentemente a menor expressão do fator de crescimento NGF o que levaria a menor expressão do receptor B2 de cininas (RODI *et al.*, 2013).

A diminuição da expressão do receptor B2 de cininas em ratos fêmeos NOVX, observada nos grupos SE e SIL, poderia estar vinculada ao aumento dos níveis de estradiol nas fases aguda e silenciosa do modelo de epilepsia da pilocarpina como observado por Amado e colaboradores. (AMADO; CAVALHEIRO, 1998). No entanto, estudos de Madeddu e colaboradores (1997), mostraram um efeito contrário do estradiol na expressão do receptor B2 a nível vascular, favorecendo a expressão do receptor B2 de cininas a nível periférico.(MADEDDU *et al.*, 1995) Essa diferença no efeito do estradiol poderia ser devida aos efeitos de inibição do 17β estradiol na expressão do RNAm do NGF nos neurônios da formação hipocampal Leach e colaboradores (1995). Em contraposição dados de Yu-Wei Wu e colaboradores (WU *et al.*, 2012) tem mostrado um efeito positivo do estrogênio, no hipocampo, na expressão do NGF. Por este motivo, não podemos afirmar que a modulação da

expressão do receptor B2 de cininas, no modelo de epilepsia do lobo temporal, seja mediada exclusivamente e diretamente pelos hormônios sexuais (estrogênio e/ou progesterona). Outros estudos serão necessários para elucidar a modulação da expressão do receptor B2 em neurônios, astrócitos e micróglia após ovariectomia.

Como mencionado previamente, a maior expressão do receptor B2 de cininas em ratos fêmeas OVX, pode facilitar a perda da homeostase do cálcio intracelular e excitabilidade neuronal. Esses eventos facilitados pela ativação do receptor B2 poderiam explicar, ao menos em parte, a menor latência no estabelecimento da condição de SE, quando comparado com os ratos fêmeas NOVX. Dessa forma os hormônios sexuais (estrogênio/progesterona) interfeririam no estabelecimento do SE em ratos OVX, mediante a modulação da expressão do receptor B2 (VALENTE *et al.*, 2002).

Na fase silenciosa do modelo de epilepsia da pilocarpina acontecem fenômenos de plasticidade neuronal que culminam no estabelecimento de crises espontâneas e recorrentes. Por exemplo, se estabelece um desequilíbrio entre excitação, (aumento dos níveis de glutamato) e inibição (diminuição da expressão de GABA) (CAVALHEIRO, 1995). Além de isso, a expressão de novas proteínas, por exemplo, os receptores B1 de cininas, AT1 e AT2 de angiotensina, em neurônios altera a fisiologia normal dos circuitos no hipocampo (ARGAÑARAZ *et al.*, 2004, 2008). Considerando esses fenômenos plásticos, o aumento da expressão do receptor B2 de cininas, no hipocampo do grupo SIL dos ratos fêmeas OVX, poderia estar relacionado à diminuição do período de latência (fase silenciosa), aumento da morte neuronal no hipocampo e maior brotamento de fibras musgosas quando comparado com ratos fêmeas NOX (VALENTE *et al.*, 2002). Estudos prévios já mostraram o efeito de neuroproteção, dos hormônios sexuais (estrogênios) em ratos fêmeas na vida reprodutiva (ABBASI *et al.*, 1999; CHEN; CHOPP; LI, 1999; MARK *et al.*, 1995). Além disso, foi observado um efeito deletério da expressão do receptor B2 em doenças do SNC. Por exemplo, após traumatismo encefálico, o receptor medeia dano neuronal e formação de edema (PRUNEAU *et al.*, 1999). Outros estudos mostram que animais tratados com antagonista do receptor B2 levou a uma diminuição do dano celular após isquemia encefálica (HELLAL *et al.*, 2003; ONGALI *et al.*, 2003).

Em resumo, os resultados obtidos no presente estudo sugerem fortemente uma relação entre os níveis de expressão do receptor B2 de cininas com os efeitos de neuroproteção mediado pelos hormônios sexuais (estrogênio/ e ou progesterona) nas crises de longa duração e na fase de epileptogenesis. Esperamos que estudos posteriores nos permitam elucidar os receptores e mediadores envolvidos nas vias de sinalização na modulação do receptor B2 de cininas durante as crises de longa duração e de epileptogenese.

