

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS - UFAL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

YNGRID MICKAELLI OLIVEIRA DOS SANTOS

INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DO DIPEPTÍDEO CICLO-GLICINA-PROLINA (CGP) NO
STATUS EPILÉPTICUS INDUZIDO POR PILOCARPINA

Maceió 2015

YNGRID MICKAELLI OLIVEIRA DOS SANTOS

INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DO DIPEPTÍDEO CICLO-GLICINA-PROLINA (CGP) NO
STATUS EPILÉPTICUS INDUZIDO POR PILOCARPINA

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde da Universidade Federal de Alagoas,
como requisito parcial para obtenção do grau
de mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Leite Góes Gitaí

Coorientador: Prof. Dr. Olagide Wagner de
Castro

Maceió

2015

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecário Responsável: Valter dos Santos Andrade

- S237i Santos, Yngrid Mickaelli Oliveira dos.
Investigação do efeito do dipeptídeo Ciclo-Glicina-Prolina (CGP) no status epiléptico induzido por Pilocarpina / Yngrid Mickaelli Oliveira dos Santos. – 2015.
67f. ; il.
- Orientador: Daniel Leite Góes Gitai.
Coorientador: Olagide Wagner de Castro.
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Maceió, 2015.
- Bibliografia: f. 57-65.
Anexos: f. 66-67.
1. Epilepsia do lobo temporal. 2. Efeito anticonvulsivante.
3. Neuroproteção. 4. Expressão gênica diferencial. 5. Status epiléptico.
I. Título.

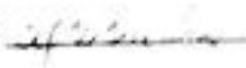
CDU:616.853



Universidade Federal de Alagoas
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

ICBS - UFAL - Campus A - Saneles
Av. Lourival Melo Mota, 576
Cidade Universitária - Maceió - AL
CEP: 57072-900
E-mail: ppg@ufal.br
Fone: (32) 3214-1850

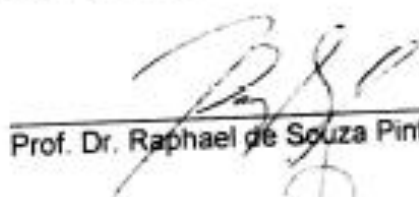
Defesa da Dissertação de Mestrado da aluna Yngrid Mickaelli Oliveira dos Santos, intitulada: "Investigação do efeito do dipeptídeo ciclo-glicina-prolina no *status epilepticus* induzido por pilocarpina", orientada pela Prof. Dr. Daniel Leite Góes Gitai, apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Alagoas, em 26 de agosto de 2015.

Os membros da Banca Examinadora consideraram a candidata 

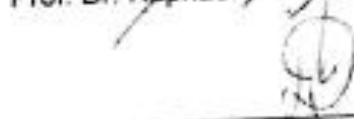
Banca Examinadora:



Prof. Dr. Terezinha da Rocha Ataíde - (UFAL)



Prof. Dr. Raphael de Souza Pinto - (CESMAC)



Prof. Dr. Daniel Leite Góes Gitai - (UFAL)

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, pois sem Ele, nada disso seria possível e hoje não poderia estar concluindo mais esta jornada.

A minha mãe M^a Quitéria de Vieira de Oliveira, pelo esforço, dedicação, compreensão e apoio em todos os momentos desta e de outras caminhadas. À esta eterna e incondicional incentivadora dos meus sonhos, à pessoa que sempre está ao meu lado em todos os momentos, àquela que por tantas noites deixou de dormir para velar meu sono mesmo na fase adulta e tantas vezes se esqueceu de si e doou tudo que tinha para mim.

À minha pequena princesa, Noemi Santos, minha irmã, por todo amor e carinho, pelas risadas que me encantaram e me encheram de forças nesta jornada.

Ao meu noivo, Arnon Almeida, pelo amor, compreensão, preocupação e cada atitude tomada que me deixaram mais tranquila nos momentos mais difíceis do curso e até mesmo no decorrer do projeto dando-me apoio e conselhos nas minhas decisões. Aos meus sogros por todo incentivo e apoio.

À um anjo em forma de cachorro, Luna, que sempre me recebe com amor imutável e incondicional.

Ao clube do livro e aos livros (escritores) por muitas vezes terem sido meu escape.

A todos os meus amigos pelas conversas e saídas divertidas renovando meu ânimo, em especial ao Igor, Carmem, Evelin, Wanessa, Chiara, Mykaella, Marvin, Layanne, Amanda, Maisa, Luiza, Jéssica, Stinni e Hortência por estarem mais presentes, se preocuparem e incentivarem meu progresso e felicidade. A todos amigos dos laboratórios pelos quais passei pelo trabalho em equipe.

E a todos meus familiares e amigos, que sem a confiança e compreensão de todos, este sonho não teria se realizado.

AGRADECIMENTOS

Para que a concretização deste estudo se efetivasse: agradeço às inúmeras pessoas que foram incentivadoras neste processo e seus ensinamentos serão a partir de agora essenciais em minha caminhada pessoal e profissional. Por estes exemplos, expresso meus reais agradecimentos.

Ao Prof^o Dr. Daniel Gitaí, pela oportunidade, paciência e inteligência, com os quais soube orientar esta pesquisa.

Ao Prof^o Dr. Olagide Castro pela coorientação, disponibilidade, ensinamentos e conselhos.

Aos professores mestres e doutores, que a mim repassaram seus conhecimentos, fazendo com que meu desenvolvimento fosse o melhor possível.

Àquelas que juntamente comigo implantaram aqui na Universidade Federal de Alagoas as metodologias utilizadas neste trabalho Nívea, Amanda e Mariah, meu muito obrigada.

Aos voluntários Igor, Carmem, Maisa, Wanessa, Mykaella, Layanne, Jamylle e Thalita que foram fundamentais para a realização desta pesquisa. Em especial aos coautores Igor, Carmem e Maisa. Ao Igor e à Carmem por terem estado presentes em quase todos os momentos da realização deste trabalho, tantas horas fazendo experimentos e discutindo resultados, sendo este tão meu quanto deles. A Maisa, nossa “mil e uma utilidade”, por tantas vezes ter agilizado processos de conserto e obtenção de material.

Aos meus colegas de curso da graduação, pós-graduação e disciplinas que compartilharam comigo seus conhecimentos e momentos de alegrias.

Aos Laboratórios de Biologia celular (LBC), neurofarmacologia fisiologia integrativa (LNFI), Fiocruz na UFPE e CETENE. Em especial ao grupo GEPEC.

A todos os funcionários do ICBS-UFAL e às instituições CAPES, CNPQ e FAPEAL pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram ou torceram pela concretização desta pesquisa.

“Todos temos luz e trevas dentro de nós. O que nos define é o lado com o qual escolhemos agir.”

Harry Potter e a ordem da fenix

“Ter coragem é ter consciência do desafio e estar disposto a caminhar nessa direção”

Anderson Cavalcante

“Pois onde estiver o seu tesouro, aí também estará o seu coração”

Mateus 6:21

“Portanto, não se preocupem com o amanhã, pois o amanhã se preocupará consigo mesmo. Basta a cada dia o seu próprio mal”.

Mateus 6:34

RESUMO

Epilepsia é definida como distúrbio neurológico, caracterizada por hiperexcitabilidade e hipersincronismo de populações neuronais e pela presença de crises espontâneas e recorrentes. Cerca de 1-2% da população mundial são acometidas por este distúrbio e 30% desta são resistentes ao tratamento medicamentoso, assim, investigações de novas ferramentas terapêuticas que reduzam os efeitos colaterais das drogas tradicionalmente utilizadas passam a ser de grande importância. Drogas com efeito anti-inflamatório estão entre as novas ferramentas terapêuticas promissoras. Ciclo-glicina-prolina (CGP) foi caracterizado quanto efeito anti-inflamatório. Assim, o objetivo do presente trabalho foi investigar o efeito anticonvulsivante do CGP em modelo de epilepsia induzida por pilocarpina. utilizamos ratos *wistar* machos para o estabelecimento de 3 grupos experimentais, pré-tratados com CGP 10, 100 e 300 $\mu\text{mol/kg}$ (i.p) (n= 12), 30 minutos antes da indução de *Status Epilepticus* (SE) por pilocarpina (i.h.) (n=14). Os animais foram vídeo monitorados durante SE para análises do comportamento e eutanasiados 24 horas após o SE para realização das análises de neurodegeneração nas subregiões do hipocampo (Corno de Ammon: CA1 e CA3; e Hilus) por meio da técnica de Fluoro-Jade e das análises de expressão diferencial de GFAP e TNF- α realizadas através de RT-qPCR. As análises estatísticas foram realizadas através de teste T (GraphPad, Prism 5.0). Quanto ao comportamento, observamos que o CGP teve efeito significativo com a dose de 300 $\mu\text{mol/kg}$ quando comparado ao grupo PILO apenas em dois dos parâmetros analisados: latência para início do SE e número de doses para reversão do SE. Em relação à neurodegeneração, observamos diferença significativa na diminuição do número de células FJ-positivas nos animais tratados com CGP na dose de 100 $\mu\text{mol/kg}$ na sub-regiões CA1 e Hilus. Através de RTq-PCR, observamos que GFAP não apresenta diferença de expressão dos níveis de transcritos quando comparados aos grupos tratados com CGP e o grupo PILO. Os níveis de transcritos de TNF- α foram menores no grupo CGP com dose de 300 $\mu\text{mol/kg}$ quando comparados ao grupo PILO. Com base nos resultados encontrados neste trabalho, pode-se sugerir que o CGP apresenta efeito anticonvulsivante na fase aguda da epileptogênese, efeito neuroprotetor e na expressão relativa de TNF- α .

Palavras-chave: Epilepsia do Lobo Temporal. Efeito Anticonvulsivante. Neuroproteção. Expressão Gênica Diferencial.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF DIPEPTIDE CYCLO-GLYCINE-PROLINE (CGP) IN STATUS EPILEPTICUS INDUCED BY PILOCARPINE

Epilepsy is defined as a neurological disorder characterized by hyperexcitability and hypersynchrony of neuronal populations and the presence of spontaneous recurrent seizures. About 1-2% of population are affected by this disorder and 30% of these are resistant to drug treatment. Therefore, investigations of new therapeutic tools to reduce the side effects of drugs used traditionally become of great importance. Drugs with anti-inflammatory effect are among the promising new therapeutic tools. Cyclo-glycine-proline (CGP) has been recently characterized as anti-inflammatory effect. The objective of this study was to investigate the anticonvulsant effect of CGP in epilepsy model induced by pilocarpine. Male Wistar rats were utilized to establish three experimental groups pre-treated with CGP 10, 100 and 300 $\mu\text{mol/kg}$ (ip) ($n = 12$), 30 minutes before Status Epilepticus (SE) induced by pilocarpine (ih) ($n = 14$). Animals were video monitored during SE for analyzes of behavior and euthanized 24 h after SE to analyze the neurodegeneration in the hippocampal subregions (Ammon's horn: CA1 and CA3, and hilus) by Fluoro-Jade technique and the differential expression of GFAP and TNF- α performed by RT-qPCR. Statistical analyzes were performed using t-test (GraphPad, Prism 5.0). Regarding the behavior, we found that CGP had significant effect at a dose of 300 $\mu\text{mol/kg}$ compared to PILO group only in two of the analyzed parameters: latency to onset of SE and number of doses to reverse the SE. In relation to neurodegeneration, we observed a significant decrease of FJ-positive cells in animals treated with the dose of CGP 100 $\mu\text{mol/kg}$ in the CA1 and hilus sub-regions. Using RTQ-PCR, we observed that GFAP did not present any difference in expression of transcript levels when compared the groups treated with CGP and PILO group. TNF- α transcripts levels was lower in the group CGP with dose of 300 $\mu\text{mol/kg}$ compared to PILO group. Based on the findings of this study, it may be suggested that the CGP presents anticonvulsant effect in acute epileptogenesis, neuroprotective effect and in the relative expression of TNF- α .

Keywords: Temporal Lobe Epilepsy. Anticonvulsant Effect. Neuroprotection. Differential Gene Expression.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química de CGP.....	14
Figura 2 - Delineamento experimental.....	17
Figura 3 - Ilustração de diferentes secções dos níveis cerebrais do hipocampo.....	20
Figura 4 - Sítio de implantação da cânula no hilo.....	21
Figura 5 - Curvas de dissociação obtidas dos primers dos genes analisados, geradas pelo programa StepOnePlus™ (Applied Biosystems).....	26
Figura 6 - Fotomicrografias do efeito do CGP na neurodegeneração CA1, CA3 e Hilo.....	30
Figura 7 - Efeito do CGP na neurodegeneração.....	31
Figura 8 - Efeito do CGP na expressão relativa de GFAP.....	32
Figura 9 - Efeito do CGP na expressão relativa de TNF- α	34

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Comportamento motor nos modelos experimentais.....	10
Tabela 2. Escala de Racine (1972).....	19
Tabela 3. Concentração de RNA extraído de hipocampus dos animais do grupo experimental PILO.....	24
Tabela 4. Concentração de RNA extraído de hipocampus dos animais do grupo naive.....	25
Tabela 5. Concentração de RNA extraído de hipocampus dos animais do grupo experimental tratados com CGP na dose de 100µmol/kg.....	25
Tabela 6. Concentração de RNA extraído de hipocampus dos animais do grupo experimental tratados com CGP na dose de 300µmol/kg.....	25
Tabela 7. Genes e sequência dos primers desenhados.....	26
Tabela 8. Proporção dos animais que não desenvolveram SE após administração de PILO.....	28
Tabela 9. Resultados comportamentais.....	28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP	Anteroposterior
CGP	Ciclo-Glicina-Prolina
CA	Corno de Ammon
CREs	Crises Recorrentes e Espontâneas
DAE	Drogas Antiepilépticas
DKPs	Dicetopiperazinas
DEPC	Dietilpirocarbonato
DO	Densidade Óptica
DV	Dorsoventral
DZP	Diazepam
EEG	Eletroencefalograma
ELT	Epilepsia do Lobo Temporal
ELTM	Epilepsia do Lobo Temporal Mesial
GFAP	Proteína Glial Ácida
GPE	Glicina-Prolina-Glutamato
IGF-1	Fator de Crescimento Semelhante a Insulina
IGFBPs	Receptor do Fator de Crescimento Semelhante à Insulina
IL	Interleucina
ILAE	<i>International League Against Epilepsy</i> (liga internacional contra epilepsia)
NMDA	N-metil D-Aspartato
ML	Mediolateral

PBS	Phosphate Buffered Saline (Tampão fosfato salin)
PILO	Pilocarpina
PFA	Paraformaldeído
PTZ	Pentilenotetrazol
SE	<i>status epilepticus</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
TNF	Fator de Necrose Tumoral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1	Epilepsia	18
2.2	Epilepsia do lobo temporal (ELT)	20
2.3	Tratamento em epilepsia do lobo temporal	21
2.4	O uso de modelos experimentais na busca de novas drogas para o tratamento da ELT	23
2.5	Modelo crônico baseado na indução de SE por pilocarpina.....	25
2.6	Busca de novas drogas para o tratamento da ELT	26
2.7	Ciclo-glicina-prolina (CGP)	28
3	OBJETIVOS	30
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1	Animais e grupos experimentais	31
4.2	Cirurgia estereotáxica para implante de cânula.....	32
4.3	Indução do <i>status epilepticus</i>	33
4.4	Avaliação comportamental.....	33
4.5	Análise de Neurodegeneração	34
4.6	Perfusão dos animais.....	34
4.7	Cortes dos cérebros	35
4.8	Ensaios histoquímicos	35
4.8.1	Histologia convencional	36
4.8.2	Fluoro-Jade (FJ)	36
4.8.3	Contagem de células.....	37
4.9	Dissecção dos hipocampus	37
4.10	Extração de RNA total de hipocampo de rato	37
4.11	Quantificação das amostras de RNA	38
4.12	Experimentos de RT-qPCR.....	38
4.12.1	Síntese de DNA complementar (cDNA)	38
4.12.2	Quantificação das amostras de RNA.....	39
4.12.3	Reações de amplificação	40
4.13	Análise estatística	41
5.	RESULTADOS	42
5.1	Análise comportamental	42
5.2	Análise do efeito da CGP na neurodegeneração.....	43

5.2.1	Análise do efeito da CGP no processo de astrogliose durante a fase aguda da epileptogênese	46
5.2.2	Análise do efeito da CGP no processo de neuroinflamação durante a fase aguda da epileptogênese.	48
6.	DISCUSSÃO	50
6.1	Comportamento- Controle de crises.....	50
6.2	Ação neuroprotetora de CGP.....	53
6.3	Ação do CGP no processo de astrogliose.....	54
6.4	Ação do CGP no processo de neuroinflamação	55
7	CONCLUSÃO	56
	REFERÊNCIAS	57
	ANEXOS.....	66

1 INTRODUÇÃO

Epilepsia é definida como uma desordem neurológica intermitente causada por atividade neuronal excessiva e/ou hipersincronizada no sistema nervoso central, podendo desencadear perda de consciência, alteração da percepção ou da função psíquica, movimentos convulsivos e distúrbios sensitivos (ROPPER; BROWN, 2005). A epilepsia do lobo temporal (ELT) é o tipo de epilepsia de maiores prevalência e resistência ao tratamento farmacológico. Na maioria dos casos, está associada à esclerose hipocampal que reflete perda neuronal seletiva no hipocampo e em outras estruturas do sistema límbico. Alguns processos neuroplásticos no hipocampo, tais como gliose reativa, rearranjos axonais e neurogênese também já foram descritos como componentes neuropatológicos da epilepsia do lobo temporal mesial com esclerose hipocampal (GUEDES; ALONSO; LEITE, 2006).

