



Universidade de Brasília - UnB

Instituto de Ciências Biológicas - IB

Departamento de Ciências Fisiológicas - CFS

Laboratório de Neurofarmacologia

**Avaliação da atividade antiepiléptica de um novo
peptídeo bioinspirado da Occidentalina-1202
isolado da peçonha da vespa social *Polybia
occidentalis***

Maria Varela Torres Quintanilha

Brasília – DF

Março, 2019



Universidade de Brasília - UnB

Instituto de Ciências Biológicas - IB

Departamento de Ciências Fisiológicas - CFS

Laboratório de Neurofarmacologia

Avaliação da atividade antiepiléptica de um novo peptídeo bioinspirado da Occidentalina-1202 isolado da peçonha da vespa social *Polybia occidentalis*

Maria Varela Torres Quintanilha

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Orientadora: Profa Dra Márcia Renata Mortari

Brasília, DF
Março de 2019

Dedicatória

A minha melhor amiga Vívian
E a todas as outras pessoas com
Epilepsia

Agradecimentos

A minha família pelo amor, apoio e por todos os meus sonhos.

A minha orientadora Márcia, por aguentar meus e-mails e ida a sua sala durante um ano para pedir estágio e por fim por me aceitar no Neuropharma Lab. Obrigada pelo acolhimento, ensinamentos e por confiar em mim um projeto de Mestrado. Obrigada pelas histórias e por todas as oportunidades.

A Flávia por me ensinar grande parte do que hoje eu sei de Epilepsia.

A Lilian que sempre me ajudou e esteve presente em cada parte deste trabalho. Obrigada por aguentar meus áudios, por ir para a UnB me ajudar, e por me mandar fotos da pipoca.

A todos os amigos do laboratório que compartilharam comigo esses dois anos. Obrigada a Pri por ser uma irmã mais velha para mim. Obrigada Deia pelas risadas e por ser um exemplo de mulher. Obrigada Kamila, Vic, Luana, Gabriel, Henrique, Matheus, por todas as conversas, ajudas, apoio e por todos os bolos e almoços.

A todo o grupo de pesquisa Neuropep pelo carisma, ensinamentos e amizade.

A Gi e Gabi pela ajuda.

Aos técnicos Adolfo, Danilo e Elias que sempre estiveram dispostos a me ajudar.

Obrigada a todos os trabalhadores do biotério por cuidarem dos animais e por sempre estarem dispostos a ajudar.

Aos seguranças do IB, por sempre me manterem seguras e me acompanharem até meu carro tarde da noite, no natal, no ano novo, sempre com alegria e disposição.

A todos os funcionários que mantêm o departamento e laboratórios limpos, sempre com sorriso no rosto.

Ao moço que vende almoço no IB e ao amarelinho que me salvou do desespero muitas vezes com chocolate.

A secretaria de pós-graduação pelo suporte e disposição.

Aos meus amigos Vick, Clara e Fernando, por me apoiarem durante todos os anos de amizade, em absolutamente tudo.

A todos os professores do IB que me acompanharam desde a graduação fazendo eu me apaixonar ainda mais pela profissão, mostrando que com a educação mudamos a vida de alguém.

Aos professores Doutores Elisabeth, Sebben, Julia e Osmino pela simpatia e conversas durante esses dois anos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal pela oportunidade e auxílios.

A CAPES pelo auxílio financeiro.

A UnB e ao IB por serem minha segunda casa e uns dos lugares que mais amo.

A minha cachorra, Brotueja, pelo amor.

Aos camundongos.



“Deixaria todas as coisas por amor.
Como não posso, deixo amor em todas
as coisas.”

Lista de abreviações

AMPA: alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
ANOVA: Análise de variância
AP: Anteroposterior
CA1-4: Áreas 1 a 4 do Corno de Ammon
CE: Córtex entorrinal
CEUA/IB: Comissão de Ética no Uso Animal do Instituto de Ciências Biológicas
CG: células granulares
CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CRE: Crises recorrentes e espontâneas
DE₅₀: Dose efetiva 50%
DMSO: sulfóxido de dimetilo
DV: Dorsoventral
DZP: Diazepam
EEG: Eletroencefalograma
ELT: Epilepsia do Lobo Temporal
FAE: Fármaco antiepiléptico
GABA: ácido gama-aminobutírico
GD: giro denteado
I.C.V.: Intracerebroventricularmente
I.P.: Intraperitoneal
IBE: *International Bureau of Epilepsy*
ILAE: *International league against Epilepsy*
KA: receptores de glutamato do tipo kainato
MALDI-TOF/TOF: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight/Time Of Flight
ML: Mesolateral
NMDA: N-metil D-Aspartato
OcTx-1202: Occidentalina-1202
PCE: Pessoas com Epilepsia
PTZ: Pentilenotetrazol
SE: *status epilepticus*
SNC: Sistema Nervoso Central
VL: ventrículo lateral cerebral