CONCLUSÕES

Baseados nos resultados obtidos, através deste estudo, podemos concluir que:

- A expressão do receptor B2 de cininas apresentou diminuição no hipocampo, de ratos Wistar fêmeas não ovariectomizadas (NOVX), durante as fases aguda e silenciosa do modelo de epilepsia induzida por pilocarpina
- A expressão do receptor B2 de cininas apresentou diminuição no hipocampo, de ratos Wistar fêmeas ovariectomizadas (OVX) na fase aguda e silenciosa do modelo de epilepsia induzido por pilocarpina
- A imunoreatividade ao receptor B2 de cininas, na formação hipocampal, é menor nas regiões CA1, CA2 e CA3 no hipocampo, nas células granulares do giro dentado e nas células do hilo do giro dentado em ratos Wistar fêmeas não ovariectomizadas (NOVX)
- A imunoreatividade ao receptor B2 de cininas, na formação hipocampal, é maior nas regiões CA1, CA2 e CA3, nas células granulares do giro dentado e nas células do hilo do giro dentado em ratos Wistar fêmeas ovariectomizadas (OVX)
- Possível papel neuroprotetor dos hormônios sexuais (estrogênio/progesterona) mediante a modulação da expressão do receptor B2 de cininas no modelo de epilepsia da pilocarpina

REFERÊNCIAS

- ABBASI, F. *et al.* Effects of menopause on seizures in women with epilepsy. *Epilepsia*, v. 40, n. 2, p. 205–210, 1999.
- AMADO, D.; CAVALHEIRO, E. A. Hormonal and gestational parameters in female rats submitted to the pilocarpine model of epilepsy. *Epilepsy Research*, v. 32, n. 1–2, p. 266–274, 1998.
- AMBROSI, G. *et al.* Complex Changes in the Innate and Adaptive Immunity Accompany Progressive Degeneration of the Nigrostriatal Pathway Induced by Intrastratial Injection of 6-Hydroxydopamine in the Rat. *Neurotoxicity Research*, v. 32, n. 1, p. 71–81, jul. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12640-017-9712-2>>.
- ARGAÑARAZ, G. A. *et al.* The renin-angiotensin system is upregulated in the cortex and hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy related to mesial temporal sclerosis. *Epilepsia*, v. 49, n. 8, p. 1348–1357, 2008.
- ARGAÑARAZ, G. A. *et al.* The synthesis and distribution of the kinin B1 and B2 receptors are modified in the hippocampus of rats submitted to pilocarpine model of epilepsy. *Brain Research*, v. 1006, n. 1, p. 114–125, 2004.
- ARNOLD, S.; BEYER, C. Neuroprotection by estrogen in the brain: The mitochondrial compartment as presumed therapeutic target. *Journal of Neurochemistry*, v. 110, n. 1, p. 1–11, 2009.
- BAULIEU, E.-E. STEROID HORMONES IN THE BRAIN: SEVERAL MECHANISMS? *Steroid Hormone Regulation of the Brain*, p. 3–14, 1 jan. 1981. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080268644500074>>. Acesso em: 6 fev. 2020.
- BELLISSIMO, M. I. *et al.* Superoxide dismutase, glutathione peroxidase activities and the hydroperoxide concentration are modified in the hippocampus of epileptic rats. *Epilepsy Research*, v. 46, n. 2, p. 121–128, 2001.
- BENARROCH, E. E. Glutamate transporters: Diversity, function, and involvement in neurologic disease. *Neurology*, v. 74, n. 3, p. 259–264, 2010.
- BRIELLMANN, R. S.; BERKOVIC, S. F.; JACKSON, G. D. Men may be more vulnerable to seizure-associated brain damage. *Neurology*, v. 55, n. 10, p. 1479 LP – 1485, 28 nov. 2000. Disponível em: <<http://n.neurology.org/content/55/10/1479.abstract>>.
- BURCH, R. M. Kinin signal transduction: role of phosphoinositides and eicosanoids. *Journal of cardiovascular pharmacology*, v. 15 Suppl 6, p. S44-5, 1990. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/MED/1697360>>.
- CAVALHEIRO, E. A. The pilocarpine model of epilepsy. *The Italian Journal of Neurological Sciences*, v. 16, n. 1, p. 33–37, 1995. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/BF02229072>>.
- CHEN, J.; CHOPP, M.; LI, Y. Neuroprotective effects of progesterone after transient middle cerebral artery occlusion in rat. *Journal of the Neurological Sciences*, v. 171, n. 1, p. 24–30, 1999.
- COUTURE, R. *et al.* Kinin receptors in pain and inflammation. *European Journal of Pharmacology*, v. 429, n. 1, p. 161–176, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299901013188>>.
- DELMAS, P. *et al.* Signaling microdomains define the specificity of receptor-mediated InsP3 pathways in neurons. *Neuron*, v. 34, n. 2, p. 209–220, 2002.
- EDWARDS, H. E. *et al.* Steroid hormones affect limbic afterdischarge thresholds and kindling rates in adult female rats. *Brain Research*, v. 838, n. 1–2, p. 136–150, 1999.
- ELGER, C. E.; SCHMIDT, D. Modern management of epilepsy: A practical approach. *Epilepsy and Behavior*, v. 12, n. 4, p. 501–539, 2008.