O tratamento clínico da epilepsia baseia-se fundamentalmente no uso de drogas antiepilépticas (DAEs). Entretanto, aproximadamente 30% dos pacientes diagnosticados com epilepsia continuam a ter crises epiléticas mesmo depois de iniciado o tratamento farmacológico (SANDER, 1993). Além do mais, apesar das DAEs serem efetivas em 70% dos pacientes, essa forma de tratamento apresenta limitações significativas, como efeitos colaterais, remissão incompleta das crises, dependência do fármaco, transtornos de humor, dentre outras. Este cenário tem motivado a contínua busca de novos fármacos (SCHMIDT; RICHTER, 2001). Neste sentido, uma estratégia que tem sido utilizada é a prospecção de produtos sintéticos ou naturais com ação neuroprotetora e anti-inflamatória, uma vez que a neurodegeneração e a neuroinflamação são eventos associados à epileptogênese.

Trabalhos experimentais e evidências clínicas mostram que a inflamação cerebral (neuroinflamação) se apresenta como constituinte importante no processo da epileptogênese e no desenvolvimento das crises recorrentes e espontâneas (CREs). De fato, estudos apontam que imediatamente após a atividade convulsiva há uma ativação de diversos mediadores pró-inflamatórios no cérebro, tais como as citocinas, quimiocinas, prostaglandinas, fatores do sistema complemento e moléculas de adesão celular (VEZZANI; GRANATA, 2005; Vezzani, 2011). Diferentes tipos celulares no cérebro são capazes de expressar citocinas e seus receptores em nível basal, sendo que, na ocorrência de um insulto epileptogênico, muitas dessas moléculas são positivamente reguladas, tais como IL-1 β , TNF- α e IL-6 (VEZZANI, 2011). Assim tem sido observado que o uso de medicamentos anti-inflamatórios leva a uma redução da frequência de crises em pacientes farmacorresistentes (RIKONEN, 2004;

WIRRELL, 2007). Portanto, drogas com efeito anti-inflamatório são de grande potencial para desenvolvimento de ferramentas terapêuticas. Drogas com ação neuroprotetora também são promissoras na terapêutica da ELT, como por exemplo diazepam, um fármaco benzodiazepínico considerado como a primeira escolha no tratamento emergencial do estado de mal epiléptico, possui efeito neuroprotetor em estruturas límbicas após *status epilepticus* (SE) (QASHU et al., 2010).

O ciclo-glicina-prolina (CGP) é um dipeptídeo derivado do neuropeptídeo Glicina-prolina-glutamato (GPE) que recentemente tem sido caracterizado tanto com efeito neuroprotetor após lesão isquêmica quanto com efeito anti-inflamatório em modelo de edema de pata (GUAN; GLUCKMAN, 2009; FERRO et al., 2012; AQUINO et al., 2013). É possível, portanto, que CGP apresente um efeito anticonvulsivante e/ou antiepileptogênico. Diante do pressuposto, investigamos esta questão em modelo experimental de ELT induzida por pilocarpina via intra-hipocampal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Epilepsia

O termo epilepsia vem do verbo grego *epilambanein*, que significa “ser possuído ou afligido”, utilizado inicialmente por Avicena no século XIX, quando se acreditava que esta doença se associava a possessões demoníacas ou ações divinas (MAGIORKINIS, 2010). A estigmatização desta crença foi tão forte que mesmo hoje, apesar do conhecimento de que epilepsia é uma desordem de natureza neurológica, muitas pessoas ainda acreditam que crises epiléticas refletem ações demoníacas ou relacionadas ao pecado (FERNANDES, 2013).

Ao longo do tempo, o conceito e a classificação das epilepsias têm sido discutidos e redefinidos de acordo com as necessidades de adequação as novas descobertas (ENGEL, 2001). Atualmente, a epilepsia é definida como distúrbio neurológico caracterizado por crises espontâneas e recorrentes, podendo ser convulsiva ou não e que acometem cerca de 1-2% da população mundial (LEES; JONES, 2000; LOTHMAN; BERTRAM; STRINGER, 1991; McNAMARA, 1999). Cerca de 50 milhões de pessoas no mundo têm epilepsia, sendo assim um dos transtornos neurológicos mais frequentes. Anualmente, há uma incidência de casos que varia entre 40 e 70 para cada 100.000 pessoas e aumenta para 122 a 190/100.000 nos países em desenvolvimento (GALLUCCI NETO; MARCHETTI, 2005).

As crises epiléticas são normalmente manifestações motoras e/ou sensoriais de natureza espontânea e autolimitada decorrentes de atividade excessiva e/ou hipersincronizada de um grupo de neurônios cerebrais (LOTHMAN; BERTRAM & STRINGER, 1991; ENGEL, 1995). Durante estes episódios, possivelmente há um desequilíbrio entre sistemas excitatórios e inibitórios levando a um desequilíbrio da neurotransmissão no sistema nervoso central (SNC) (MELDRUM, 1984). De acordo com a *International League Against Epilepsy* (liga internacional contra epilepsia) – ILAE (1989), as crises podem ser divididas em dois grandes grupos: parciais ou generalizadas. Parciais são quando acometem apenas uma região cerebral, e generalizadas quando envolvem ambos os hemisférios cerebrais (GUERRINI, 2006). As crises parciais podem ser parciais simples (sem alteração da consciência) ou parciais complexas (com alteração da consciência). Uma crise parcial pode evoluir para uma crise generalizada quando o paciente perde a consciência, cai no chão com as

extremidades apresentando extensão rígida (fase tônica) seguida de espasmos (fase clônica) (WESTBROOK, 2000). Esta classificação dos tipos de crises é fundamental para a escolha do tratamento mais eficaz (BRODIE; DICTER, 1996; ENGEL, 2001).

O perfil de crises epiléticas juntamente com parâmetros eletroencefalográficos e responsividade ao tratamento são importantes para a definição de uma síndrome epilética (ENGEL, 2006). Atualmente, há pelo menos 40 síndromes epiléticas distintas, que do ponto de vista etiológico podem ser classificadas em sintomáticas ou idiopáticas (ENGEL, 2001). As epilepsias sintomáticas são aquelas em que é possível a detecção de lesões anatômicas ou histológicas, como nos casos de neoplasias ou malformações. Quando não é possível a detecção da disfunção primária da epilepsia sintomática, a mesma é denominada “provavelmente sintomática” (anteriormente chamada de criptogênica). Nas epilepsias idiopáticas, por sua vez, o processo de epileptogênese não é atribuído a nenhum insulto endógeno ou exógeno específico. Neste caso, diz-se que a epilepsia é própria do indivíduo (idios- próprio; pathos – doença). Hoje se sabe que a maior parte das epilepsias idiopáticas tem como causa mutações genéticas (STEINLEIN, 2008; MCNAMARA; HUANG; LEONARD 2006). Berg e colaboradores (2010) propuseram uma modificação conceitual na classificação etiológica das epilepsias, substituindo os termos “idiopático” e “sintomático” para “genética” e “estrutural/metabólica”, respectivamente. Quando a epilepsia é resultante de uma alteração genética conhecida, ou presumido diz-se que tem causa genética. Epilepsia estrutural/metabólica, por sua vez, é causada por lesões estruturais, tais como isquemias, traumatismo craniano, infecções, dentre outras. Se a epilepsia não tiver uma causa conhecida, podendo ser causada por questões genéticas ou uma outra desordem não reconhecida, é classificada como epilepsia de causa desconhecida (BERG et al., 2010).

Dentre as epilepsias estruturais, a ELT vem sendo alvo de estudos do nosso grupo de pesquisa devido sua importância clínica justificada pela alta incidência, gravidade e refratariedade ao tratamento medicamentoso, (SHORVON, 1990; LÖSCHER; SCHMIDT, 2002).

2.2 Epilepsia do lobo temporal (ELT)

A ELT é a mais frequente, representando 60% dos casos de epilepsia e com maior incidência em adultos jovens (SHORVON, 1990). A ELT caracteriza-se como síndrome epiléptica parcial focal, com as crises se iniciando em estruturas do lobo temporal, como hipocampo, complexo amigdalóide e adjacências, podendo ou não evoluir para uma crise generalizada secundária (SHORVON, 1990; LOTHMAN; BERTRAM; STRINGER, 1991). Dentre os sintomas comuns apresentados pelos pacientes portadores da ELT estão: declínios cognitivos, distúrbios de comportamento, problemas de aprendizado, alterações do estado da memória, entre outros (GUIMARÃES, 2006).

A ELT passou a ser classificada e dividida em dois tipos desde 1989 pela ILAE (ENGEL, 2001), de acordo com o local de gênese das crises geradas: epilepsia lateral / neocortical e epilepsia mesial (ELTM). As epilepsias neocorticais têm sua origem nas estruturas do neocórtex temporal (BARTOLOMEI; WIGNAL, 1999), enquanto as epilepsias mesiais originam-se em estruturas temporais mesiais: hipocampo, córtex entorinal e complexo amigdalóide (KANNER; CAMPOS, 2004). Na ELT com esclerose mesial há uma invasão glial densa no hipocampo e nas regiões adjacentes, bem como morte neuronal, alterações dendríticas, reorganização axonal, gênese de novas células e alterações nas sinapses elétricas (LEITE; CAVALHEIRO, 1998; GARCÍA-GARCÍA et al., 2011).

Uma das características neuropatológicas mais importantes é a morte neuronal seletiva no hipocampo, ocorrendo no corno de Ammon 1 e corno de Ammon 2 (CA1 e CA3) e no hilo (GARCÍA-GARCÍA et al., 2011). Em epilepsia, a morte neuronal geralmente é acompanhada pelo brotamento das fibras musgosas na camada molecular interna da *fascia denteada* do hipocampo de pacientes epilépticos. É possível que a ativação dessas fibras musgosas contribua na ativação anormal de circuitos límbicos (BABB et al, 1991). Há também alterações na morfologia e localização dos dendritos, cujo aumento dos números basais destes nas células granulares e a presença de sinapses assimétricas com as fibras musgosas podem ser parte dos mecanismos que levam ao aumento da excitabilidade na circuitaria hipocampal (GUEDES; GALVIS-ALONSO; LEITE, 2006). Em relação a gênese de novas células, existem a gliose e a neurogênese. Na gliose há proliferação e hipertrofia de corpos celulares gliais. A neurogênese é o

processo de formação de novos neurônios, o que pode contribuir para a excitabilidade no hipocampo (GUEDES; GALVIS-ALONSO; LEITE, 2006).

Como descrito anteriormente, estudos neuropatológicos realizados em cérebros retirados pós-lobotomia têm sugerido que o hipocampo é a principal estrutura-alvo afetada em pacientes com ELTM (ELGER, 2002). O hipocampo faz parte do sistema límbico, anatomicamente situado ao lado do córtex entorrinal e apresenta função essencial no aprendizado e na memória de curto prazo (SELIG; MALENKA, 1997). A formação hipocampal pode ser dividida em 3 regiões: Giro denteado (GD), corno de *Ammon* (CA: CA1, CA2, CA3) ou Hipocampo e o subículo (SELIG; MALENKA, 1997). As principais células que compõem e participam da fisiologia do hipocampo são as granulares e as piramidais, e os neurotransmissores predominantes são os GABA e o glutamato, inibitório e excitatório, respectivamente (SELING; MALENKA, 1997; MESQUITA, 2005). A principal aferência que mantém as conexões intrínseca e extrínseca para o hipocampo origina-se no córtex entorrinal, a via perfurante, na qual fibras se projetam do córtex entorrinal em direção ao hipocampo. Essas fibras inervam os dendritos das células granulares, também chamadas de fibras musgosas, na região da camada molecular interna do GD. Os axônios das células granulares do GD se conectam com as células piramidais da região CA3, e estas projetam suas fibras para a região de CA1, conhecido como colaterais de *Schaffer*. De CA1 os axônios são emitidos para o subículo e, por fim para o córtex entorrinal, formando o circuito denominado via trissináptica hipocampal (AMARAL; WITTER, 1989).

2.3 Tratamento em epilepsia do lobo temporal

O tratamento dos pacientes portadores de ELT tem sido baseado na indicação de DAEs. De fato após um período de uso, diminui o número ou gravidade das crises que acometem os pacientes epiléticos (LÖSCHER & SCHMIDT, 2006). As DAEs são classificadas de acordo com o mecanismo de ação, que são basicamente três: agem sobre os canais iônicos voltagem-dependentes (benzodiazepínicas, ex.: diazepam e lorazepam; e barbitúricas, ex.: fenobarbital), receptores glutamatérgicos (DAEs barbitúricas, ex.: fenobarbital) e GABAérgicos (DAEs benzodiazepínicas, ex.: diazepam) (ROGAWSKI; LOSCHER 2004).

Entretanto, apesar do grande disponibilidade de DAEs disponíveis, cerca de 30%

dos pacientes não respondem adequadamente ao tratamento medicamentoso (LÖSHER; SCHMIDT, 2002). Inicialmente, o paciente é tratado com um fármaco (monoterapia), mas caso este não apresente o efeito desejado, novos fármacos (politerapia) são adicionados ao tratamento inicial. Esta última abordagem apresenta desvantagem ainda maior em relação à toxicidade (REDDY; KURUBA, 2013, PORTO, 2007, BORTOLINI, 2009). Os efeitos colaterais das DAEs são variados, dentre eles é possível citar lentidão psicomotora, dificuldades de memória, concentração e raciocínio. Um estudo realizado em adultos e crianças mostrou que a probabilidade das crises serem controladas com a politerapia, utilizando duas ou mais DAEs usualmente eficazes, é de 5% a 10% dos pacientes refratários (SCHMIDT; RICHTER, 2001). Mattson e colaboradores (1995) também observaram que pacientes nos quais a monoterapia não havia funcionado, apenas 11% obtiveram remissão de crises com combinações variadas de fenitoína, fenobarbital, carbamazepina e primidona.

Uma alternativa para estes pacientes que apresentam resistência aos fármacos comumente utilizados é a remoção cirúrgica do foco epiléptico. Ao indicar um paciente para realização dessa cirurgia é necessário, antes de tudo, considerar que esta é uma alternativa de tratamento irreversível e pode gerar riscos de prejuízo neuropsicológicos, por ser uma técnica invasiva. De uma forma geral, a cirurgia só deve ser indicada quando um paciente não puder alcançar controle aceitável de crises com o uso de DAEs potencialmente eficazes ou combinações destas, que tenham sido administradas até doses máximas sem ocorrência de efeitos colaterais ou, se estes se manifestarem, que sejam mínimos e considerados aceitáveis (BOURGEOIS, 2001).

Visto este cenário de refratariedade às drogas e de restrições referentes ao tratamento cirúrgico das epilepsias, fica clara a necessidade de alternativas terapêuticas. Dentre as já existentes, a técnica de estimulação elétrica do nervo vago vem sendo utilizada desde 1997 com resultados positivos (GARZON, 2002). Porém ainda não é conhecido o mecanismo de ação que produza este efeito antiepiléptico, além de apresentar efeitos colaterais tanto durante a implantação do eletrodo como durante o tratamento, levando a 2% dos pacientes interromperem o tratamento ainda no primeiro ano, dentre os efeitos estão: tosse, dispneia, vômitos, insônia e infecção (GARZON, 2002). Quanto ao mecanismo de ação, algumas hipóteses vêm sendo discutidas, tais como o aumento do fluxo sanguíneo na região do tálamo (KO, 1996; HENRY, DUNWOODY; VOTAW, 1998) ou ação estimulatória nas vias noradrenérgicas, dopaminérgicas e serotoninérgicas (NAIROTOKU; TERRY; HELFERT, 1994).