Lista de figuras

Figura 1. Desenho esquemático das fases do modelo animal de ELT induzido por pilocarpina. O modelo se inicia com o insulto inicial, com a administração do convulsivante e estabelecimento do *Status Epilepticus*. Logo após o sujeito experimental entra na fase latente com a epileptogênese, o que acarreta a fase crônica com crises recorrentes e espontâneas. **-11-**

Figura 2. Implantação de cânula guia no ventrículo lateral direito. (A) Crânio exposto mostrando marcação do Bregma (seta). (B) Camundongo após o procedimento completo com cânula guia e parafuso de apoio implantados. **-17-**

Figura 3. Desenho esquemático ilustrando as fases do protocolo experimental de modelo crônico de Epilepsia do Lobo Temporal induzido quimicamente por pilocarpina. **-22-**

Figura 4. Camundongo recebendo o tratamento com o peptídeo nor-1202 durante a fase crônica do modelo de Epilepsia do Lobo Temporal, via intracerebroventricular por meio de uma microseringa acoplada a bomba de infusão. **-24-**

Figura 5. Camundongos após tratamento na fase crônica do modelo de ELT por pilocarpina tendo seus comportamentos registrados via vídeo durante 10h por dia para observação das crises recorrentes e espontâneas. **-25-**

Figura 6. Exemplo de tecido cerebral com o ventrículo lateral direito completamente infundido pelo corante azul de metileno indicando um correto posicionamento da cânula guia. **-28-**

Figura 7. Porcentagem de proteção do peptídeo nor-1202 infundido via i.c.v. contra crise epiléptica de classe 7 induzida por ácido caínico i.c.v. Todos os dados foram submetidos ao teste do Qui-quadrado seguido pelo pós-teste Fisher.

(**) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo veículo (controle negativo) $p < 0,01$.

(#) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo DZP (controle positivo), $p < 0,05$. **-29-**

Figura 8. Latência em segundos para a primeira crise epiléptica de classe 7 no modelo de ácido caínico. Para os animais que não apresentaram crise máxima foi considerada uma latência de 1800 segundos, indicando que durante todo o período de gravação esse animais não tiveram o comportamento. ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey, $p < 0,05$ e $F(4,29) = 1,818$.

(*) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo veículo (controle negativo) $p < 0,05$.

(#) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo DZP (controle positivo), $p < 0,05$. **-30-**

Figura 9. Porcentagem de sobrevivência dos animais após indução aguda de crises por ácido caínico. Dados submetidos ao teste do Qui-quadrado seguido pelo pós-teste Fisher.

(*) e (**) Diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo veículo (controle negativo) $p < 0,05$ e $p < 0,01$ respectivamente. **-31-**

Figura 10. Latência em segundos para a morte dos animais após indução de crises por ácido caínico. Para os animais que não morreram foi considerada uma latência de 1800 segundos, indicando que os animais sobreviveram durante toda a gravação. ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey, $p < 0,05$ e $F(4,29) = 1,296$.

(**) e (***) Diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo veículo (controle negativo) $p < 0,01$ e $p < 0,001$ respectivamente. **-32-**

Figura 11. Porcentagem de proteção do peptídeo nor-1202 contra crise epiléptica de classe 5 induzida por pilocarpina. Todos os dados foram submetidos ao teste do Qui-quadrado seguido pelo pós-teste Fisher. (A) nor-1202 infundido via i.c.v. (B) nor-1202 injetado via subcutânea. (C) nor-1202 injetado via i.p.

(*), (**) e (***) Diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo veículo (controle negativo) $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$ respectivamente.

(##) e (###) Diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo DZP (controle positivo), $p < 0,01$ e $p < 0,001$ respectivamente. **-33-**

Figura 12. Latência em segundos para a primeira crise epiléptica de classe 5. Para os animais que não apresentaram crise máxima foi considerada uma latência de 1800 segundos, indicando que durante todo o período de gravação esse animais não tiveram o comportamento. (A) nor-1202 infundido via i.c.v. Kruskal-Wallis seguido do pós-teste

de Dunn, $p < 0,05$ [$K = 22,98$]. (B) nor-1202 injetado via subcutânea, ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey, $p < 0,05$ $F(3,28) = 2,942$. (C) nor-1202 injetado via i.p. ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey, $p < 0,05$ $F(2,19) = 3,943$.