- FERKANY, J. W.; ZACZEK, R.; COYLE, J. T. *Kainic acid stimulates excitatory amino acid neurotransmitter release at presynaptic receptors. Nature.* [S.l: s.n.], 1982
- FESTER, L. *et al.* Estrogen synthesis in the hippocampus. *Cell and Tissue Research*, v. 345, n. 3, p. 285, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00441-011-1221-7>>.
- FISHER, R. S. *et al.* ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*, v. 55, n. 4, p. 475–482, 2014.
- FRENCH, J. A. *et al.* Characteristics of medial temporal lobe epilepsy: I. Results of history and physical examination. *Annals of Neurology*, v. 34, n. 6, p. 774–780, 1993.
- GALANOPOULOU, A. S.; ALM, E. M.; VELÍŠKOVÁ, J. Estradiol reduces seizure-induced hippocampal injury in ovariectomized female but not in male rats. *Neuroscience Letters*, v. 342, n. 3, p. 201–205, 2003.
- GREEN, P. S.; SIMPKINS, J. W. Neuroprotective effects of estrogens: Potential mechanisms of action. *International Journal of Developmental Neuroscience*, v. 18, n. 4–5, p. 347–358, 2000.
- H, DOMINIC C HEANEY; BRIDGET K MACDONALD, A. E. Socioeconomic variation in incidence of epilepsy: prospective community based study in south east England. *BMJ*, v. 35, n. 1003, p. 1027–1030, 2002.
- HECQUET, C. *et al.* Human bradykinin B2 receptor is activated by kallikrein and other serine proteases. *Molecular Pharmacology*, v. 58, n. 4, p. 828–836, 2000.
- HELLAL, F. *et al.* Detrimental Role of Bradykinin B2 Receptor in a Murine Model of Diffuse Brain Injury. *Journal of Neurotrauma*, v. 20, n. 9, p. 841–851, 1 set. 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1089/089771503322385773>>.
- HOFFMAN, G. *et al.* Ovarian steroid modulation of seizure severity and hippocampal cell death after kainic acid treatment. *Experimental neurology*, v. 182, p. 124–134, 1 jul. 2003.
- HOJO, Y. *et al.* Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017alpha and P450 aromatase localized in neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 101, n. 3, p. 865–870, jan. 2004.
- HOLLMANN, M. Cloned Glutamate Receptors. *Annual Review of Neuroscience*, v. 17, n. 1, p. 31–108, 1994.
- HÖSLI, L. *et al.* Colocalization of receptors for vasoactive peptides on astrocytes of cultured rat spinal cord and brain stem: electrophysiological effects of atrial and brain natriuretic peptide, neuropeptide Y and bradykinin. *Neuroscience Letters*, v. 148, n. 1–2, p. 114–116, 1992.
- HU, Z. Y. *et al.* Neurosteroids: oligodendrocyte mitochondria convert cholesterol to pregnenolone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 84, n. 23, p. 8215 LP – 8219, 1 dez. 1987. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/84/23/8215.abstract>>.
- ISOKAWA, M. *et al.* Single mossy fiber axonal systems of human dentate granule cells studied in hippocampal slices from patients with temporal lobe epilepsy. *Journal of Neuroscience*, v. 13, n. 4, p. 1511–1522, 1993.
- JADERSON COSTA DA COSTA. *Fundamentos Neurobiológicos das Epilepsias*. Lemos Edit ed. São Paulo: [s.n.], 1998.
- JAMA. Treatment of Convulsive Status Epilepticus: Recommendations of the Epilepsy Foundation of America's Working Group on Status Epilepticus. *JAMA*, v. 270, n. 7, p. 854–859, 18 ago. 1993. Disponível em: <<https://doi.org/10.1001/jama.1993.03510070076040>>.
- JEFTINIJA, S. D. *et al.* Neuroligand-Evoked Calcium-Dependent Release of Excitatory Amino Acids from Cultured Astrocytes. *Journal of Neurochemistry*, v. 66, n. 2, p. 676–684, 1 fev. 1996. Disponível em: <<https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1996.66020676.x>>.
- KIMOTO, T. *et al.* Neurosteroid Synthesis by Cytochrome P450-Containing Systems