Outra alternativa que vem sendo estudada para o tratamento da epilepsia é a utilização de células-tronco neurais, já que a epilepsia implica na perda progressiva de subpopulações neuronais. Entretanto, esses estudos ainda são bem iniciais e testados somente em modelos experimentais, nos quais foram observados que animais epiléticos tiveram remissão parcial das crises (CHUN, 2004; WALDAU et al., 2010). A dieta cetogênica também surgiu como proposta de melhorar o controle de crises epiléticas. Esta começou a ser usada como tratamento para epilepsia em 1921, por Wilder, quando se observou que o jejum se mostrava benéfico para o controle de crises em pacientes com epilepsia (UTHMAN, 1992). Em modelo animal, também foi observado um resultado favorável com um aumento de latência para ocorrência de crises, quando os ratos adultos são mantidos em dieta. Porém, eventos adversos foram relatados após o tratamento com a dieta cetogênica, tais como: letargia ou sonolência, sede, dores de cabeça, aumento do colesterol, alucinações e perda de peso não intencional (SCHOELER, 2014).

2.4 O uso de modelos experimentais na busca de novas drogas para o tratamento da ELT

Na busca por novas ferramentas terapêuticas e na ampliação do conhecimento faz-se necessária a utilização de animais nos estudos das epilepsias. De uma forma geral, os modelos de *screening* farmacológico de drogas antiepiléticas vêm sendo usados desde 1960 (WHITE, 1997). Existem vários modelos animais que mimetizam diferentes tipos de epilepsia, (LÖSCHER; SCHMIDT, 1988; LÖSCHER, 2011; SANABRIA; CAVALHEIRO, 2000).

De forma geral os modelos experimentais podem, de acordo com os perfis das crises, serem divididos em três tipos: agudo, crônico e *kindling*. Existem ainda outras classificações, de acordo com o tipo de estímulo (químico e elétrico) e com a predisposição genética dos animais (modelo genético ou não genético) (QUINTANS et al., 2007). Cada modelo expressa de maneira diferente o comportamento motor, eletroencefalográfico e a resposta aos fármacos (TURSKI et al., 1987). Ver tabela 1.

Em modelos agudos, as crises convulsivas acontecem apenas na indução, ou seja, no momento da estimulação: por exemplo, os modelos de eletrochoque máximo

(LÖSCHER; SCHMIDT; 1988) e de estimulação química com pentilenotetrazol (PTZ). O modelo convulsivo de eletrochoque induz crise por estimulação elétrica, usando corrente elétrica por meio de eletrodos em contato com o nervo vago, desenvolvendo crises generalizadas tônico-clônicas (LÖSCHER; FASSBENDER; NOLTING 1991). PTZ é um pró-convulsivante antagonista gabaérgico e a gravidade de crises induzida por este depende da dose e da via de administração (LÖSCHER; FASSBENDER; NOLTING 1991; FISHER, 1989). Estes modelos agudos tem se mostrado muito importantes pois a maioria dos fármacos de primeira geração foram identificados como anticonvulsivante nestes tipos de modelos (LÖSCHER, 1998).

No *kindling* há aplicação repetida de eletrochoque ou de um agente químico, por exemplo o PTZ, com limiar inicialmente subconvulsivo e a cada estimulação as manifestações motoras vão aumentando progressivamente (WESTBROOK, 2000). Como exemplo da utilidade deste modelo, Stratton (2003) mostrou que o levetiracetam e lomatrigena, que são drogas de segunda geração, têm efeito antiepiléptico.

No modelo crônico de epilepsia, as crises ocorrem de forma espontâneas e perduram por um período mais longo, recorrendo em intervalos variáveis e podendo perpetuar durante toda a vida do animal: por exemplo, os modelos induzidos por ácido cáinico e pilocarpina (CAVALHEIRO et al., 1991; SANABRIA; CAVALHEIRO, 2000). O ácido cáinico é o agente químico que induz crises devido a ação glutamatérgica, levando a um quadro conhecido como SE e mimetiza a ELT (QUINTANS, 2007). A administração de pilocarpina, um agonista colinérgico muscarínico, local ou sistêmica, resulta no SE e depois de um período silencioso o animal tem crises espontâneas (TURSKI et al., 1987). Com o aparecimento destes modelos experimentais crônicos os estudos se voltam para a identificação de drogas capazes de prevenir a epileptogênese e/ou diminuir as deficiências comportamentais de longa duração decorrentes das crises, (QUEIROZ; LEITE; MELLO 2002)

O modelo experimental utilizado em nosso estudo foi o crônico pela administração de pilocarpina, com foco na fase aguda da epileptogênese.

Tabela 1 – Comportamento motor nos modelos experimentais

Modelo experimental	Tipo de epilepsia ou crises	Classificação
Eeletrochoque máximo	Epilepsia focal, tônico-clônicas	Elétrico e agudo
Pentilenotetrazol	Depende da via e da dose, mas são normalmente generalizadas e tônica-clônicas	Químico e agudo
Modelo audiogênico	Generalizada e tônico-clônica	Genético e agudo
Ácido caínico	Epilepsia do lobo temporal	Químico e crônico
Pilocarpina	Epilepsia do lobo temporal	Químico e crônico
Kindling	As crise aumentam progressivamente podendo chegar a generalizada	Agudo elétrico e químico

Fonte: Elaborada pela autora.

2.5 Modelo crônico baseado na indução de SE por pilocarpina

Devido à importância clínica da ELT, tem se utilizado muitos modelos experimentais com animais que mimetizam seus aspectos histopatológicos, ou seja, lesões semelhantes à esclerose mesial de lobo temporal, assim como reproduzem alterações comportamentais e eletroencefalográficas que são semelhantes à epilepsia em humanos (BEN-ARI; COSSART, 2000).

O modelo epiléptico provocado pela administração da pilocarpina é um dos modelos de epilepsia mais utilizados experimentalmente (TURSKI et al., 1987, SANTO, 2004). Os estudos que usam este tipo de abordagem são realizados *in vivo* em roedores, com injeções agudas de pilocarpina no encéfalo (por meio de coordenadas estereotáxicas) ou sistêmicas na região intraperitoneal (RATTKA; BRANDT; LÖSCHER, 2013; TURSKI et al., 1987). Os animais estimulados com altas doses de pilocarpina são acometidos pelo SE, em decorrência de estimulação colinérgica, além de posteriormente apresentar lesões semelhantes à esclerose mesial do lobo temporal em seres humanos.

O modelo de pilocarpina pode ser dividido em três períodos (REDDY; KURUBA, 2013):

1. Período agudo, imediatamente após o SE e que perdura por até 24 horas;

2. Período silencioso ou epileptogênese, onde ocorre a normalização progressiva do comportamento e do EEG e as transformações histológicas do cérebro normal para o epilético, e pode ter uma duração de meses;
3. Período crônico, em que há o aparecimento de crises epiléticas espontâneas e recorrentes, sendo estas semelhantes às crises parciais complexas dos seres humanos portadores de ELT.

Este modelo vem sendo muito utilizado na busca de fármacos mais eficazes e com menos efeitos adversos (SILVA, 2008). Alguns trabalhos mostraram que fármacos que estão sendo usados no tratamento da ELT, tais como os levetiracetam e clonazepam, mantiveram esse efeito anticonvulsivante no modelo de pilocarpina (OLIVEIRA, 2005; KUBOVA, 1999; HORT, 2000). As intervenções (testes das drogas) podem ser direcionadas para cada uma das fases, com diferentes finalidades: i) uma intervenção antes da indução do SE pode ser feita com o objetivo de identificar compostos com eficácia anticonvulsivante (prevenindo o SE) e/ou contra os danos induzidos pelo SE; ii) intervenção no período silencioso, com objetivo de identificar agentes com potencial em prevenir a epileptogênese e/ou os déficits comportamentais a longo prazo induzido pelo SE; e iii) intervenção na fase crônica com objetivo de testar drogas eficazes no controle das CREs (LEITE et al., 2002).

2.6 Busca de novas drogas para o tratamento da ELT

Uma estratégia que tem sido utilizada é a prospecção de produtos sintéticos ou naturais com ação anti-inflamatória e/ou neuroprotetora, uma vez que a neurodegeneração e neuroinflamação são eventos importantes na epileptogênese.

A inflamação é uma resposta do sistema imunológico como defesa contra situações que podem causar danos teciduais tais como: presença de microorganismo, agentes físicos (trauma, queimaduras), agentes químicos (toxinas, substâncias), necrose tecidual e/ou reações imunológicas (ABBAS; JANEWA, 2000). Normalmente, a inflamação é benéfica ao organismo, porém, uma inflamação extensiva, prolongada ou não regulada é altamente prejudicial ao organismo (WYSS-CORAY; MUCKE, 2002). Estudos realizados na investigação da inflamação e seus processos têm demonstrado sua

participação em patologias do sistema nervoso central. Este conhecimento é recente, mas vem crescendo e apresentando uma grande importância nas pesquisas de doenças neurológicas. Existem na literatura trabalhos que mostram que a inflamação no SNC está envolvida na patogênese de doenças neurodegenerativas agudas e crônicas, incluindo doenças de Parkinson, Alzheimer, epilepsia e outras (WYSS-CORAY; MUCKE, 2002; LIMA et al., 2007).

Trabalhos experimentais e evidências clínicas demonstram que há inflamação cerebral (neuroinflamação) em pacientes portadores de epilepsia e que esta apresenta como constituinte importante no processo da epileptogênese e no desenvolvimento das CREs (VEZZANI; GRANATA, 2005; VEZZANI, 2011). Indícios sugerem que a inflamação pode ser tanto consequência como causa de epilepsia. Uma evidência de consequência, tanto em humanos como em animais, é que depois da atividade convulsiva rapidamente há o surgimento de diversos mediadores pró-inflamatórios no cérebro, tais como as citocinas, quimiocinas, prostaglandinas, fatores do sistema complemento e moléculas de adesão celular (VEZZANI; GRANATA 2005; VEZZANI, 2011). Diferente tipos celulares no cérebro são capazes de expressar citocinas e seus receptores em nível basal, sendo que na ocorrência de um insulto epileptogênico, muitas dessas moléculas são positivamente reguladas, tais como IL-1 β , TNF- α e IL-6 (VEZZANI, 2011). Uma das evidências clínicas de causa está associada à febre, que é a causa mais frequente de convulsões em crianças em todo o mundo. Além disso, nas doenças autoimunes, tais como lúpus, vasculites, esclerose múltipla e síndromes paraneoplásicas podem causar convulsões recorrentes (BERG et al., 1998; DUBÉ, 2007; NAJJAR, 2008).

Com a observação de que o uso de medicamentos anti-inflamatórios leva a uma redução da frequência de crises em pacientes farmacorresistentes, cada vez mais tem-se investigado drogas anti-inflamatórias quanto a uma potencial ação antiepileptogênica (RIKONEN, 2004; WIRRELL, 2007). Além do mais, a inflamação contribui para o processo de neurodegeneração que ocorre em um cérebro epilético, na neuroinflamação envolve ativação dos macrófagos residentes no encéfalo (microglia), que liberam fatores neurotóxicos e pró- inflamatórios, incluindo citocinas, radicais livres e óxido nítrico que podem lesar neurônios e células gliais (WYSS-CORAY; MUCKE, 2002). Desta forma, drogas com ação neuroprotetora também são promissoras na terapêutica da ELT. Deveras, o diazepam, um fármaco benzodiazepínico considerado

como a primeira escolha no tratamento emergencial do estado de mal epiléptico, possui efeito neuroprotetor em estruturas límbicas após o SE (QASHU et al., 2010).

2.7 Ciclo-glicina-prolina (CGP)

Os neuropeptídeos são neurotransmissores pequenos que agem em diversas situações no sistema nervoso, ajudando-o a se adaptar (HOKFELT et al., 2003). O fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) é um neuropeptídeo que tem importância em diferentes condições médicas, tais como na recuperação de lesões, formação de tumores e neuroproteção, porém seu tamanho tem dificultado sua aplicação clínica (GUAN et al., 2014; BURGO-RAMOS, 2009). O IGF-1 exerce suas funções centrais mediante diferentes mecanismos, dentre os quais aqueles que envolvem a produção de metabólitos secundários. O glicina-prolina-glutamato (GPE), tripeptídeo, é um dos fragmentos endogenamente liberados a partir da clivagem da região n-terminal de IGF-1. Este peptídeo também apresenta um papel na prevenção da morte neuronal induzida por N-metil D-Aspartato (NMDA), ácido quinolínico (agonista NMDA) em diferentes regiões do cérebro (ALEXI et al., 1999).

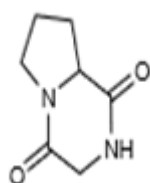
A vida média de GPE é muito curta, e seu último metabólito é o ciclo-glicina-prolina (CGP), um dipeptídeo cíclico, que faz parte de uma família muito importante de compostos bioativos conhecidos por dicetopiperazinas (DKPs) (figura 1). São facilmente disponíveis, tanto a partir de fontes naturais ou por meio de métodos sintéticos, e estáveis à proteólise (BATCHELOR et al., 2003; PÉREZ-PICASO et al., 2009). Estas propriedades tornam os DKPS um grupo interessante de moléculas para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. De fato, o CGP já teve diversos efeitos caracterizados em trabalhos experimentais, tais como: controle na homeostase do IGF-1, diminuição no crescimento de tumores, nootrópico e ansiolítico, efeito neuroprotetor após lesão isquêmica e, mais recentemente, foi caracterizado por ter uma ação anti-inflamatória, em que a serotonina e a prostaglandina foram reduzidas em modelo de edema de pata (GUAN; GLUCKMAN, 2009; GUAN, 2015; FERRO et al., 2012, AQUINO et al., 2013). Interessantemente, tanto a serotonina quanto a prostaglandina tem sido associadas a emergência da atividade epiléptica (VEZZANI; GRANATA 2005; VEZZANI, 2011). Complementando este dado, Jiang e colaboradores (2013)

apontaram o receptor de prostaglandina (EP2) como uma possível estratégia para o tratamento do SE. A ativação dos receptores 5-HT2 no hipocampo pode contribuir para o aparecimento de crises induzidas pela estimulação por meio do modelo de SE (FREITAS, 2004).

O mecanismo de ação do CGP ainda é desconhecido, mas Pérez-Picaso (2009) e colaboradores sugerem que suas ações semelhantes às do IGF-1 sejam mediadas através da ligação competitiva para IGFBPs, receptor de IGF-1.

Alternativamente, tem sido proposto que o CGP seria um metabólito derivado do dipeptídeo prolilglicina Noopept, relacionado com o fármaco piracetam, sendo assim um mimético de CGP, e ambos supostamente com afinidade a um hipotético receptor nootrópico. Alguns trabalhos verificaram que CGP é semelhante ao piracetam não somente pela sua estrutura mas, também, por algumas propriedades farmacológicas pois exibiu efeito nootrópico e ansiolítico após a administração sistêmica em doses de 2-3 ordens de grandeza inferiores aos do piracetam (KOLYASNIKOVA et al., 2013; NARKEVICH et al., 2012). O piracetam é um derivado cíclico de GABA, que tem efeito sobre as mioclonias de origem cortical, mas sua ação na supressão das mioclonias não é totalmente compreendida. Entretanto, acredita-se que este seja capaz de ter efeito nas alterações da serotonina vista em mioclinias corticais (PRANZATELLI; NADI, 1995). Estes dados podem indicar um possível efeito do CGP no controle de crises e na neuroproteção em modelo experimental de indução de SE por pilocarpina.

Figura 1 - Estrutura química de CGP



Fonte: Miméticos de GPE y CPG ¿una nueva familia de agentes neuroprotectores?
Sergio-Alvar Alonso de Diego, 2007

3 OBJETIVOS

Geral:

- avaliar o efeito do ciclo-glicina-prolina no *status epilepticus* e na fase aguda da epileptogênese em modelo de epilepsia do lobo temporal.

Específicos:

- implantar em nosso laboratório a metodologia de indução do *Status Epilepticus* por pilocarpina injetada por via intra-hipocampal;
- avaliar o possível efeito anticonvulsivante do CGP no SE induzido por pilocarpina. Para isto, analisamos os seguintes parâmetros comportamentais: 1) número de animais que desenvolve SE; 2) tempo de latência para o SE; 3) Frequência de crises na latência; 4) Proporção relativa das crises do nível 5; e 4) número de doses de diazepam necessárias para reversão do o SE;
- avaliar o possível efeito do CGP na neurodegeneração hipocampal. Para isto, utilizamos a técnica histoquímica baseada na coloração por fluoro-jade;
- avaliar o possível efeito de CGP na astrogliose hipocampal. Para isto, quantificamos a expressão relativa de GFAP através de RT-qPCR;
- avaliar o possível efeito de CGP na neuroinflamação hipocampal. Para isto, quantificamos a expressão relativa de TNF- α através de RT-qPCR.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais e grupos experimentais

Foram utilizados ratos da linhagem *Wistar*, adultos (com 70 - 90 dias; n= 60) procedentes do Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas – UFAL. Os animais foram mantidos à temperatura de 22 °C, com livre acesso à ração e água no Biotério Setorial do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS). Todos os esforços foram feitos para evitar sofrimento desnecessário dos animais. Todos os procedimentos realizados durante o desenvolvimento do projeto foram aprovados pelo Comitê de Ética da UFAL (Processo nº 7/2013) (Apendicês 1 e 2).