(**) e (***) Diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo veículo (controle negativo) $p < 0,01$ e $p < 0,0001$ respectivamente.

(##) e (####) Diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo DZP (controle positivo), $p < 0,01$ e $p < 0,0001$ respectivamente.

(&) Diferenças estatisticamente significativas em relação à dose de $0,3 \mu\text{g}/\text{animal}$, $p < 0,05$. -35-

Figura 13. Porcentagem de sobrevivência dos animais após indução aguda de crises por pilocarpina. Dados submetidos ao teste do Qui-quadrado seguido pelo pós-teste Fisher.

(*) e (**) Diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo veículo (controle negativo) $p < 0,05$ e $p < 0,01$ respectivamente.

(#) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo DZP (controle positivo), $p < 0,05$.

(&) Diferença estatisticamente significativa em relação à dose de $0,3 \mu\text{g}/\text{animal}$, $p < 0,05$.

-36-

Figura 14. Latência em segundos para a morte dos animais após indução de crises por pilocarpina. Para os animais que não morreram foi considerada uma latência de 1800 segundos, indicando que os animais sobreviveram durante toda a gravação. Dados submetidos ao teste Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn, $p < 0,05$. (A) Infusão via i.c.v. [$K = 20,83$]. (B) Administração via subcutânea [$K = 7,188$]. (C) Administração via i.p. [$K = 5,216$].

(*) e (**) Diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo veículo (controle negativo) $p < 0,05$ e $p < 0,01$ respectivamente. -37-

Figura 15. Curva de porcentagem de sobrevivência dos animais após indução de crises epiléticas por pilocarpina ($R^2 = 0,9978$). Regressão não-linear sigmoidal. -38-

Figura 16. Tempo em segundos da somatória das CREs durante o período crônico. Dados submetidos ao teste ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey

[F(2,14) = 4,501; $p < 0,05$]. (*) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo sadio ($p < 0,05$). -39-

Figura 17. Tempo (segundos) de CREs em cada dia do período crônico após tratamento. (A) Dia 1. (B) Dia 2. (C) Dia 3. (D) Dia 4. (E) Dia 5. Dados submetidos ao teste Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn, $p < 0,05$.

(*) e (**) Diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo sadio, $p < 0,05$ e $p < 0,01$ respectivamente. -40-

Figura 18. Duração das CREs (segundos) em cada fase de todo o período crônico. Fase imediata: primeiras cinco horas após o tratamento. Fase tardia: cinco horas restantes de observação. (A) Dia 1 fase imediata, Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn, $p < 0,05$. (B) Dia 1 fase tardia, Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn, $p < 0,05$. (C) Dia 2 fase imediata, ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de *Tukey* [F(2,14) = 2,657; $p < 0,05$]. (D) Dia 2 fase tardia, Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn, $p < 0,05$. (E) Dia 3 imediata, ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de *Tukey* [F(2,14) = 2,066; $p < 0,05$]. (F) Dia 3 tardia, ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de *Tukey* [F(2,14) = 7,998; $p < 0,05$]. (G) Dia 4 imediata, Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn, $p < 0,05$. (H) Dia 4 tardia, Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn, $p < 0,05$. (I) Dia 5 imediata, ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de *Tukey* [F(2,14) = 1,541; $p < 0,05$]. (J) Dia 5 tardia, Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn, $p < 0,05$.

(*) e (**) Diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo sadio, $p < 0,05$ e $p < 0,01$ respectivamente. -41-

Figura 19. Número total de CREs durante os cinco dias do período crônico. Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn, sendo considerado $p < 0,05$.

(*) Diferença estatisticamente significativas em relação ao grupo sadio, $p < 0,05$. -42-

Figura 20. Número de CREs em cada dia do período crônico após tratamento. (A) Dia 1. (B) Dia 2. (C) Dia 3. (D) Dia 4. (E) Dia 5. Dados submetidos ao teste Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn, $p < 0,05$.

(*) Diferença estatisticamente significativas em relação ao grupo sadio, $p < 0,05$. -43-

Figura 21. Número de CREs em cada fase de todo o período crônico. Fase imediata: primeiras cinco horas após o tratamento. Fase tardia: cinco horas restantes de observação.