Localized in the Rat Brain Hippocampal Neurons: N-Methyl-d-Aspartate and Calcium-Dependent Synthesis. *Endocrinology*, v. 142, n. 8, p. 3578–3589, 1 ago. 2001. Disponível em: <<https://doi.org/10.1210/endo.142.8.8327>>.

MARK, R. J. *et al.* Amyloid β -peptide impairs ion-motive ATPase activities: Evidence for a role in loss of neuronal Ca^{2+} homeostasis and cell death. *Journal of Neuroscience*, v. 15, n. 9, p. 6239–6249, 1995.

MAZZUFERI, M. *et al.* Induction of B1 bradykinin receptors in the kindled hippocampus increases extracellular glutamate levels: A microdialysis study. *Neuroscience*, v. 135, n. 3, p. 979–986, 2005.

MCEWEN, B. S. Non-genomic and genomic effects of steroids on neural activity. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 12, n. C, p. 141–147, 1991.

MELLO, L. E. A. M. *et al.* Circuit Mechanisms of Seizures in the Pilocarpine Model of Chronic Epilepsy: Cell Loss and Mossy Fiber Sprouting. *Epilepsia*, v. 34, n. 6, p. 985–995, 1993.

NICOLETTI, F. *et al.* Comparative Effects of Estradiol Benzoate, the Antiestrogen Clomiphene Citrate, and the Progestin Medroxyprogesterone Acetate on Kainic Acid-Induced Seizures in Male and Female Rats. *Epilepsia*, v. 26, n. 3, p. 252–257, 1 jun. 1985. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1985.tb05414.x>>.

ONGALI, B. *et al.* Autoradiographic analysis of rat brain kinin B1 and B2 receptors: Normal distribution and alterations induced by epilepsy. *Journal of Comparative Neurology*, v. 461, n. 4, p. 506–519, 2003.

OZAWA, S.; KAMIYA, H.; TSUZUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Progress in Neurobiology*, v. 54, n. 5, p. 581–618, 1998.

PARPURA, V. *et al.* Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature*, v. 369, n. JUNE, p. 744–747, 1994.

PITKÄNEN, A.; LUKASIUK, K. Mechanisms of epileptogenesis and potential treatment targets. *The Lancet Neurology*, v. 10, n. 2, p. 173–186, 2011. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70310-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70310-0)>.

PRINCE, D. A.; TSENG, G.-F. Epileptogenesis in Chronically Injured Cortex: In Vitro Studies. *Journal of Neurophysiology*, v. 69, n. 4, 1993.

PRUNEAU, D. *et al.* Effect of LF 16-0687MS, a New Nonpeptide Bradykinin B2 Receptor Antagonist, in a Rat Model of Closed Head Trauma. *Journal of Neurotrauma*, v. 16, n. 11, p. 1057–1065, 1 nov. 1999. Disponível em: <<https://doi.org/10.1089/neu.1999.16.1057>>.

QADRI, F.; BADER, M. Kinin B1 receptors as a therapeutic target for inflammation. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, v. 22, n. 1, p. 31–44, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/14728222.2018.1409724>>.