Os animais foram separados nos seguintes grupos experimentais (figura 2):

- NAIVE: animais não manipulados (n=14)
- PILO: animais submetidos à injeção de pilocarpina (n=14);
- DZP + PILO: animais submetidos ao pré-tratamento com diazepam e 30 minutos depois com pilocarpina (n= 12);
- CGP10 + PILO: animais submetidos ao pré-tratamento com ciclo-glicina-prolina (i.p., 10µmol/kg) e 30 minutos depois com pilocarpina (n= 12) ;
- CGP100 + PILO: animais submetidos ao pré-tratamento com ciclo-glicina-prolina (i.p., 100µmol/kg) e 30 minutos depois com pilocarpina (n= 12);
- CGP300+PILO: animais submetidos ao pré-tratamento com ciclo-glicina-prolina (i.p., 300µmol/kg) e 30 minutos depois com pilocarpina (n= 12).

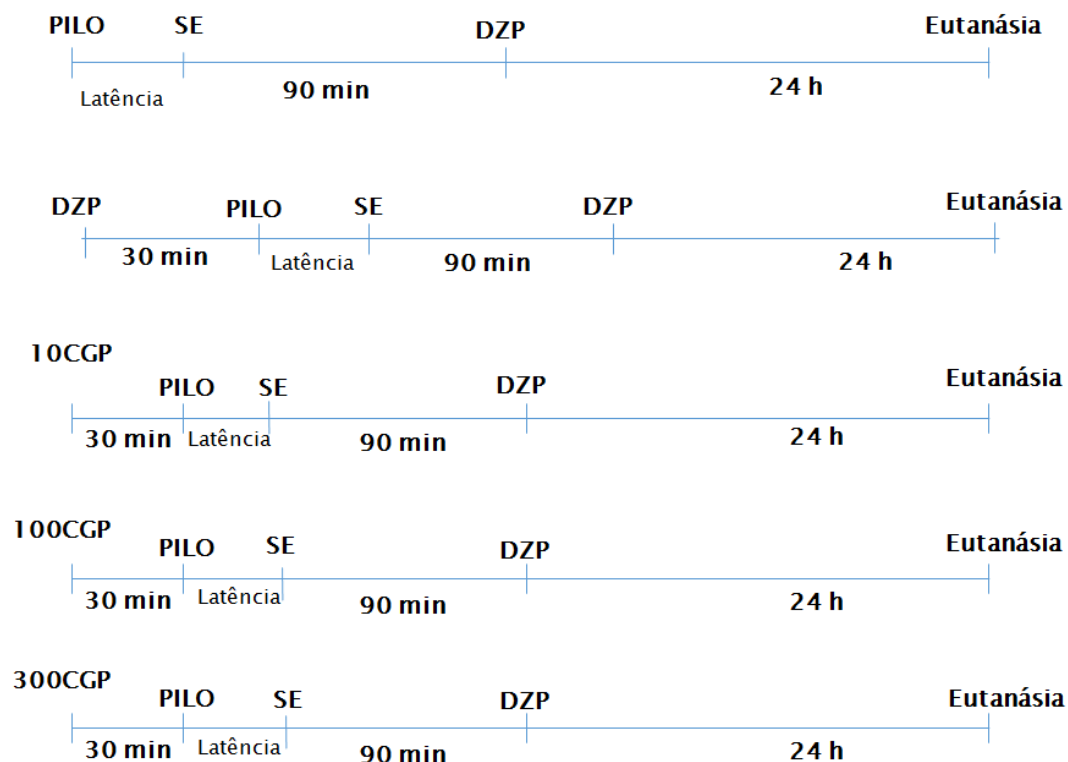
Para cada grupo experimental, seis animais foram usados para análises de neurodegeneração e 6 para análises de expressão gênica diferencial.

Doses das Drogas:

PILO: 1,2 mg/µL

Diazepam: 5 mg/kg

CGP: 10µmol/kg, 100µmol/kg e 300µmol/kg

Figura 2 - Delineamento experimental

Fonte: Elaborada pela autora

4.2 Cirurgia estereotáxica para implante de cânula

Os animais foram anestesiados com 40mg/kg de tiopental sódico (i.p.), receberam 0,1mL/100g de pentabiótico (i.m.) veterinário antes do início da cirurgia e foram tricotomizados na cabeça. Para verificar a efetividade da anestesia, observou-se a presença de reflexo através do aperto da cauda e da pata. Posteriormente, os animais foram fixados no estereotáxico e receberam injeção subcutânea na cabeça de anestésico local lidocaína (0,2ml por animal). A cânula foi implantada estereotaxicamente seguindo coordenadas (Paxinos & Watson, 1996): hilo do giro denteado – 6,30mm Anteroposteriores (AP) (em relação ao bregma); 4,50mm mediolateral (ML) (em relação ao seio sagital) e 4,50mm dorsoventral (DV) (em relação à dura-máter), de acordo com Furtado et al. (2002). Após término de cirurgia, um mandril de fio de aço foi utilizado para fechar a cânula e evitar obstrução e infecção antes do SE. Após a cirurgia estereotáxica, os animais permaneceram no biotério setorial por um período de 4 – 7

dias para recuperação. Neste período, os animais foram observados 2 vezes por dia pelo pesquisador para detectar sinais de recuperação como a capacidade de comer e beber sozinho, caso contrário o pesquisador alimentava-o com uma papinha de ração e salina glicosada.

4.3 Indução do *status epilepticus*

A injeção de 1,2mg/ μ L de pilocarpina foi conduzida através de uma seringa de 5 μ L acoplada a uma bomba de microinjeção com velocidade de 0,5 μ L/minuto. Após um período de latência (cerca de 30 minutos), os animais entraram em SE, definido aqui como um período de crises autossustentadas ou com interminência em intervalos menores do que 5 minutos. O SE foi mantido durante 90 minutos e imediatamente depois, os animais receberam injeção i.p. de diazepam (5mg/kg) para reverter o SE. Em caso de não reversão, os animais recebiam doses adicionais de diazepam (5mg/kg), a cada 15 minutos. Desde o período de injeção de pilocarpina até o término do SE, os animais foram vídeomonitorados em câmera (DCR-SR68, Sony Brasil LTDA).

O mesmo procedimento de injeção foi utilizado para o pré-tratamento com CGP ou DZP nos grupos CGP+PILO e DZP+PILO. Vale ressaltar que os pré-tratamentos foram feitos pela via intraperitoneal e a injeção de pilocarpina foi realizada pela via intrahipocampal.

4.4 Avaliação comportamental

O efeito do pré-tratamento no comportamento dos animais submetidos ao SE foi avaliado conforme os seguintes critérios: a) proporção dos animais que entraram em SE; b) tempo de latência para o SE; c) frequência de crises na latência; d) proporção de crises de nível 5; e e) número de doses de diazepam para reversão do o SE (tabela 8 e 9).

Proporção dos animais que entraram em SE: foi calculada a quantidade de animais que, em algum momento, apresentaram crises autossustentadas por pelo menos 5 minutos.

Latência para o início do SE: foi calculado o tempo que o animal levou para entrar em SE.

Frequência de crises na latência: foram somadas todas as crises que cada animal apresentou durante o período de latência e dividida pelo tempo de latência.

Proporção de crises de nível 5: a proporção das crises durante o SE foi classificada utilizando a escala de Racine (tabela 2). Esta escala é composta por índices (de 1 a 5) atribuídos a diferentes tipos de comportamento durante o SE e que reflete de forma arbitrária, porém crescente, a gravidade das crises. (Racine, 1972). Em seguida, contou-se o número total de crises de nível 5 e calculou-se a proporção dividindo pelo número total de crises de todos os níveis.

Quantidade de doses para reverter o SE: foi contado o número de doses suplementares que cada animal recebeu até a reversão completa do SE.

Tabela 2 - Escala de Racine (1972) Índice	Comportamento
1	Automatismos faciais
2	Mioclonias de cabeça e pescoço
3	Clonias de patas anteriores
4	Elevação sobre as patas posteriores
5	Elevação e queda

Fonte: Elaborada pela autora.

4.5 Análise de Neurodegeneração

A análise foi feita por meio de histoquímica baseada na detecção do corante Fluoro-jade (CHIDLOW, 2008). Segundo o Schmued e colaboradores (1997), o primeiro trabalho a descrever esta técnica, o fluoro jade neurônios por um mecanismo ainda desconhecido, mas que envolve a afinidade deste corante pela acidose desencadeada neste processo de morte celular.

4.6 Perfusão dos animais

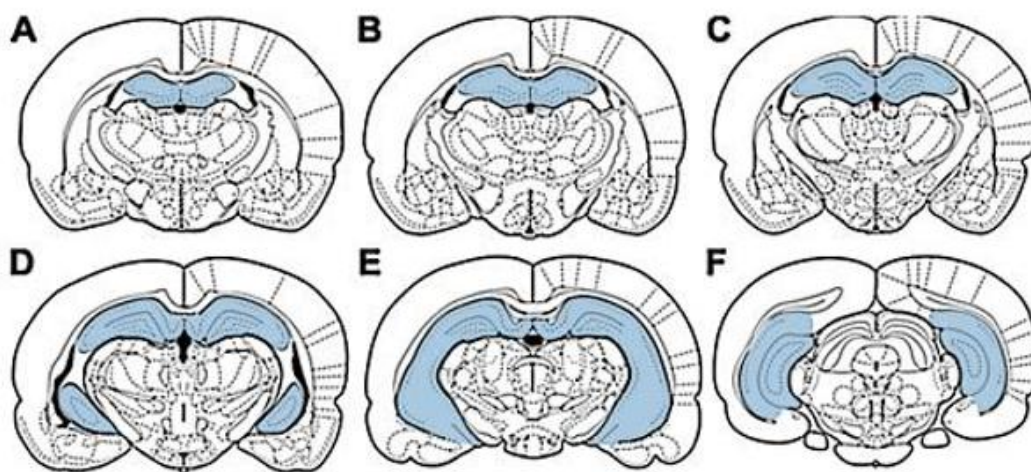
Para a perfusão, os animais foram profundamente anestesiados com tiopental sódico (i.p. 0,1mL/kg). O coração foi exposto e uma agulha acoplada a um cateter foi colocada no ventrículo esquerdo. Cada animal foi infundido com 200 mL de tampão fosfato salina (PBS, 100 mM, pH 7,4) e posteriormente com 150 mL de paraformaldeído (PFA) 4% em PBS, pH 7,4.

Os animais foram decapitados e os cérebros removidos e fixados em PFA 4% por pelo menos 4 horas. Depois, os cérebros foram crioprotégidos com solução de sacarose 20% por 24 horas. Posteriormente, os tecidos foram congelados em *freezer* a -20°C e 3 a 4 horas depois transferidas para *freezer* a -80°C, onde eram mantidos até o momento processamento.

4.7 Cortes dos cérebros

Os cérebros foram cobertos com Tissue Tek (OCT) e, então, cortados em secções de 30 µm em criostato, com temperatura variando de -18 a -22°C. Os cortes foram colocados em lâminas gelatinizadas (solução para gelatinização: gelatina 0,5% e sulfato duplo de cromo e potássio 0,05%), cada qual com seis níveis cerebrais representando a extensão anteroposterior do hipocampo de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (1996) (figura 3). Todas as lâminas foram armazenadas em *freezer* a -20°C.

Figura 3. Ilustração de diferentes secções dos níveis cerebrais do hipocampo



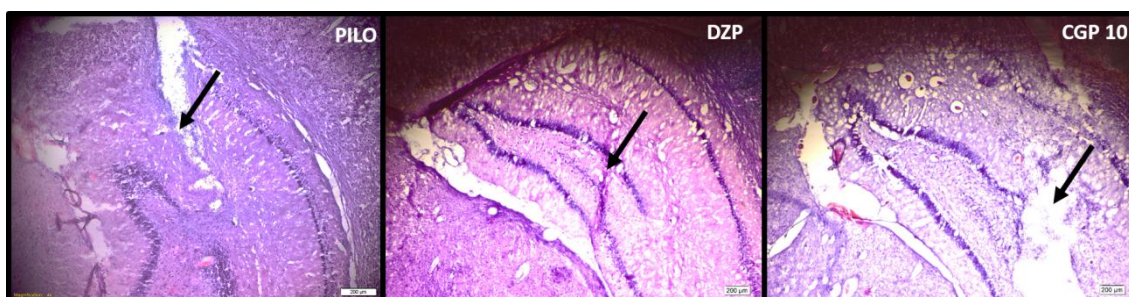
Extensão anteroposterior do hipocampo (A-F; área em azul), do atlas de Paxinos e Watson (1996), representando a disposição dos cortes nas lâminas histológicas.

4.8 Ensaios histoquímicos

4.8.1 Histologia convencional

Foi realizada histologia convencional com hematoxilina e eosina nos cortes de cérebros para observar o local de inserção da cânula no hipocampo. Para desidratação dos tecidos, as lâminas foram incubadas subsequentemente em álcool 100%, 90% e 70%, por 5 minutos. As lâminas foram lavadas em água destilada por 3 minutos e submetidas à solução de hematoxilina por 6 minutos. Em seguida, após uma lavagem rápida, as lâminas foram incubadas em eosina por 30 segundos. Posteriormente, as lâminas foram lavadas uma vez em álcool 90% por 5 minutos e duas vezes em álcool 100% por 5 minutos. Finalmente, as lâminas foram submetidas a dois banhos em xilol por 3 minutos cada. Após o processamento histológico, as lâminas foram analisadas e fotografadas através de um microscópio óptico (figura 4).

Figura 4. Sítio de implantação da cânula no hilo



Fonte: Da autora

Histoquímica com hematoxilina-eosina. Fotomicrografia de amostras representativas de cada grupo. Objetiva de 4x.

4.8.2 Fluoro-Jade (FJ)

De acordo com o protocolo proposto por (SCHMUED, ALBERTSON & SLIKKE, 1997) e modificado por Castro (2012), as lâminas foram submetidas a banhos sucessivos de etanol absoluto por 3 minutos, etanol 70% por 1 minuto, água destilada por 1 minuto, permanganato de potássio 0,06 % por 15 minutos, com agitação branda, 3 lavagens em dH₂O por 1 minuto e 30 minutos em FJ (0,0001%), sob agitação branda.

Posteriormente, as lamínulas foram montadas nas lâminas por meio de uma mistura na proporção de 3:1 de ácido acético 0,1% e Fluoromount respectivamente. Os cortes foram analisados e as imagens capturadas através de um microscópio de fluorescência (Nikon DS RI1).

4.8.3 Contagem de células

A contagem de células foi feita utilizando o programa ImageJ (Wayne Rasband; Research Services Branch, National Institute of Mental Health Bethesda, MD, USA). Foram contados os números de células em três regiões hipocâmpais: CA1, CA3 e hilo e profundidades (dorsal, medial e ventral) do hipocampo. Para a análise quantitativa, os dados obtidos em diferentes profundidades foram somados, obtendo-se, assim, o padrão de marcação total das sub-regiões CA1, CA3 e hilo. Essas regiões foram selecionadas devido à alta sensibilidade ao processo neurodegenerativo. Todas as células foram contadas no hipocampo contralateral, devido à cicatriz desenvolvida com a implantação da cânula e ação da pilocarpina no ipsilateral.

4.9 Dissecção dos hipocâmpos

Os animais foram anestesiados em câmara de CO₂, decapitados em guilhotina, o cérebro foi removido e os hipocâmpos dissecados em superfície fria e imediatamente congelados em nitrogênio líquido (-180°C). As estruturas foram mantidas em *freezer* a -80°C até o processamento das amostras.

4.10 Extração de RNA total de hipocampo de rato

O RNA foi extraído usando Trizol, seguindo recomendações do fabricante (Invitrogen, CA, USA), com modificações, conforme descrito a seguir.