(A) Dia 1 fase imediata, ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de *Tukey* [$F(2,14) = 1,740$; $p < 0,05$]. (B) Dia 1 fase tardia, Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn, $p < 0,05$. (C) Dia 2 fase imediata, Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn, $p < 0,05$. (D) Dia 2 fase tardia, ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de *Tukey* [$F(2,14) = 2,129$; $p < 0,05$]. (E) Dia 3 imediata, Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn, $p < 0,05$. (F) Dia 3 tardia, Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn, $p < 0,05$. (G) ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de *Tukey* [$F(2,14) = 2,016$; $p < 0,05$]. (H) Dia 4 tardia, ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de *Tukey* [$F(2,14) = 1,164$; $p < 0,05$]. (I) Dia 5 imediata, Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn, $p < 0,05$. (J) Dia 5 tardia, Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn, $p < 0,05$.

(*) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo sadio, $p < 0,05$. **-45-**

Lista de tabelas

Tabela 1. Relação da terceira geração dos Fármacos antiepiléticos, indicando o mecanismo de ação e os efeitos adversos. **-7-**

Tabela 2. Classificação das crises límbicas induzidas por pilocarpina baseada no índice de Racine (1972), modificado por Shibley e Smith (2002) (modificado). **-21-**

Tabela 3. Classificação de crises epiléticas, segundo o índice de Racine (1971), modificado por Pinel & Rovner (1978). **-21-**

RESUMO

Quintanilha, MVT. **Avaliação da atividade antiepiléptica de um novo peptídeo bioinspirado da Occidentalina-1202 isolado da peçonha da vespa social *Polybia occidentalis***. Dissertação de mestrado – Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, 2019.

Epilepsia se refere a um conjunto de doenças caracterizadas pela atividade excessiva dos neurônios, que geram descargas elétricas hipersincronizadas. É uma das doenças neurológicas mais prevalentes no mundo, gerando uma necessidade de investimentos em tratamentos. Os fármacos antiepilépticos são comumente associados a efeitos colaterais e são ineficientes no controle de crises em cerca de 70% em pacientes com Epilepsia do Lobo Temporal (ELT). Pesquisas demonstraram que um peptídeo isolado da vespa *Polybia occidentalis*, denominado Occidentalina-1202 foi capaz de proteger ratos *Wistar* contra crises induzidas quimicamente. Com base nisso o objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade antiepiléptica de um novo peptídeo bioinspirado da Occidentalina-1202 (administrado em diferenças vias) em modelos agudos de crises induzidas por convulsivantes químicos, calcular sua DE₅₀ e avaliar no modelo crônico de ELT. O peptídeo Nor-1202 foi administrado em camundongos *Swiss* machos via intracerebroventricular (i.c.v.) (6; 3 ou 0,3 µg/animal), subcutânea (8 e 4 mg/kg) e intraperitoneal (i.p.) (8 mg/kg). Para a administração i.c.v. os animais foram submetidos a um procedimento para implantação de uma cânula no ventrículo lateral (VL). Uma vez administrado o peptídeo, foram administrados nos camundongos, a pilocarpina (250 mg/kg i.p.) ou o ácido caínico (1,25 µg/animal i.c.v.) e os animais tiveram seus comportamentos filmados por 30 min. No modelo do ácido caínico o peptídeo só foi avaliado via i.c.v. O grupo controle negativo foi infundido com solução salina 0,9% e o grupo controle positivo foi tratado com Diazepam (4 mg/kg) para ambos os convulsivantes. O modelo crônico de ELT foi induzido por pilocarpina (210 mg/kg i.p.), os camundongos tiveram *Status Epilepticus* (SE) (fase aguda do modelo) e 10 dias após o SE os animais tiveram cânulas implantadas no VL. Do dia 15 ao dia 20 do modelo (fase crônica) foram tratados diariamente com Nor-1202 (i.c.v.) ou solução salina 0,9% (grupo epilético) contra as crises recorrentes e espontâneas (CRE) e filmados por 10hrs. No modelo agudo de pilocarpina o peptídeo (i.c.v.) protegeu os animais contra a crise generalizada e contra óbito, porém não teve atividade contra as crises quando injetado sistemicamente (i.p. e subcutânea). No modelo do ácido caínico, o peptídeo (i.c.v.) não protegeu os animais contra a crise generalizada, porém aumentou a % de sobrevivência destes. Quando avaliada no modelo crônico de ELT, a DE₅₀ do Nor-1202 não foi diferente estatisticamente do grupo epilético e nem do grupo sadio (animais que não foram submetidos ao SE), em relação ao tempo que os camundongos passaram tendo CREs durante os cinco dias de tratamento. Mostrando um efeito intermediário. Quanto ao número de CREs durante a fase de tratamento crônica, o grupo tratado com o Nor-1202 teve significativamente mais crises do que o grupo sadio no dia 2 do tratamento. Nos outros quatro dias o peptídeo também não apresentou diferenças em relação ao grupo sadio nem ao grupo doente. Os resultados indicam que o peptídeo tem um efeito antiepiléptico contra crises induzidas por pilocarpina, porém não tem ação no sistema nervoso central quando injetado sistemicamente. Além disso mais estudos são necessários para uma melhor avaliação do Nor-1202 no modelo de ELT, com maiores doses sendo avaliadas.