RAIDOO, D. M. *et al.* Kinin receptors in human vascular tissue: Their role in atheromatous disease. *Immunopharmacology*, v. 36, n. 2–3, p. 153–160, 1997.

REGOLI, D.; BARABÉ, J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacological Reviews*, v. 32, n. 1, p. 1 LP – 46, 1 mar. 1980. Disponível em: <<http://pharmrev.aspetjournals.org/content/32/1/1.abstract>>.

RIIKONEN, R. Infantile Spasms: Therapy and Outcome. *Topical Review*, p. 401–404, 2004.

RODI, D. *et al.* Bradykinin B2 receptors increase hippocampal excitability and susceptibility to seizures in mice. *Neuroscience*, v. 248, p. 392–402, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.06.038>>.

SAKUMA, S. *et al.* Expression of estrogen receptor α and β in reactive astrocytes at the male rat hippocampus after status epilepticus. *Neuropathology*, v. 29, n. 1, p. 55–62, 2009.

SANDER, J. W. The epidemiology of epilepsy revisited. [Curr Opin Neurol. 2003] - PubMed result. *Current opinion in neurology*, v. 16, n. 2, p. 165–70, 2003. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12644744>>.

SHOFFNER, J. M. *et al.* Mitochondrial dna variants observed in alzheimer disease and parkinson disease patients. *Genomics*. [S.l.: s.n.], 1993

SIMON SHORVON. *Status Epilepticus: Its Clinical Features and treatment in children and adults*. [S.l.]: Cambridge University Press, 2006.

TERZUOLI, E. *et al.* Antagonism of bradykinin B2 receptor prevents inflammatory responses in human endothelial cells by quenching the NF- κ B pathway activation. *PLoS ONE*, v. 9, n. 1, 2014.

THORNTON, E. *et al.* Kinin receptor antagonists as potential neuroprotective agents in central nervous system injury. *Molecules*, v. 15, n. 9, p. 6598–6618, 2010.

VALENTE, S. G. *et al.* Castration in female rats modifies the development of the pilocarpine model of epilepsy. *Epilepsy Research*, v. 49, n. 3, p. 181–188, 2002.

VELÍŠKOVÁ, J. The role of estrogens in seizures and epilepsy: The bad guys or the good guys? *Neuroscience*, v. 138, n. 3, p. 837–844, 2006.

VELISKOVA, J.; DESANTIS, K. A. Sex and Hormonal Influences on Seizures and Epilepsy. *Hormone Behav.*, v. 63, n. 2, p. 267–277, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>>.

VEZZANI, A. *et al.* The role of inflammation in epilepsy. *Nature Reviews Neurology*, v. 7, n. 1, p. 31–40, 2011.

VEZZANI, A.; GRANATA, T. Brain inflammation in epilepsy: Experimental and clinical evidence. *Epilepsia*, v. 46, n. 11, p. 1724–1743, 2005.

WU, Y. W. *et al.* Hippocampal nerve growth factor potentiated by 17 β -estradiol and involved in allodynia of inflamed TMJ in rat. *Journal of Pain*, v. 13, n. 6, p. 555–563, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpain.2012.03.005>>.

YAGUE, J. G. *et al.* Aromatase expression in the normal and epileptic human hippocampus. *Brain Research*, v. 1315, p. 41–52, 22 fev. 2010. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0006899309021015>>. Acesso em: 13 fev. 2020.

ZAFRA, F. *et al.* Activity dependent regulation of BDNF and NGF mRNAs in the rat hippocampus is mediated by non-NMDA glutamate receptors. *The EMBO Journal*, v. 9, n. 11, p. 3545–3550, 1 nov. 1990. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/j.1460-2075.1990.tb07564.x>>. Acesso em: 10 fev. 2020.

ZHANG, C. *et al.* 17 β -Estradiol Regulation of T-Type Calcium Channels in Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons. *The Journal of Neuroscience*, v. 29, n. 34, p. 10552 LP – 10562, 26 ago. 2009. Disponível em: <<http://www.jneurosci.org/content/29/34/10552.abstract>>.

ZHANG, Z. *et al.* Altered spontaneous neuronal activity of the default-mode network in mesial temporal lobe epilepsy. *Brain Research*, v. 1323, p. 152–160, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2010.01.042>>.