Os hipocâmpos direitos foram transferidos do freezer a -80°C para nitrogênio líquido. Foram adicionados 350µL de Trizol a cada tubo contendo o hipocampo direito, o conteúdo foi macerado com pistilos para tubo, adicionaram-se 140µL de clorofórmio, que foram então homogeneizados por inversão dos tubos e mantidos à temperatura ambiente por aproximadamente 3min. As amostras foram centrifugadas (Heal Force ® -

High speed refrigerated bench) a 12000g, durante 15 minutos, a 4°C. A fase contendo o RNA (fase aquosa) foi transferida para outro tubo. O conteúdo remanescente foi armazenado em *freezer* a -80°C. Foram adicionados 175µL de isopropanol à fase aquosa, que foi homogeneizada e mantida à temperatura ambiente por 30min. As amostras foram, então, centrifugadas a 12000g por 30 minutos, a 4°C. Depois disto, o pellet de RNA foi visualizado. O líquido foi desprezado cuidadosamente por inversão do tubo e foi adicionado 1mL de etanol 75% . Em seguida, os *pellets* foram deslocados em vórtex e centrifugados a 12000g por 5 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e os processos de lavagem com etanol 75% e centrifugação repetidos. O conteúdo líquido foi novamente desprezado e os tubos mantidos invertidos em papel absorvente. Os *pellets* foram ressuspensos em 30µL de água milli-Q tratada com dietilpirocarbanato (DEPC) e mantidos 20min à temperatura ambiente e 40min em gelo, para solubilização. Os RNAs foram mantidos em *freezer* a -80°C. Todas as soluções usadas foram preparadas com água DEPC.

4.11 Quantificação das amostras de RNA

A concentração e a pureza das amostras foram avaliadas por espectrofotometria (Espectrofotômetro Eppendorf BioPhotometer Plus). As amostras foram quantificadas a partir da densidade óptica (OD) obtida em comprimento de onda de 260nm. A pureza dos RNAs foi avaliada a partir do cálculo da razão entre os valores de absorbância nos comprimentos de onda 260nm e a 280nm.

4.12 Experimentos de RT-qPCR

4.12.1 Síntese de DNA complementar (cDNA)

Após a extração, os RNAs foram tratados com DNase. Aos volumes das amostras de RNA total foram adicionados tampão de DNase (1x) (Ambion), 1U de DNase (Ambion) e 2U de RNaseOUT (Invitrogen). Os conteúdos foram incubados a 37°C, durante 10min. Em seguida, foi adicionado EDTA 5mM e as reações foram, então, incubadas a 75°C por 10min.

Foram usados 10µL do RNA tratado para síntese de cDNA. O volume restante foi armazenado em *freezer* a -80°C. Para a síntese de cDNA foi usado 1µg de RNA total. Utilizou-se o *kit High Capacity* (Applied Biosystems), seguindo as instruções do fabricante. Foram adicionados 2µL de RT Buffer, 0,8µL de dNTP 25x (100mM), 2µL de RT Random Primers (10x), 1µL de Multiscribe Reverse Transcriptase (50U/µL) e 4,2µL de água DEPC. As reações foram incubadas a 25°C por 10 min, 37°C por 120 min e 85°C por 5 min. Em seguida, foram adicionados 180µL de água DEPC. O volume total foi dividido em 4 alíquotas (50µL), que foram armazenadas em *freezer* a -80°C. As análises foram realizadas através do método 2-ΔΔCt (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). Os experimentos foram realizados em triplicatas (Desvio Padrão ≤ 0,5) e com controles negativos (sem cDNA).

4.12.2 Quantificação das amostras de RNA

A concentração e a pureza das amostras foram avaliadas por espectofotometria. As amostras foram quantificadas a partir da densidade óptica (OD) obtida em comprimento de onda de 260nm. Nas tabelas 3, 4, 5 e 6 estão dispostas a amostra OD no comprimento de onda de 260nm e concentração do RNA extraído.

Tabela 3 - Concentração de RNA extraído de hipocampus dos animais do grupo experimental PILO

Amostra	OD 260 nm	Quantificação de RNA µg/µL
1	0,32	1,28
2	0,15	0,6
3	0,10	0,4
4	0,12	0,48
5	0,17	0,68
6	0,10	0,4

Tabela 4- Concentração de RNA extraído de hipocampus dos animais do grupo naïve

Amostra	OD 260 nm	Quantificação de RNA µg/µL
1	0,33	2,632
2	0,24	1,912
3	0,26	2,088
4	0,30	2,400
5	0,32	2,584
6	0,26	2,080

Tabela 5 - Concentração de RNA extraído de hipocampus dos animais do grupo experimental tratado com CGP na dose de 100µmol/kg

Amostra	OD 260 nm	Quantificação de RNA µg/µL
1	0,15	0,6
2	0,20	0,8
3	0,22	0,88
4	0,39	1,56
5	0,05	0,2
6	0,25	1,0

Tabela 6 - Concentração de RNA extraído de hipocampus dos animais do grupo experimental tratados com CGP na dose de 300µmol/kg

Amostra	OD 260 nm	Quantificação de RNA µg/µL
1	0,40	1,6
2	0,30	1,2
3	0,35	1,4

4.12.3 Reações de amplificação

A curva de dissociação foi feita para verificação da especificidade das reações e formação de dímeros. Ao observar a formação de apenas um pico nas curvas, é constatada a amplificação específica do fragmento alvo. A Figura 5 mostra as curvas de dissociação dos *primers* e a tabela 7 mostra a sequência dos *primers*.

Os perfis de expressão dos genes estudados foram obtidos por meio do método RT-qPCR, as reações foram realizadas utilizando o equipamento StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems). As reações foram feitas em triplicata e eram

compostas de 2,0µL de cada amostra de cDNA, 6µL de SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 1µL de água DEPC, 3µL de cada primer em concentrações específicas, constituindo um volume de 12µL. As seguintes condições foram aplicadas para a amplificação: ativação enzimática a 95°C por 10min; seguida de 40 ciclos de desnaturação, 95°C por 15seg e anelamento e extensão, 60°C por 1min. Ao término, foi realizada a etapa de dissociação a 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto e 95°C por 15 segundos, para geração da curva de dissociação. O software StepOnePlus™ (Applied Biosystems) determinou automaticamente o número de ciclos de PCR em que o limiar da curva de amplificação foi atingido – cycle threshold (CT). Os genes beta-actina (Actb) e proteína ribossomal, grande, P1 (RPLP1) foram usados como normalizadores.

Figura 5. Curvas de dissociação obtidas dos primers dos genes analisados, geradas pelo programa StepOnePlus™ (Applied Biosystems).

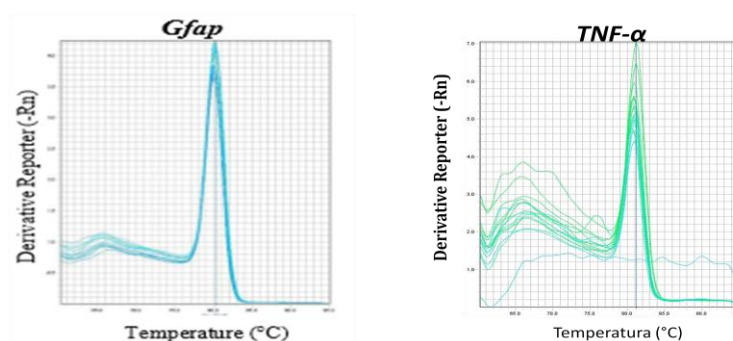


Tabela 7 – Genes e sequência dos primers desenhados

Gene	Símbolo	Sequência dos primers 5'-3'
Beta-actina	Actb	F - AGCCTTCCTTCCTGGGTATG R - GAGGTCTTTACGGATGTCAAC
Proteína ribossomal, grande, P1	Rplp1	F - GCATCTACTCCGCCCTCA R - ATCTTATCCTCCGTGACCGT
Proteína glial fibrilar ácida	GFAP	F - AACCGCATCACCATTCTGT R - CATCTCCACCGTCTTTACCAC
Fator de necrose tumoral- alfa	TNF-α	F - GCTCCCTCTCATCAGTTCCA G - CTCCGCTTGGTGGTTTGCTA

4.13 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas, inicialmente, por meio de análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de bonferroni. Entretanto, a distribuição muito variável entre os grupos, quando comparados todos grupos de uma vez, poderia mascarar diferenças estatísticas significantes. Com isso, foram realizadas análises estatísticas através de teste T para fazer uma análise entre dois grupos por vez, ou seja, Pilo x CGP 10 μ mol, Pilo x CGP 100 μ mol e Pilo x CGP 300 μ mol. Foi utilizada a plataforma *GraphPad Prism*, versão 5,02 (*GraphPad*, USA). Os resultados com valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

5 RESULTADOS

5.1 Análise comportamental

Para investigar um possível efeito do CGP no SE foi realizada análise comportamental dos seguintes parâmetros: a) proporção dos animais que desenvolveram SE; b) tempo de latência para o SE; c) total de crises na latência; d) proporção das crises do nível 5. A comparação das médias feita através de teste T, pareando cada grupo experimental com o grupo controle (PILO). Os dados obtidos nesta análise estão representados nas tabelas 8 e 9.

A tabela 8 indica a proporção dos animais que não entraram em SE. Observa-se que 100% dos animais do grupo PILO entraram em SE enquanto que nenhum animal (0%) que recebeu um pré-tratamento com diazepam desenvolveu SE. Em relação ao pré-tratamento com CGP, é interessante notar que houve uma possível relação entre a dose administrada e a proporção dos animais que não desenvolveram SE, sendo 8,3%, 16,7% e 25% dos animais nas doses de 10, 100 e 300 μ mol/kg respectivamente. Esses dados podem indicar um efeito anticonvulsivante de CGP dependente de dose.

Observa-se, na tabela 9, que somente o pré-tratamento com CGP na concentração de 300 μ mol/kg apresentou efeito significativo no comportamento: i) aumentou o tempo de latência para entrada no SE, sugerindo que nesta dose, CGP apresente uma ação de retardar o aparecimento das crises autossustentadas; ii) necessitou de maior dose de diazepam para que o SE fosse revertido.

Entretanto, observa-se também que CGP, mesmo na dose de 300µmol/kg não teve efeito significativo na frequência de crises antes do período de SE e na proporção das crises de nível 5 durante o SE.

Tabela 8. Proporção dos animais que não desenvolveram SE após administração de PILO

	PILO	DZP + PILO	CGP + PILO		
			10µmol/ kg	100µmol/ kg	300µmol/ kg
Animais injetados com pilo	15	12	13	14	12
Animais que não entraram em SE	0	12 (100 %)	1 (8,3%)	2 (16,7%)	3 (25 %)

Tabela 9. Resultados comportamentais

Variáveis	Grupo de animais			
	PILO	10µmol/kg	100µmol/kg	300µmol/kg
Latência para o SE	27,87±3,08	40,82± 1,31	26,30 ± 3,72	41,56 ± 6,33
Frequência na latência	0,25±0,041	0,28 ± 0,10	0,13 ± 0,04	0,23 ± 0,054
Frequência relativa 5	0,24 ± 0,06	0,43 ± 0,10	0,13 ± 0,05	0,21 ± 0,08
Número de doses de DZP para reversão do SE	2,27 ± 0,30	2,18 ± 0,30	2,30 ± 0,42	3,33 ± 0,37

Média ± Desvio padrão. Em vermelho os valores de $p < 0,05$ considerados significativos

5.2 Análise do efeito de CGP na fase aguda da epileptogênese

Desde que a neurodegeneração, astrogliose e inflamação tem sido consistentemente caracterizadas na fase aguda da epileptogênese, avaliamos se o CGP apresenta algum efeito nesses processos neuropatológicos.

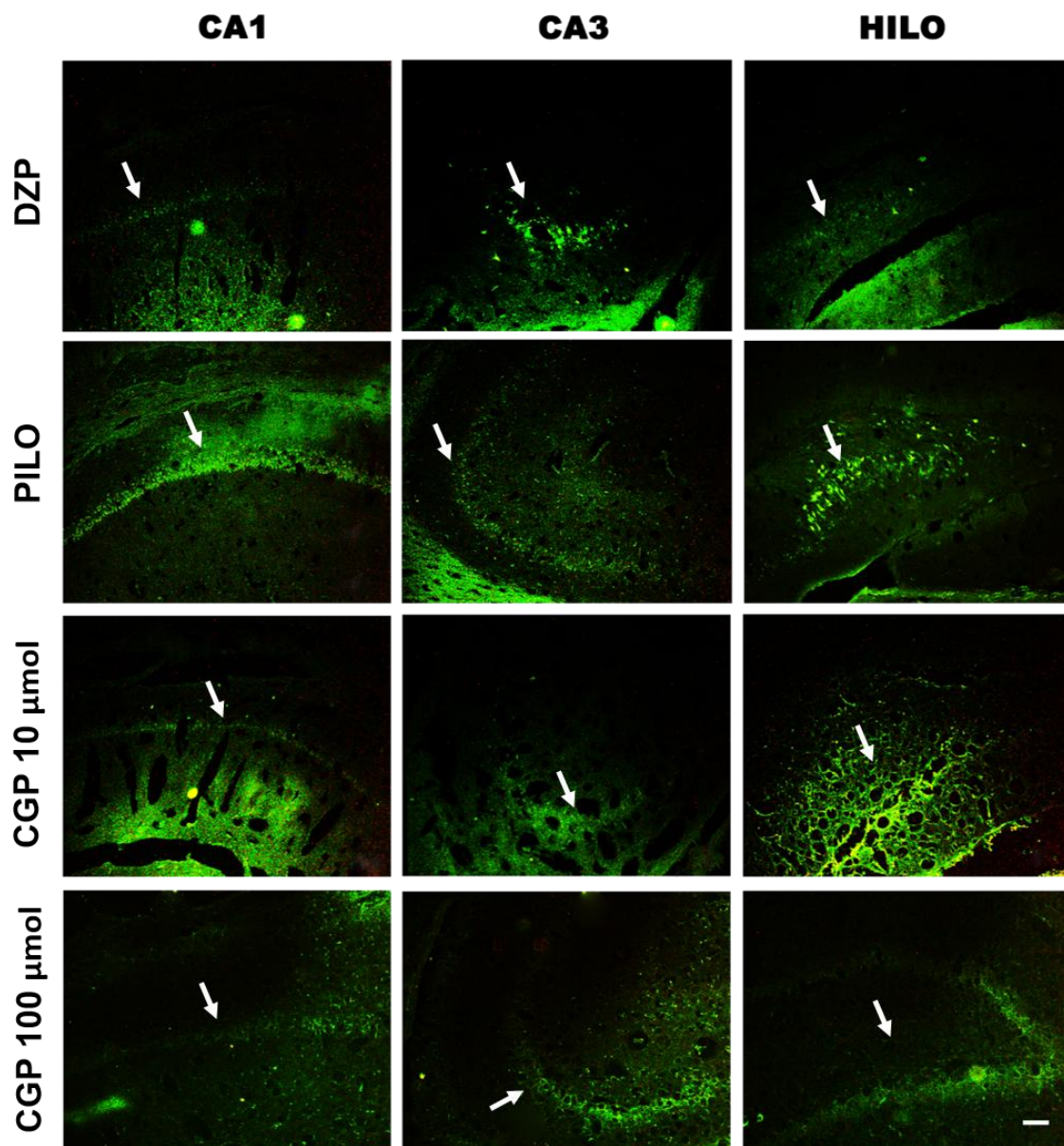
5.2.1 Análise do efeito da CGP na neurodegeneração

A investigação do potencial efeito neuroprotetor da CGP foi realizada por meio da histoquímica de Fluoro-Jade (FJ), que apresenta especificidade para neurônios em processo degenerativo.

As contagens foram feitas em diferentes áreas (CA1, CA3 e hilo) e profundidades (dorsal, medial e ventral) do hipocampo. Para a análise quantitativa, os dados obtidos em diferente profundidade foram somados, obtendo-se, assim, o padrão de marcação total das sub-regiões CA1, CA3 e hilo.

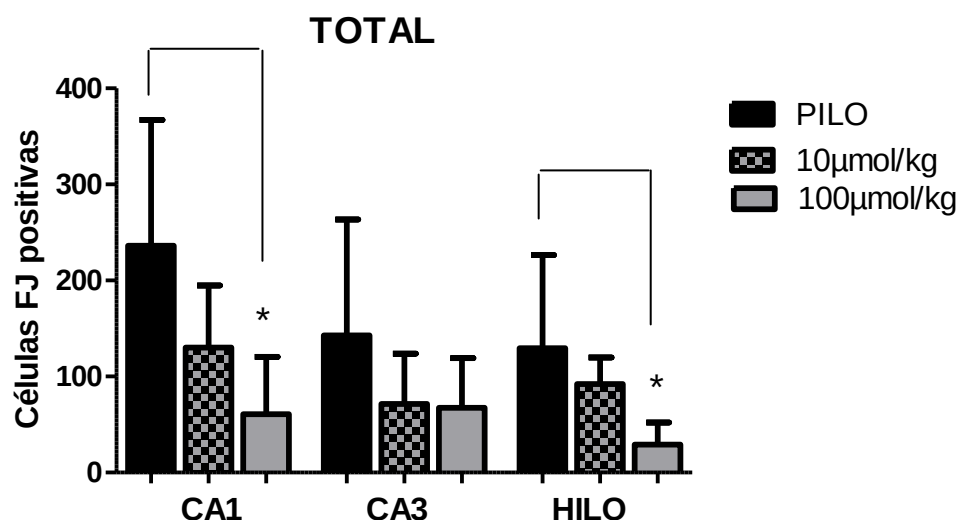
De forma geral, observou-se ampla marcação de neurônios FJ-positivos no hilo do giro denteado e nas regiões CA1 e CA3 24 horas após a reversão do SE (figura 6). Quando os grupos foram comparados entre si, viu-se diferença significativa nas regiões CA1 e hilo, em que a marcação foi menor no grupo tratado com CGP 100 μ mol/kg, quando comparado com o grupo PILO (figura 7). Não se houve diferenças significantes na marcação das diferentes áreas entre o grupo CGP 10 μ mol/kg e os demais grupos experimentais. Estes dados indicam que apenas na dose de 100, CGP apresenta um efeito neuroprotetor em CA1 e hilo da formação hipocampal.