Palavras-chave: Epilepsia do Lobo Temporal, peptídeo antiepiléptico, Occidentalina-1202, pilocarpina, ácido caínico.

Abstract

Quintanilha, MVT. **Antiepileptic evaluation of a new a bioinspired peptide in Occidentalina-1202 from the venom of the wasp *Polybia occidentalis***. Master dissertation – Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, 2019.

Epilepsy refers to a set of neurological diseases characterized by excessive activity of neurons which generate hypersynchronized electrical discharges. It is one of the most prevalent neurological diseases in the world, generating a need for investments in treatments. Antiepileptic drugs are commonly associated with side effects, and are ineffective in seizure control in about 70% of patients with Temporal Lobe Epilepsy (TLE). Research has shown that a peptide found in venom from *Polybia occidentalis*, denominated Occidentalina-1202, was able to protect *Wistar* rats from chemically induced seizures. Therefore the purpose of this study was to evaluate the antiepileptic activity of Nor-1202 (a new bioinspired peptide in Occidentalina-1202) in acute models of epileptic seizures induced by pilocarpine and kainic acid, thus to define EC₅₀ and evaluate the effectiveness of the peptide in a chronic model of TLE induced by pilocarpine. Swiss mice received i.c.v. administration of the peptide (6; 3 ou 0.3 µg/animal) or subcutaneous administration (8 e 4 mg/kg) or i.p. (8 mg/kg). For i.c.v. administration a stereotaxic procedure was performed to implant a guide cannula in the lateral ventricle. Prior to the injection of pilocarpine (250 mg/kg i.p.) or kainic acid (1,25 µg/animal i.c.v.), the administration of Nor-1202 or vehicle solution was performed. Then, the mices had their behaviors filmed for 30 min. In the kainic acid model the peptide was only evaluated via i.c.v. The positive control animals received a prior treatment with Diazepam (4 mg/kg i.p.) in the two acute models. The chronic model of TLE was induced by pilocarpine (210 mg/kg i.p.), mices manifested signs of *Status Epilepticus* (SE) for three hours (acute period of the model) and 10 days later stereotaxic procedure was performed to implant a guide cannula in the lateral ventricle. During chronic period (15 to 20 days) treatment against spontaneous recurrent seizures (SRS) was carried out during five consecutive days by i.c.v. injections with vehicle solution or Nor-1202. During this period, behavioral and SRS were monitored by video recording. In the acute model of seizures induced by pilocarpine, Nor-1202 (i.c.v.) protected the animals against generalized seizures and death, but did not have antiepileptic activity when systemically injected. In the kainic acid model of seizures, the peptide did not protected the animals against generalized seizures but increased the % of survival. When evaluated in the chronic model of TLE, the ED₅₀ of Nor-1202 was not statistically different from the epileptic group nor from the healthy group (animals that were not submitted to SE), in relation to the time the mice spent having SRS during the five days of treatment. Showing an intermediate effect. As for the number of SRS during the chronic treatment, the group treated with Nor-1202 had significantly more seizures than the healthy group at day 2 of treatment. In the other four days, the peptide did not present differences either in relation to the healthy group nor to the epileptic group. The results indicate that the peptide has an antiepileptic effect against pilocarpine-induced seizures, but has no central nervous system action when systemically injected. In addition, more studies are needed to better evaluate the effectiveness of Nor-1202 in the TLE model, with higher doses being evaluated.

Keywords: Temporal Lobe Epilepsy, antiepileptic peptide, Occidentalina-1202, pilocarpine, kainic acid.