Figura 6. Fotomicrografias do efeito do CGP na neurodegeneração CA1, CA3 e Hilo



Os cortes foram obtidos de animais tratados com CGP nas doses de 10 e 100µmol/kg, tratados com diazepam (DZP) ou não tratados (PILO) e foram submetidos a técnica de Fluoro-Jade. Na vertical estão as regiões analisadas do hipocampo, com seta branca indicando cada região. Na horizontal estão os grupos tratados. Aumento de 10x.

Figura 7. Efeito do CGP na neurodegeneração



Quantificação das células FJ positivas nas sub-regiões CA1, CA3 e Hilo da formação hipocampal. Foram avaliados animais tratados com CGP nas doses de 10 e 100µmol/kg, tratados com diazepam (DZP) ou não tratados (PILO). Os dados estão representados pela média $\pm$ DS. A análise estatística foi feita com o teste ANOVA. * $p < 0,05$ em relação ao PILOe: CA1 (PILO: 236,3 $\pm$ 46,26 n=8; 10µmol/kg: 130,0 $\pm$ 26,44 n=6; 100µmol/kg: 60,67 $\pm$ 24,39 n=6); CA3 (PILO: 142,9 $\pm$ 42,64 n=8; 10µmol/kg: 71,67 $\pm$ 21,27 n=6; 100µmol/kg: 67,33 $\pm$ 21,11 n=6); hilo (PILO: 129,5 $\pm$ 34,28 n=8; 10µmol/kg: 92,17 $\pm$ 11,30 n=6; 100µmol/kg: 29,17 $\pm$ 9,443 n=6).

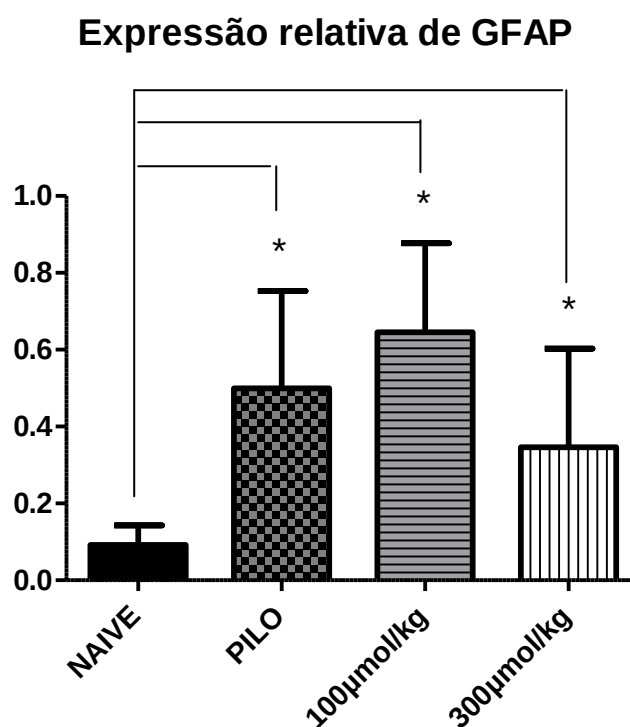
5.2.2 Análise do efeito da CGP no processo de astrogliose durante a fase aguda da epileptogênese

A investigação do potencial efeito de CGP na proliferação astrocística foi feita através da análise dos níveis de expressão de Proteína Glial Ácida (GFAP), utilizando a técnica de RT-qPCR. A proteína GFAP foi selecionada para esta análise, uma vez que é expressa de maneira específica em astrócito e tem sido utilizada como marcador de astrogliose durante o processo epileptogênico (ROMCY-PEREIRA et al., 2008).

Na figura 8, podem-se observar os níveis relativos de transcritos GFAP em diferentes grupos experimentais. A análise estatística mostrou que a expressão de GFAP

está significativamente maior nos grupos PILO, CGP 100 μ mol/kg e CGP 300 μ mol/kg quando comparados com animais naives (figura 8). Este dado sugere um aumento na expressão de GFAP em resposta ao SE. Não há diferenças significantes nos níveis de GFAP entre o grupo PILO e os grupos tratados com CGP. Este dado indica que CGP não apresentou efeito na superexpressão de GFAP (astroglíose) após o SE.

Figura 8. Efeito do CGP na expressão relativa de GFAP



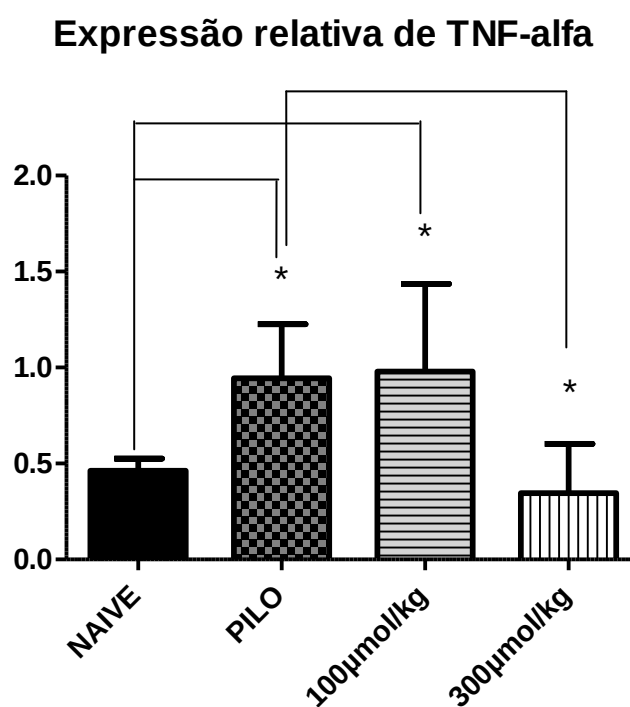
Quantificação dos níveis relativos de transcritos GFAP obtidos através de RT-qPCR. Foram utilizados hipocampus de animais tratados com CGP nas doses de 100 e 300 μ mol/kg, ou não tratados (PILO) e animais naives. Os dados estão representados pela média $\pm$ DS. A análise estatística foi feita com o teste T. * $p < 0,05$ em relação ao controle PILO ou NAIVE. (PILO: 0,50 $\pm$ 0,11 n=5; 100 μ mol/kg: 0,65 $\pm$ 0,09 n=6; 300 μ mol/kg: 0,35 $\pm$ 0,15 n=3; NAIVE: 0,09 $\pm$ 0,02 n=6).

5.2.3 Análise do efeito da CGP no processo de neuroinflamação durante a fase aguda da epileptogênese.

Desde que CGP tem sido caracterizado como tendo ação anti-inflamatória, avaliamos um potencial efeito desta droga nos níveis de expressão do Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) através de RT-qPCR. De fato, selecionou-se TNF- α por ser um mediador da resposta pró-inflamatória sabidamente superexpressa após uma crise convulsiva (PLATA-SALAMÃN et al., 2000; VEZZANI et al., 2000).

Na figura 9, observa-se a expressão relativa dos transcritos TNF- α nos diferentes grupos experimentais. A análise estatística mostrou que os níveis de TNF- α são significativamente maiores nos grupos PILO e CGP 100 μ mol/kg quando comparados com os do grupo naive e CGP 300 μ mol/k. Este dado indica que CGP na dose de 300 apresenta um efeito de reprimir a superexpressão de TNF- α durante a epileptogênese.

Figura 9. Efeito do CGP na expressão relativa de TNF- α



Quantificação dos níveis relativos de transcritos GFAP obtidos através de RT-qPCR. As análises foram feitas em hipocampus de animais tratados com CGP nas doses de 100 e 300 μ mol/kg, ou não tratados (PILO) e animais naives. Os dados estão representados pela média $\pm$ DS. A análise estatística foi feita com o teste T. * $p < 0,05$ em relação ao controle PILO ou NAIVE. (PILO: 0,94 $\pm$ 0,13 n=5; 100 μ mol/kg: 0,98 $\pm$ 0,20 n=5; 300 μ mol/kg: 0,35 $\pm$ 0,15 n=3; NAIVE: 0,46 $\pm$ 0,03 n=6).

6 DISCUSSÃO

6.1 Comportamento- Controle de crises

Observamos que os ratos submetidos ao tratamento agudo com CGP 300µmol/kg antes da indução do SE apresentaram alterações comportamentais indicativas de efeito anticonvulsivante. De fato, no grupo CGP300 + PILO, uma quantidade maior de animais não desenvolveram SE e os que apresentaram, passaram por um tempo maior no período de latência. Estes dados são favoráveis a nossa hipótese de que o uso de CGP apresenta efeito anticonvulsivante.

Dentre outros aspectos, nossa hipótese baseou-se na evidência de que CGP apresenta uma ação anti-inflamatória (FERRO et al, 2012, AQUINO et al, 2013). De fato, alguns trabalhos têm mostrado que drogas com efeitos anti-inflamatórios foram eficazes no controle das crises epilépticas em modelo de SE induzido por pilocarpina. O tratamento com curcumina diminuiu a gravidade e a frequência e aumentou a latência, efeito este dose-dependente (DU PENG et al., 2012; AHMAD, 2013). Além disso, o berberina, que tem efeito neuroprotetor e anti-inflamatório, aumentou a latência do SE e diminuiu a morte em CA1 (GAO, 2014). Outro anti-inflamatório, baicalina, aumentou o tempo de latência do SE e diminuiu a morte em CA1 e CA3 da formação hipocampal (LIU, 2012).

Por outro lado, a ausência de efeito anticonvulsivante do CGP nos demais parâmetros comportamentais aqui avaliados pode ser justificada pela via de ação anti-inflamatória desta droga, que ainda é desconhecida. Deveras, existem diferentes vias associadas à inflamação. De tal sorte que uma droga que age em determinadas vias podem não ter um efeito anticonvulsivante quando administradas isoladamente, sendo necessária, portanto, uma combinação com outras drogas anti-inflamatórias que agem em vias distintas. Kwon e colaboradores (2013) testou, através de administração isolada ou combinada, o potencial efeito anticonvulsivante de três tipos de anti-inflamatórios (receptor de IL-1- rIL-1ra, inibidor de cox-2- CAY 10404 e um antagonista de caspase-1- minociclina) que agem em vias diferentes, os autores não observaram efeitos anticonvulsivantes (no tempo de latência e na duração do SE) quando as drogas foram

administradas isoladamente. Porém quando foi realizado um tratamento com combinação binária de rIL-1ra + inibidor de cox-2, os autores observaram aumento da latência, mas não na duração do SE, em comparação com aqueles que receberam apenas veículo. Portanto, é possível que estudos com combinação de CGP com outras drogas possam apresentar também um efeito anticonvulsivante em outros parâmetros comportamentais.

A observação de efeito somente na maior dose testada corrobora com os dados de Guan e Gluckman (2009) que mostram que os seus efeitos neuroprotetores após isquemia são dependentes da dose. É possível que doses maiores de CGP possam aumentar tal efeito ou mesmo a aplicação por outras vias de injeções diferentes da usada, como diretamente no hipocampo, fizesse com que as menores doses testadas surtisse algum efeito.

A despeito da ação anticonvulsivante de CGP na dose de 300 μ mol/kg, observamos que esses animais necessitam de uma quantidade maior de DZP para reverter o SE. Este resultado poderia ser explicado com a hipótese de que CGP seja um agonista parcial de GABA e exerça antagonismo competitivo com diazepam. De acordo com esta hipótese, precisaria de uma quantidade maior de diazepam para deslocar o CGP.

Agentes bloqueadores de GABA diminuíram o efeito ansiolítico de piracetam (MALDAVKIN, 2006). Como dito anteriormente, CGP é semelhante ao piracetam não só pela sua estrutura como também por algumas propriedades farmacológicas. Assim sugerimos o CGP seja ligante de receptor de GABA.

De qualquer forma, é importante analisar o valor informativo dos nossos achados, considerando os seguintes aspectos do delineamento experimental utilizado neste estudo:

- O estudo foi realizado apenas em modelo animal de SE induzido através da administração de pilocarpina. De fato, este modelo vem sendo extensamente utilizado para estudar a ELT já que reproduz as principais características desse tipo de epilepsia. Este modelo também vem sendo explorado em experimentos farmacológicos que buscam prever uma possível atividade clínica de drogas (SILVA, 2008). Alguns dos principais fármacos antiepiléticos, como o levetiracetam e clonazepam, já tiveram seu

efeito anticonvulsivante confirmado em modelo de pilocarpina (OLIVEIRA, 2005; KUBOVA, 1999; HORT, 2000). Por outro lado, buscando uma investigação mais ampla, faz-se necessário avaliar se o CGP também apresenta efeito anticonvulsivante em outros modelos animais. A literatura mostra que existem agentes antiepiléticos que têm ação em certos modelos e em outros não, tais como a fenitoína e carbamazepina, que são efetivos no modelo do eletrochoque e ineficazes em modelo de pentilenotetrazol (LOSCHER, 1988).

- O tratamento foi realizado antes do SE visando seu controle. De fato, em nosso modelo o paradigma experimental de pré-tratamento foi utilizado com dois objetivos: i) avaliar efeito anticonvulsivante. Desde que o SE é uma crise convulsiva autossustentada, drogas que previnam ou reduzam essas crises são fortes candidatas a agirem no controle das crises convulsivas espontâneas; ii) avaliar o efeito na epileptogênese, pois a intervenção precoce no SE tem tido um resultado funcional a longo prazo (PITKÄNEN; LUKASIUK 2009). Estes objetivos se inserem na idéia de um tratamento preventivo. Assim, o uso deste paradigma experimental para o início de uma investigação da ação de drogas apresenta uma série de vantagens, tanto metodológicas (tempo, gasto etc) quanto de questões biológicas que podem ser investigadas.

- Foi utilizado um espectro amplo de parâmetros comportamentais. De fato, neste estudo avaliamos 5 indicadores de ação anticonvulsivante: 1) proporção dos animais que entraram em SE; 2) tempo de latência para o SE; 3) total de crises antes do período de SE; 4) Proporção de crises do nível 5, e, 5) número de doses de diazepam para reverter reversão do o SE. Na literatura, observa-se que os estudos que têm como objetivo avaliar o efeito de drogas no SE, em sua maioria analisam somente a latência e morte durante o SE (DU PENG et al., 2012; AHMAD, 2013; GAO, 2014; LIU, 2012). Raros são os que incorporam também gravidade e frequência de crises durante o SE (DU PENG, 2012; AHMAD, 2013; VEZZANI, 2002). Assim os dados obtidos no presente estudo, mostrando que o CGP tem efeito no SE no modelo que utilizamos são bem consistentes.

6.2 Ação neuroprotetora de CGP

Neste trabalho, observamos por meio de contagem neuronal, que o pré-tratamento dos animais com CGP na concentração de 100 $\mu\text{mol/kg}$ levou a uma redução significativa de perda neuronal na região de CA1 e hilo da formação hipocampal, na fase aguda da epileptogênese. De fato, os animais submetidos ao SE e pré-tratados com CGP $\mu\text{mol/kg}$ tiveram menor marcação de fluoro jade nestas regiões quando comparados com animais com apenas pilocarpina.

Esses achados indicam que CGP apresenta uma ação neuroprotetora, corroborando com estudo que descreveu uma redução na morte celular em animais tratados com CGP e submetidos a AVC isquêmico (GUAN & GLUCKMAN, 2009). Existe a possibilidade de que a neuroproteção seja decorrente da ação anti-inflamatória desta droga, embora só observou-se efeito de CGP nos níveis de expressão de TNF- α quando administrado na dose de 300. De fato, foi mostrado em modelo de edemas de pata que CGP leva a uma prevenção de níveis mais elevados de mediadores pró-inflamatórios que estão associados às convulsões, tais como serotonina e prostaglandina (FERRO, 2012; AQUINO, 2013). Corroborando o nosso, outros estudos têm contribuído para aumentar o conhecimento mostrando que diversas drogas anti-inflamatórias com vias e alvos diferentes podem ter efeito na neuroproteção em epilepsia (ROSIM, 2010; GAO, 2014; LIU, 2012).