Sumário

1. Introdução	1
1.1 Epilepsia	1
1.2 Farmacoterapia da Epilepsia	4
1.3 Epilepsia do Lobo Temporal	8
1.4 Modelos Animais de ELT	9
1.5 Peptídeos como potenciais novos tratamentos	12
2. Objetivos	15
2.1. Objetivo Geral	15
2.2. Objetivos Específicos	15
3. Material e Métodos	16
3.1 Peptídeo	16
3.2 Sujeitos Experimentais	16
3.3 Procedimento cirúrgico de implantação da cânula-guia	17
3.4 Modelos agudos de indução de crises epiléticas	18
3.4.1 Indução de crises por ácido caínico	18
3.4.2 Indução de crises por pilocarpina	19
3.4.3 Avaliação comportamental das crises epiléticas	20
3.5 Modelo Crônico de ELT	22
3.5.1 Indução de <i>Status Epilepticus</i>	22
3.5.2. Tratamento e monitoramento das CRE	23
3.5.3. Quantificação das CRE	25
3.5.4. Grupos experimentais	26
3.6 Análise do posicionamento da cânula	26
3.7 Análises Estatísticas	26
4. Resultados	28
4.1 Análise da posição das cânulas guias	28
4.2 Modelo agudo de crises induzido por ácido caínico	28
4.2.1 Proteção contra crise máxima	28
4.2.2 Latência para primeira crise máxima	29
4.2.3. Porcentagem de sobrevivência dos animais	30
4.2.4 Latência para a morte	31
4.3 Modelo agudo de indução de crises por pilocarpina	32

4.3.1	Proteção contra crise máxima	32
4.3.2	Latência para primeira crise máxima	34
4.3.3.	Porcentagem de sobrevivência dos animais	35
4.3.4.	Latência para morte	37
4.4.	Cálculo da DE ₅₀	38
4.5.	Avaliação da atividade antiepiléptica no modelo de ELT	39
4.5.1.	Tempo de CRE	39
4.5.2.	Número de CRE	42
5.	Discussão	46
6.	Conclusões	54
7.	Referências Bibliográficas	55
8.	Anexos	64

1. Introdução

1.1 Epilepsia

O termo Epilepsia não se refere a uma doença única, mas sim a um complexo espectro de doenças neurológicas, diversificadas tanto etiológica quanto clinicamente (Casillas-Espinosa, 2012). De modo convergente, todas são caracterizadas pela atividade excessiva dos neurônios e dos circuitos cerebrais, capazes de gerar descargas elétricas temporariamente hipersincronizadas, provocadas em sua maioria, pelo desequilíbrio entre estímulos excitatórios (mediados principalmente pelo neurotransmissor glutamato) e inibitórios (mediados pelo neurotransmissor ácido gama-aminobutírico - GABA) em áreas específicas do córtex (Hu *et al.*, 2007; Pearson-Smith *et al.*, 2017).

Esse desbalanço causa um distúrbio em toda a atividade cerebral, podendo gerar crises focais ou generalizadas, essas últimas acompanhadas por perda de consciência, observada em crises tônico-clônicas ou de ausência (Boer *et al.*, 2008). Essas manifestações clínicas da Epilepsia, as crises epiléticas, antigamente denominadas crises convulsivas, são definidas como uma “ocorrência transitória de sinais e/ou sintomas devido à atividade neuronal anormal, excessiva ou síncrona do cérebro” (Fisher *et al.*, 2005).

A Liga Internacional Contra Epilepsia (ILAE – *International league against Epilepsy*) contém um grupo de especialistas responsáveis por revisar a classificação dos termos referentes à doença desde 1981. Estas classificações permitem abordagens terapêuticas específicas para diferentes pacientes, dando assim, mais fundamento tanto para a pesquisa básica como para a clínica.

Desde 2005, a Epilepsia tem sido definida como “uma predisposição persistente do encéfalo em gerar crises epiléticas e todas as consequências neurobiológicas, cognitivas, psicológicas e sociais para o paciente” (Fisher *et al.*, 2005). Sendo diagnosticada quando ocorrem duas ou mais crises não induzidas (sem a existência de um fator transitório que abaixe o limiar de um cérebro normal para a ocorrência de uma crise) com um espaço de tempo de 24 horas entre elas. Porém, essa definição é inadequada em alguns casos, então, atualmente também se denomina que um paciente tem Epilepsia depois de uma crise não provocada com dados clínicos adicionais que sugerem uma tendência patológica a um alto risco de futuras crises recorrentes, como

por exemplo padrões epileptiformes no Eletroencefalograma (EEG) (Fisher *et al.*, 2014; LaPenna & Tormoehlen, 2017).