Em nosso paradigma experimental, a neuroproteção foi restrita às subáreas CA1 e hilo embora não sabemos os mecanismos envolvidos nesta ação localizada. Trabalhos na literatura têm mostrado drogas que têm efeito neuroprotetor seletivo em algumas áreas do hipocampo (ROSIM, 2010; GAO, 2014; LIU, 2012). Rosim e colaboradores (2010) mostraram efeito neuroprotetor da adenosina na região de CA1 em modelo de pilocarpina. Por sua vez, Liu (2012) viu efeito do baicalin tanto na região de CA1 como também na região de CA3, em modelo de pilocarpina. Apesar das análises da histoquímica para o grupo CGP300 ainda não terem sido concluídas, os resultados aqui apresentados são promissores e abrem perspectivas para aprofundarmos na investigação de uma potencial ação de CGP na terapêutica da ELT.

6.3 Ação do CGP no processo de astrogliose

Neste estudo, a avaliação do processo de astrogliose durante a epileptogênese foi feita com base na quantificação dos níveis de expressão de GFAP. De fato, GFAP é reconhecidamente utilizado como marcador de astrogliose durante o processo epileptogênico. A astrogliose ocorre em decorrência de danos causados ao SNC, processo no qual astrócitos entram em estado reativo conhecido como gliose, que é caracterizada por alterações morfológicas (hipertrofia), alterações funcionais e por um aumento acentuado da expressão de GFAP (SIMPSON, 2010; ROMCY-PEREIRA, 2008). A literatura tem mostrado que GFAP é superexpresso em hipocampo de animais e humanos epiléticos (LAURÉN, 2010; OZBAS-GERÇEKER, 2006; TANG, 2002; XU, 2011).

Os dados aqui gerados indicam que CGP, nas concentrações de 100 e 300 $\mu\text{mol/kg}$, não têm efeito na superexpressão de GFAP (astrogliose) durante a epileptogênese. Em concordância com a literatura, observou-se que expressão de GFAP está aumentada nos animais submetidos ao SE, em comparação ao grupo naïve. De fato, muitos estudos em diferentes modelos experimentais mostram de maneira consistente uma superexpressão de GFAP na fase aguda da epileptogênese (1-4 dias pós SE ou crise) (DO NASCIMENTO, 2012; TORRE, 1993). Entretanto, os grupos CGP não apresentaram diferenças significantes na expressão de GFAP quando comparados com PILO, indicando que o pré-tratamento dos animais com CGP não interferiu no aumento de expressão de GFAP durante a epileptogênese.

Embora não se conheçam ainda os mecanismos biológicos associados ao processo de astrogliose, postula-se que exista uma correlação positiva com a intensidade da lesão e morte neuronal. De fato, quando há lesão no tecido nervoso, ocorrem ativação e proliferação das células da glia com subsequente secreção de citocinas, prostaglandinas e outras moléculas envolvidas no processo inflamatório (KREUTZBERG, 1996; HANISCH, 2002). Assim, nossa hipótese baseada tanto no efeito anti-inflamatório quanto neuroprotetor de CGP era de que esta droga poderia modular negativamente o processo de astrogliose. Embora nossos dados tenham refutado esta hipótese, é importante considerar que as análises de expressão foram feitas utilizando hipocampo total, enquanto o efeito neuroprotetor de CGP, aqui observado, foi restrito a determinadas sub-regiões do hipocampo. Assim, para melhor entender esta

questão, faz-se necessário avaliar o efeito de CGP na expressão de GFAP através de abordagens “*in situ*”, como, por exemplo, imunohistoquímica.

6.4 Ação do CGP no processo de neuroinflamação

Neste trabalho, observamos que os níveis de TNF- α são significativamente maiores nos grupos PILO e CGP 100 μ mol/kg quando comparados com os do grupo naive e CGP 300 μ mol/kg. Este dado indica que CGP na dose de 300 apresenta um efeito de reprimir a superexpressão de TNF- α durante a epileptogênese.

A presença de agentes infecciosos, traumas, dano cerebral, isquemias ou doenças crônico-degenerativas pode desencadear a neuroinflamação, quando ocorre a liberação de citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF α , proteínas de potencial atividade pró-inflamatória, liberadas que são liberadas no foco lesivo (VEZZANI, 2011).

O TNF- α é um mediador da resposta pró-inflamatória. Esta citocina é uma das mais importantes para a sustentação da inflamação cerebral em diversas desordens neurológicas como Parkinson, Alzheimer, demência e doença de Huntington (PENKOWA et al., 2009). A elevada expressão da citocina TNF também é um achado comum após uma crise epilética. Esta citocina está superexpressa no período de 6 horas após crise convulsiva e só retorna aos níveis basais três semanas após as crises (PLATA-SALAMÃN, 2000; VEZZANI, 2000).

Diante disso, levantamos a hipótese de um possível efeito do CGP na diminuição da expressão de TNF- α . Nosso resultado mostrou que na dose 300 μ mol/kg houve a redução da expressão desta citocina. O tratamento com CGP poderia diminuir a morte neural através da diminuição da produção de fatores quimiotáticos que direcionam células efectoras da resposta imune, e o conjunto destes fatores possivelmente apresentaria um efeito neuroprotetor. De fato, trabalhos têm mostrado um importante papel anti-convulsivo para esta mesma citocina (GRELL, 1998; YUHAS, WEIZMAN & ASHKENAZI, 2003).

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados encontrados neste trabalho, pode-se concluir que o CGP na concentração de 300µmol/kg apresenta ação: anticonvulsivante quando administrado isoladamente (aumento do tempo de latência para início do SE), apresenta efeito na expressão relativa de TNF- α e apresenta efeito neuroprotetor na dose de 100µmol/kg em raros submetidos ao *status epilepticus* induzido por pilocarpina.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; JANEWA Y; Ç.A., JR. **Immunology: Improving on Nature in the Twenty-First Century**. Cell2000; 100: 129-138.

AHMAD, M. Protective effects curcumin against lithium-pilocarpine induced status epilepticus, cognitive dysfunction and oxidative stress in young rats. **Saudi journal of biological sciences**, v, 20, p. 155-162. 2013.

ALEXI, T., et al. The IGF-I Amino-Terminal Tripeptide Glycine-Proline-Glutamate (GPE) is Neuroprotective to Striatum in the Quinolinic Acid Lesion Animal Model of Huntington's Disease. **Exp. Neurol.**, v. 159, p. 84-97. 1999.

AMARAL D.G.; WITTER M.P. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. **Neuroscience**, v. 31(3), p. 571-91. 1989.

AQUINO, F. L. T. et al. Cyclo-gly-pro attenuates the nociceptive behavior and inflammatory response in mice. In: WORLD CONGRESS ON INFLAMMATION, 11., 2013., Rio Grande do Norte. **Resumos...** Rio Grande do Norte: International Association of Inflammation Societies, 2013. 246 p.

BABB et al.. Temporal lobe volumetric cell densities in temporal lobe epilepsy. **Epilepsia**, v.25 p. 729-740. 1984. BATCHELOR, D. C., et al. Pharmacokinetics of Glycine-Proline-Glutamate, the N-Terminal Tripeptide of Insulin-Like Growth Factor-1, in Rats. **Anal. Biochem.** V. 323, p 156-163. 2003.

BARTOLOMEI, F.; WIGNAL, J. Seizures of temporal lobe epilepsy identification of subtypes by coherence analysis using stereoelectroencephalography. **Clinic of Neurophysiology**, 110, 741-754. 1999.

BEN-ARI, Y; COSSART, R. Kainate, a double agent that generates seizures: two decades of progress, **Trends in Neuroscience**. V. 23, p. 580-587. 2000.

BERG A.T., et al. Seizures with fever after unprovoked seizures: an analysis in children followed from the time of a first febrile seizure. **Epilepsia**.v. 39 p. 77-80. 1998

BERG A.T. et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. **Epilepsia**, V. 51(4) p. 676-685. 2010.

BORTOLONI, L.G.C. et al. Endocrine and metabolic effects of antiepileptic drugs. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v.53 no.7. 2009.

BOURGEOIS, B.F. General concepts of medical intractability. In: Lüders, H.O., comair, Y.G., (eds.). **Epilepsy surgery**, p. 63-8. 2001.

BRODIE M.J.; DICHTER, M.A. Antiepileptic drugs. **The new england journal of medicine**, v. 334 p 168-175. 1996.

BURGO-RAMOS , E. et al. The N-terminal tripeptide of insulin-like growth factor-I protects against beta-amyloid-induced somatostatin depletion by calcium and glycogen synthase kinase 3 beta modulation. *J. Neurochem.*, v. 109, p. 360–370, 2009.

CASTRO, O.W. **Análise comparativa da neurodegeneração e neurogênese após Status Epilepticus induzido por administração sistêmica de pilocarpina e microinjeções na formação hipocampal de pilocarpina e extrato bruto de carambola, modelos de epilepsia do lobo temporal**. 2012. 276 f. Tese (Doutorado em Fisiologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2012.

CAVALHEIRO, E. A., et al. Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brains triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. **Epilepsia** 32(6): 778-82, 1991

CHIDLOW, G. Evaluation of Fluoro-Jade C as a marker of degenerating neurons in the rat retina and optic nerve. **Experimental Eye Research**. V. 88, p. 423-437, 2008.

CHUN, K. et al. Human neural stem cell transplantation reduces spontaneous recurrent seizures following pilocarpine-induced status epilepticus in adult rats. **Brain Research**, v. 1023, p. 213-221. 2004.

DO NASCIMENTO, A. L., et al. Neuronal degeneration and gliosis time-course in the mouse hippocampal formation after pilocarpine-induced status epilepticus. **Brain Res**, v.1470, p.98110. 2012.

DU PENG et al. Anticonvulsive and antioxidant effects of curcumin on pilocarpine-induced seizures in rats. **Chinese Medical Journal**, v. 125(11) p. 1975-1979. 2012.

DUBÉ, C.M. Fever, febrile seizures and epilepsy. **Trends Neurosci**. V. 30 p.490–496. 2007.

ELGER, C.E. Epilepsy: Disease and Model to Study Human Brain Function. **Brain Pathology**, v. 12, p. 193-198. 2002

ENGEL, J. Jr. "Concepts of Epilepsy", **Epilepsia**, v 36, p. 23-29. 1995.

ENGEL J. Jr . A Proposed Diagnostic Scheme for People with epileptic Seizures and with epilepsy: report of the ILAE task force on classification and Terminology. **Epilepsia**. v. 42(6) p. 796-803. 2001.

ENGEL J. Jr. Special Article Report of the ILAE Classification Core Group. **Epilepsia**, v. 47(9) p. 1558–1568, 2006.

FERNANDES, M.J.S. Epilepsia do lobo temporal: mecanismos e perspectivas. **Estudos avançados**. v.27 p. 77. 2013.

- FERRO, J.N.S. et al. Dipeptideo cyclo-(Gly-Pro) induz resposta antinociceptiva e antiedematogênica em camundongos. In: REUNIÃO REGIONAL DA FESBE, 7., 2012, Alagoas. **Resumo**, Alagoas: FeSBE, 2012. p. 46, ref. 1-94.
- FISHER R.S. Animal Model of Epilepsies. **Brain Research Review**. v.14, p.245-278, 1989.
- FREITAS, R.M. et al. Monoamine levels after pilocarpine-induced status epilepticus in hippocampus and frontal cortex of Wistar rats. **Neurosci Lett**, V. 370, p. 196-200. 2004.
- FRIEDMAN, L.K. et al. Lack of resveratrol neuroprotection in developing rats treated with kainic acid. **Neuroscience**, v. 230, p. 39-49. 2013.
- FURTADO, M.A. et al. Behavioral, morphologic, and electroencephalographic evaluation of seizures induced by intrahippocampal microinjection of pilocarpine. **Epilepsia**, v. 43 Suppl 5, p. 37-39, 2002.
- GALLUCI-NETO, J., MARCHETTI R.L. Epidemiologic aspects and relevance of mental disorders associated with epilepsy. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 27(4) p. 323-8. 2005.
- GARCÍA-GARCÍA F., et al. Growth hormone improves hippocampal adult cell survival and counteracts the inhibitory effect of prolonged sleep deprivation on cell proliferation. **Brain res bull.** v 2884(3 p. 252-7 2011.
- GAO, F. et al. Berberine exerts an anticonvulsant effect and ameliorates memory impairment and oxidative stress in a pilocarpine-induced epilepsy model in the rat. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v, 10, p. 2139–2145. 2014
- GARZON E. Epilepsia Refratária: Conceito e Contribuição das Novas Drogas Antiepilépticas e de outras Modalidades Terapêuticas. **Rev. Neurociências**, v. 10(2), p. 66-82. 2002.
- GRELL, M. et al. The type1 receptor (CD120a) is high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor. **Proc. Natl. Acad Sci USA**. 95;570-575.1998.
- GUAN, J.; GLUCKMAN, P.D. IGF-1 derived small neuropeptides and analogues: a novel strategy for the development of pharmaceuticals for neurological conditions. **British Journal of Pharmacology**, v. 157 (6), p. 881–891, 2009.
- GUAN, J., et al. Cyclic glycine-proline regulates IGF-1 homeostasis by altering the binding of IGFBP-3 to IGF-1. **Scientific reports** | 4 :4388 |DOI:10.1038/srep04388. 2014.
- GUAN, J, et al.. Modeling the effect of insulin-like growth factor-1 on human cell growth. **Mathematical Biosciences**. V.259p. 43-54. 2015.

- GUEDES F. A., GALVIS-ALONSO O.Y. & LEITE J.P. Plasticidade Neuronal Associada à Epilepsia do Lobo Temporal Mesial: Insights a partir de Estudos em Humanos e em Modelos Animais. **J Epilepsy Clin Neurophysiol**, v. 12(1 suppl(1) p. 10-17. 2006.
- GUERRINI, R. Epilepsy in children. **Lancet**, v. 367 p. 499–524. 2006.
- GUIMARÃES. C. A. **Epilepsia de lobo temporal na infância: avaliação neuropsicológica**. UNICAMP Campinas- São Paulo- Brasil.2006.
- HANISCH U.K. Microglia as a source and target of cytokines . **Glia**. V. 40(2), p. 140-155. 2004
- HENRY, T.R., DUNWOODY, G.A. & VOTAW JR. Therapeutic response correlates with thalamic blood flow increases induced acutely by vagus nerve stimulation in partial epilepsy. **Neurology**, 50:A66.1998.
- HOLTMAN, L. et al. Effects of SC58236, a selective COX-2 inhibitor, on epileptogenesis and spontaneous seizures in a rat model for temporal lobe epilepsy. **Epilepsy res.**, v.84(1), p. 56-66. 2009.
- HOLTMAN, L. et al. Cox-2 inhibition can lead to adverse effects in a rat model for temporal lobe epilepsy. **Epilepsy res.**, v. 91(1), p. 49-56. 2010.
- HORT, J. Interstrain differences in cognitive functions in rats in relation to status epilepticus. **Behavioural brain research**, v.112, p. 77-83, 2000.
- JIANG, J. et al. Inhibition of the prostaglandin receptor EP2 following status epilepticus reduces delayed mortality and brain inflammation. **PNAS**, v. 110 p. 3591–3596. 2013
- KANNER, A.; CAMPOS, M. Epilepsia de lobo temporal. **Epilepsias: Diagnóstico y Tratamiento**. P. 252-268. 2004.
- KREUTZBERG, G.W. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. **Trends Neurosci**. V. 19(8), p. 312-318. 1996.
- KO D. Vagus nerve stimulation activates central nervous system structures in epileptic patients during PET H2O15 blood flow imaging. **Neurosurgery**, v. 39, p. 426-31. 1996.
- KOLYASNIKOVA, K.N., et al. Antihypoxic Activity of Cyclopropylglycine Analogs
- KUBOVA, H. et al. Changes in NADPH-diaphorase positivity induced by status epilepticus in allocortical structures of the immature rat brain. **Brain research bulletin**, v 48, p. 39-47, 1999.
- KWON Y.S., et al. Neuroprotective and antiepileptogenic effects of combination of anti-inflammatory drugs in the immature brain. **Journal of neuroinflammation**, 10-30. 2013.

LAURÉN, H., et al. Transcriptome analysis of the hippocampal CA1 pyramidal cell region after kainic acid-induced status epilepticus in juvenile rats. **PloS one**, v.5, n.52010.

LEES G.V.; JONES E.G. Adaptado por J.O. McNamara. Epilepsy. **Neurobiology of Disease**, v.7, p. 549-551. 2000.

LEITE, J.P.; CAVALHEIRO, E.A. Neurobiologia da esclerose mesial temporal. In:.