As descargas neuronais quando originadas em um conjunto de neurônios, limitadas a um hemisfério cerebral, são denominadas crises focais, por terem um foco específico. As crises generalizadas são aquelas que mostram uma distribuição bilateral, incluindo estruturas corticais e subcorticais simultaneamente nos dois hemisférios, mas não necessariamente incluindo o córtex inteiro (Berg *et al.*, 2010; Berg & Scheffer, 2011). Essa classificação das crises é importante uma vez que um fármaco antiepiléptico (FAE) pode ser benéfico em um certo tipo de crise mas prejudicial em outro (LaPenna & Tormoehlen, 2017) e se evita uma prescrição errônea para os pacientes. Assim, o diagnóstico da Epilepsia inicia-se com a caracterização do tipo de crise e, após o acréscimo de informações eletroclínicas, o tipo de Epilepsia pode ser definido como focal, generalizada, uma combinação das duas ou ser denominada como desconhecida, quando não foi possível identificar a existência de um foco específico ou geral (Oyrer *et al.*, 2017).

Antes, a Epilepsia era interpretada como uma desordem cerebral mas, recentemente, a ILAE e a *International Bureau of Epilepsy* (IBE) revisaram o termo e sugeriram que a Epilepsia pare de ser denominada como uma desordem, e passe a ser definida como uma doença. O termo desordem traz a idéia de uma condição não necessariamente duradoura, já uma doença pode causar uma perturbação duradoura ou até permanente na função cerebral. Além disso, popularmente o termo desordem não era bem compreendido, e muitas vezes a Epilepsia não era entendida como um quadro médico realmente sério, já o termo doença causa mais impacto social, podendo ajudar na conscientização popular sobre a importância e necessidade de intervenções (Fisher *et al.*, 2014).

Em 2017, a ILAE definiu que existem grupos para se classificar etiologicamente os tipos de Epilepsia: estrutural, genético, infeccioso, metabólico, imune e desconhecida, sendo que um paciente pode estar enquadrado em mais de um grupo (Falco-Walter *et al.*, 2017). A causa estrutural se refere a anormalidades estruturais que são visíveis em ensaios eletroclínicos e de neuroimagem originadas por um trauma cerebral ou eventos genéticos, como malformações. A causa genética é resultado direto de uma mutação genética em um gene conhecido ou previsto, podendo acarretar em anormalidades em canais iônicos cerebrais, afetando a transmissão sináptica. No grupo infeccioso, o mais comum dentre as causas conhecidas, a rede neural se torna epiléptica com crises recorrentes como resultado de uma infecção prévia, e não quando o paciente tem crises provocadas por uma infecção aguda. Metabólica ocorre devido a

um distúrbio metabólico conhecido ou previsto. A imune como resultado direto de uma doença auto-imune (Falco-Walter *et al.*, 2017; Scheffer *et al.*, 2017). Porém, cerca de 60% dos pacientes tem a etiologia da Epilepsia desconhecida (Hauser *et al.*, 2017).

A Epilepsia é uma das doenças neurológicas mais prevalentes no mundo, com aproximadamente 1% da população afetada (~50 milhões de pessoas), com sua prevalência variando substancialmente entre países desenvolvidos e em desenvolvimento (Beghi, 2016). Gerando, assim, uma necessidade de intervenções e investimentos em tratamentos que garantam aos pacientes o controle das crises epiléticas, permitindo uma melhor qualidade de vida (Gao *et al.*, 2015). Além do seu grande impacto econômico, com um custo estimado de 15,5 bilhões de dólares anuais só nos EUA (Bernstein *et al.*, 2010), existe um grande impacto social na vida das pessoas com Epilepsia (PCE), uma vez que, a Epilepsia é uma condição crônica, socialmente impactante, com grandes consequências na vida dos pacientes impondo limitações reais no desempenho de suas atividades (Mameniskiene *et al.*, 2015).

Estudos demonstram que existe um aumento do risco de ocorrência de comprometimentos cognitivos em PCE, como déficits de memória e atenção, além de distúrbios psiquiátricos, sociais e comportamentais, como por exemplo impulsividade, irritabilidade, comportamentos agressivos e uma maior incidência de doenças como depressão e distúrbios de ansiedade (Brodie *et al.*, 2016). Nesse grupo de pacientes, o risco de suicídio também é aumentado, sendo de quatro a cinco vezes maior em pacientes com Epilepsia (Strine *et al.*, 2005; Kotwas *et al.*, 2017). Tais distúrbios podem ocorrer em decorrência do dano cerebral causado pelas crises epiléticas ou de efeitos colaterais do tratamento da Epilepsia, os quais os FAEs são comumente associados (Radzik *et al.*, 2015).