LEITE, J.P., GARCIA-CAIRASCO, N. , CAVALHEIRO, E.A,. New insights from the use of pilocarpine and kainite models. **Epilepsy Research**, v. 50 p. 93-103. 2002.

LIMA R.R., et al. INFLAMMATION IN NEURODEGENERATIVE DISEASE. **Revista Paraense de Medicina** V21 (2). 2007

LIU, Y.F. The Anticonvulsant and Neuroprotective Effects of Baicalin on Pilocarpine-Induced Epileptic Model in Rats. **Neurochem Res**, v. 37, p. 1670–1680. 2012.

LIVAK, K.; SCHMITTGEN, T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods** , v.25, n.4, p.402-082001. LUDERS, H., et al. Semiological seizure classification. **Epilepsia**, v.39, n.9, p. 1006-1013. 1998.

LOSCHER, W.; SCHMIDT, D. Which animal models should be used in the search for new antiepileptic drugs? A proposal based on experimental and clinical considerations. **Epilepsy Res.**, v. 2 145-181. 1988.

LÖSCHER, W.; FASSBENDER C.P. ; NOLTING B. The role of technical, biological and pharmacological factors in the laboratorial evaluation of anticonvulsivant drugs. III. Pentylentetrazole seizure models. **Epilepsy Research**, v.8, p.78-94, 1991.

LÖSCHER, W. New visions in the pharmacology of anticonvulsion. **European Journal of Pharmacology**. V. 342(1), p. 1-13. 1998.

LÖSCHER, W.; SCHMIDT, D. New horizons in the development of antiepileptic drugs. **Epilepsy Research**, v. 50, p. 3-16, 2002.

LÖSCHER, W.; SCHMIDT, D. New horizons in the development of antiepileptic drugs: Innovative strategies. **Epilepsy Research**, v. 69, p. 183-272, 2006.

LÖSCHER, W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. **Seizure**, v. 20, p. 359-368. 2011.

LOTHMAN, E.W; BERTRAM, E.H.; STRINGER, J.L. Functional anatomy of hippocampal seizures. **Prog Neurobiol.** v. 37(1) p. 1-82. 1991.

MAGIORKINIS E. Hallmarks in the history of epilepsy: Epilepsy in antiquity. **Epilepsy and Behavior**. v. 17 p. 103-108 2010.

- MALDAVKIN, G.M. Participation of GABA--benzodiazepine receptor complex in the anxiolytic effect of piracetam. **Eksp Klin Farmakol.** V. 69(3), p.7-9. 2006.
- MATTSON, R.H. ET al. Comparison of carbamazepine, phenobarbital, phenytoin, and primidone in partial and secondarily generalized tonic-clonic seizures. **N Engl J Med**, v. 313 p.145-151. 1985.
- McNAMARA, J.O. Emerging insights into the genesis of epilepsy. **Nature**, v. 399 p. A15–A22. 1999.
- McNAMARA J.O., HUANG Y.Z., LEONARD A.S. Molecular signaling mechanisms underlying epileptogenesis. **Sci STKE**. v. 10; 2006(356):re12. 2006.
- MELDRUM, B. Amino acids neurotransmitters in new approaches to anticonvulsant drug action. **Epilepsia**, v. 22 p. 140 – 149. 1984.
- MESQUITA, F. Jr., et al. Electrophysiological properties of cultured hippocampal neurons from Wistar Audiogenic rats. **Brain Research Bull.** 2005.
- MALDAVKIN, G.M. Participation of GABA--benzodiazepine receptor complex in the anxiolytic effect of piracetam. **Eksp Klin Farmakol.** V. 69(3), p.7-9. 2006
- NAIROTOKU, D.K., TERRY, W.J., HELFERT, R.W. Intermittent vagus nerve stimulation activates brainstem noradrenergic nuclei. **Epilepsia**, v. 35 (suppl8):3. 1994.
- NAJJAR, S. Immunology and epilepsy. **Rev. Neurol. Dis**, v. 5, p. 109–116. 2008.
- NARKEVICH V.B., et al. The Effects of Himantane and Cyclopropylglycine on the Enzymatic Linkage of Monoamine Synthesis in the Rat Brain. **Neurochemical Journal.** V. 6, p. 272–277. 2012.
- OLIVEIRA, A. A. et al. Evaluation of levetiracetam effects on pilocarpine-induced seizures: cholinergic involvement. **Neuroscience letters**, V 385, p.184-188, 2005.
- OZBAS-GERÇEKER, F., et al. Serial analysis of gene expression in the hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy. **Neuroscience**, v.138, n.2, p.457-74. 2006.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinate, Compact Third Edition. New York: **Academic Press**, 1996.
- PENKOWA, M., et al. Interleukin-6 deficiency reduces the brain inflammatory response and increased oxidative stress and neurodegeneration after kainic acid-induced seizures. **Neuroscience**, v. 102, p. 805-818. 2001
- PÉREZ-PICASO, L., et al. Efficient Microwave Assisted Syntheses of 2,5-Diketopiperazines in Aqueous Media. **Molecules.** V. 14, p. 2836-2849. 2009
- PITKÄNEN A.B.; LUKASIUK, K. Molecular and cellular basis of epileptogenesis in symptomatic epilepsy. **Epilepsy and behavior**, v. 14, p. 16-25. 2009.

PLATA-SALAMĂN, C.R., et al. Kindling modulates the IL-1 β system, TNF- α , TGF- β 1, and neuropeptide mRNAs in specific brain regions. **Brain Res Mol Res.** V. 75, p. 248-258. 200.

PRANZATELLI MR; NADI NS. Mechanism of action of antiepileptic and antimyoclonic drugs. In: Fahn S, Hallett M, Lüders HO, Marsden CD (eds). **Advances in Neurology**. Lippincott-Raven,v.. 23, 1995, p. 329-357.

POLASCHECK, N., BANKSTAHL M., LÖSCHER W. The COX-2 inhibitor parecoxib is neuroprotective but not antiepileptogenic in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. **Exp Neurol.**, v. 224(1), p. 219-233. 2010.

PORTO L.A. et al. O papel dos canais iônico nas epilepsias e considerações sobre as drogas antiepilépticas- uma breve revisão. **J. epilepsy clin. neurophysiol.** vol.13 no.4 2007.

QASHU, F. et al. M. Diazepam administration after prolonged status epilepticus reduces neurodegeneration in the amygdala but not in the hippocampus during epileptogenesis. **Amino Acids.** 38(1): 189–197, 2010.

QUEIROZ, C.; LEITE, J.; MELLO, L. E. Modelos experimentais em epilepsia. Cérebro e mente. 2002. Disponível em <http://www.comciência.br> Acesso em: 15 maio 2015.

QUINTANS Jr. L.J. Modelos animais para avaliação anticonvulsivantes: uma revisão. **Rev. Bras. Farm.**, v. 88(4) p. 163-166, 2007.

RACINE, R.J. Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizure. **Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol**, v. 32, p. 281–294, 1972.

RATTKA, M., BRANDT, C.; LÖSCHER. The intrahipocampal kainate model of temporal lobe epilepsy revised: Epileptogênese, behavioral, and cognitive alterations, pharmacological response, and hippocampal damage in epileptic rats. **Epilepsy research**, v. 103, p. 135-152. 2013.

REDDY D.S & KURUBA R. Experimental Models of Status Epilepticus and Neuronal Injury for Evaluation of Therapeutic Interventions. **Int J Mol Sci**, v. 14(9) p. 18284–18318. 2013.

RIKONEN, R. Infantile spasms:therapy and outcome. **J. child neurol.** 19; 401-404. 2004.

ROGAWSKI M.A. & LOSCHER W. The neurobiology of antiepileptic drugs. **Nat Rev Neurosci**, v. 5(7) p. 553-564. 2004.

ROMCY-PEREIRA, R. N., et al. Genes and epilepsy II: differential gene expression in epilepsy. **Rev Assoc Med Bras**, v.54, p.461-6. 2008.

ROPPER, H.A. BROWN, RH. Principles of neurology, new York, **McGraw-Hill**, 2005.

- ROSIM, F.E. et al. Adenosina e Neuroproteção na Epilepsia do Lobo Temporal: Da ativação do receptor A1 ao bloqueio do receptor A2A. **J Epilepsy Clin Neurophysiol**, v16(2), p. 64-68. 2010.
- SANABRIA, E. R. G. & CAVALHEIRO, E. A. Epileptogênese: Contribuição dos modelos experimentais. In **EPILEPSIA**. GM.M. Guerreiro C A M, Cendes F, Lopes-Cendes. São Paulo, Lemos editorial & Gráficos Ltda:29-57, 2000.
- SANDER, J. W. Some aspects of prognosis in the epilepsies: a review. **Epilepsia**. v.34, n.6, Nov-Dec, p.1007-16. 1993. SANTO J.L.E., MAINERI ,N., PORTUGUESZ, M. W., epilepsia e crises não epiléticas. **J epilepsy clin. Neurophysiol**. V. 10, p. 29-33, 2004.
- SCHMUEDE L.C., ALBERTSON C., SLIKKER W. JR. Fluoro-Jade: a novel luorochrome for sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration. **Brain Res.**, v. 751(1), p. 37-46. 1997.
- SELIG D.K.; MALENKA, R.C. Extracellular field potential recording in brain slices. **AxoBits**, v. 20 p. 7-10. 1997;
- SHORVON, S.D. (1990) Epidemiologia, classificação, história natural e genética da epilepsia. In: Costa JC (ed). **Epilepsy. A Lancet Review**. p 3-13. 1990.
- SILVA, I.R., et al. Epilepsia e Neuroproteção: O Papel do Agonista Adenosinérgico A1(RPia) na Modulação da Crise Induzida por Pilocarpina. **J Epilepsy Clin Neurophysiol**; 14(3):106-110. 2008.
- SIMPSON, J. E., et al. Astrocyte phenotype in relation to Alzheimer-type pathology in the ageing brain. **Neurobiol Aging**, v.31, n.4, p.578-90, Apr. 2010.
- SCHMIDT D.; RICHTER K. Alternative single anticonvulsant stability. In: Lüders HO, Comair YG, (eds.). **Epilepsy drug therapy for refractory epilepsy**. **Ann Neurol**, v. 19, p. 85-87, 1986. 2001.
- SCHOELER, N.E. et al. Ketogenic dietary therapies for adults with epilepsy: feasibility and classification of response. **Epilepsy and Behavior**, v.37, p. 77-81. 2014.
- STEINLEIN O.K. Genetics and epilepsy. **Diálogos Clin Neurosci**, v. 10 (1) p. 29-38. 2008.
- STRATTON, S.C., et al. Effects of lamotrigine and levetiracetam on seizure development in a rat amygdale kindling model. **Epilepsy RES**. V53, N 1-2, p 95-106, 2003.
- TANG, Y., et al. Genomic responses of the brain to ischemic stroke, intracerebral haemorrhage, kainate seizures, hypoglycemia, and hypoxia. **The European journal of neuroscience**, v.15, n.12, p.1937-52. 2002.
- TORRE, E. R., et al. Glial response to neuronal activity: GFAP-mRNA and protein levels are transiently increased in the hippocampus after seizures. **Brain Res**, v.631, p.256-64. 1993.

TROJNAR, M. et al. NEUROPROTECTIVE EFFECTS OF ANTIEPILEPTIC DRUGS. **Pol. J. Pharmacol.**, v. 54, p. 557-566. 2002.

TURSKI, L. et al. The seizures induced by pilocarpine: behavioral encephalographic and neuropathological studies in rodents. **Pol J Pharmacol Pharm.**, v. 39(5)p. 545-555. 1987.

UTHMAN B.M., et al. Neurochemical effects of vagus nerve stimulation in human. **Brain Res**, v. 583 p.300-03. 1992.

VEZZANI A et al. Powerful anticonvulsant action of IL-1 receptor antagonist on intracerebral injection and astrocytic overexpression in mice. **PNAS**, v. 97, p. 11534–1159. 2000.

VEZZANI A et al. Functional Role of Inflammatory Cytokines and Antiinflammatory Molecules in Seizures and Epileptogenesis, **Epilepsia**, v. 43(Suppl. 5), p.30–35, 2002.

VEZZANI, A. & GRANATA, T. Brain Inflammation in Epilepsy: Experimental and Clinical Evidence. **Epilepsia**, v. 46(11), p. 1724–1743. 2005.

VEZZANI, A. The role of inflammation in epilepsy. **Nat Rev Neurol** , v. 7(1), p. 31–40. 2011.

WALDAU B, et al. Medial ganglionic eminence derived neural stem cell grafts ease spontaneous seizures and restore GSDNF expression in rat model of chronic temporal lobe epilepsy. **Stem cell**. V. 28(7) p. 1153-1164. 2010.

WESTBROOK G.L. Seizures and Epilepsy. In: KANDEL E.R., SCHWARTZ J.H.,

WIRRELL, E. et al. The epileptic encephalopathies of infancy and childhood. **Can, J. Neurol. Sci.** 32, 409-415.2005.

WHITE, H. S. Clinical significance of animal seizure models and mechanism of action studies of potential antiepileptic drugs. **Epilepsia**, v. 38, p. 9-17, 1997.

WYSS-CORA Y, T. & MUCKE, L. Inflammation in Neurodegenerative Disease -a DoubleEdged Sword. *Neuron* 2002; 35:419-432.

XU, Z., et al. Role of signal transducer and activator of transcription-3 in up-regulation of GFAP after epilepsy. **Neurochem Res**, v.36, p.2208-15,. 2011.

YUHAS Y, WEIZMAN A. & ASHKENAZI S. Bidirectional concentration dependent effect of tumor necrosis factor alpha in shigella dysenteriae-related seizures. **Inf Immun.**, v. 71, v. 2288-2291. 2003.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

ROTEIRO DE PARECER CONSUBSTANCIADO

O projeto de pesquisa INVESTIGAÇÃO DE EFEITO ANTICONVULSIVANTE DA CAULERPINA EM MODELO DE CRISES INDUZIDAS POR PENTILENOTETRAZOL (PTZ) (7/2013) coordenado pelo Professor

Daniel Leite Góes Gitaí do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde / UFAL.

No tópico 3, indica que o protocolo será utilizado para treinamento durante 1 mês.

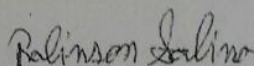
O objetivo desse trabalho é investigar a atividade anticonvulsivante da caulerpina em ratos no modelo de crises (clônicas e tônicas) induzidas por PTZ, por via intravenosa. O PTZ é um modelo experimental tradicionalmente usado para geração de novos fármacos anticonvulsivantes, por apresentar vantagens na utilização de pequeno número de animais, obter resultados mais rapidamente e por ser facilmente reprodutivo, o que o torna um modelo confiável. Comprovando a hipótese do efeito anticonvulsivante da caulerpina, pode-se instituir uma nova e promissora terapia anti-epilética.

Protocolo experimental: Serão utilizados 120 ratos, machos, de 60-90 dias de idade, entre 150-300 g provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), mantidos 22°C, com livre acesso a ração e água.

Devido a solicitação do CONCEA na Orientação técnica 2.2013 será necessário o envio de:

XIII - plantas baixas das áreas e das instalações utilizadas para criação, manutenção, manuseio e manejo de animais para fins de ensino ou pesquisa científica, contendo o detalhamento/dimensionamento das áreas e o registro do Responsável Técnico pela planta (engenheiro ou arquiteto), devidamente assinado;

Situação: Aprovado •


Robinson Sabino da Silva
Coordenador CEUA-UFAL

ANEXO B – Mudança no parecer do Comitê de Ética

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

**DECLARAÇÃO**

Declaramos, em resposta à solicitação do Prof. Daniel Leite Góes Gitaí, de 12.08.2015, na qual requer modificação do item 2 do protocolo 07/2013, referente ao título do projeto, que:

1. Em 2013, foi aprovado o projeto intitulado "Investigação de efeito anticonvulsivante de caulerpina em modelo de crises induzidas por pentilemotetrazol (PTZ)", do professor supracitado.

2. Em 14 de maio de 2014, foi autorizada a alteração da metodologia do referido projeto quando se passou a utilizar ciclo-glicina-prolina (CGP) em modelos de epilepsia induzidas por pilocarpina.

Dessa forma e baseado no histórico do referido projeto e suas tramitações na Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alagoas – CEUA/UFAL, considera-se pertinente a adoção do título "Investigação de efeito anticonvulsivante do ciclo-glicina-prolina (CGP) em modelo de epilepsia induzidas por pilocarpina," para o projeto de nº 07/2013, previamente aprovado em parecer emitido em 14 de maio de 2014.

Maceió, 17 de agosto de 2015.

Profa. Dra. Silvana Ayres Martins
Coordenadora da CEUA/UFAL

Profa. Dra. Silvana Ayres Martins
Coordenadora da Comissão de
Ética no uso de Animais
SIAPE 1120858