Além de diversos distúrbios fisiológicos e das crises epiléticas muitas vezes não controladas, a Epilepsia acarreta profundas consequências sociais e psicológicas nos pacientes. Assim, é muitas vezes vista como um fardo na vida destes, já que é uma doença estigmatizada e marginalizada na sociedade, levando a desafios constantes como alto custo de vida, comprometimentos que afetam atividades diárias, como restrições para dirigir e limitações de empregos para PCE (Seidenberg *et al.*, 2007; Boer *et al.*, 2008; Taylor *et al.*, 2011). Desta forma, é necessária uma mudança de políticas públicas em todo o mundo para que se conheça mais sobre a doença e assim se reduza o estigma associado a esta. Uma pesquisa feita em 2010, na Itália, mostrou que dos entrevistados 56,6% conheciam alguém com Epilepsia, 56,1% pensavam que se tratava de uma doença psicológica ou psiquiátrica, 36,5% que era uma forma de insanidade do paciente e 4,1% de que se tratava de possessões de maus espíritos. Ditos dados

demonstram que não só em países em desenvolvimento que se faz necessário maior investimento e divulgação da seriedade e bases clínicas da doença (Dalic & Cook, 2016).

1.2 Farmacoterapia da Epilepsia

Antigamente, os tratamentos da Epilepsia eram empíricos e supersticiosos, incluindo prescrições de dietas, plantas medicinais e, em casos extremos, procedimentos cirúrgicos para retirada dos possíveis focos epiléticos (Gross, 1992). Mesmo com a introdução de vários FAEs na terapêutica e com o avanço da Neurociência, o tratamento de Epilepsias mais resistentes ainda é dividido nas categorias: farmacoterapia, tratamentos alternativos (dietas), neuroestimulação e neurocirurgia. Vale ressaltar que a evolução do EEG e novos ensaios de neuroimagem, tornou possível a identificação dos focos epiléticos dos pacientes e o refinamento dos procedimentos cirúrgicos para retirada das regiões desejadas com menores impactos (Asadi-Pooya & Rostami, 2017).

Cerca de 50% das PCE não se tornam livres de crises em suas primeiras terapias com FAEs, e assim, uma parte dos pacientes é encaminhada para terapias combinadas de fármacos, mas muitos destes (~30%) continuam refratários aos FAEs atuais (Sharma *et al.*, 2017; Oyrer *et al.*, 2017). Um paciente é classificado com Epilepsia fármaco-resistente quando já foram utilizados dois FAEs escolhidos adequadamente, em monoterapia ou combinados e, estes, foram ineficientes no controle das crises epiléticas. Afinal, evidências clínicas mostram que pacientes que não responderam a dois FAEs têm apenas uma pequena chance de obterem controle de suas crises com FAEs adicionais (Kwan *et al.*, 2010). O FAE tem que ser utilizado por um período de tempo adequado, ser selecionado apropriadamente levando em consideração o tipo de crise/Epilepsia do paciente e prescrito em uma dose adequada. A Epilepsia só é considerada resolvida em duas situações: em pacientes com síndromes epiléticas idade-dependente que já passaram da idade aplicável ou pacientes que estão livres de crises a mais de 10 anos e não usam FAEs há mais de cinco anos (Fisher *et al.*, 2014).

O mecanismo da farmacoresistência dos FAEs não é totalmente compreendido, e não tem sido elucidado o motivo desta se desenvolver em alguns pacientes e não em outros, mas sabe-se que essa resistência é multifatorial, envolvendo fatores genéticos e ambientais. As causas moleculares, como mecanismos epigenéticos, ainda são pouco conhecidas, e por conta disto, tratamentos mais eficazes ainda estão indisponíveis (Hauser *et al.*, 2017).

Nos últimos 30 anos, uma série de novos FAEs foram desenvolvidos, com mecanismos de ação que atenuam a neurotransmissão excitatória (bloqueando canais de sódio ou cálcio dependentes de voltagem e vias glutamatérgicas) ou aumentam a inibição (via GABA), porém em uma grande parcela dos pacientes os fármacos não conseguem controlar totalmente as crises (Simonato *et al.*, 2017). O que se observa é que os fármacos atuais aumentam o tempo que os pacientes ficam sem crises, diminuindo a frequência de crises diárias, ou fazendo com que alguns indivíduos tenham intervalos de anos entre os episódios de crise (Dalic & Cook, 2016; Hu *et al.*, 2007). Mas, apesar das suas disponibilidades, os FAEs fornecem apenas tratamento sintomático e não previnem a progressão da doença, além de serem comumente associados a efeitos adversos, que podem variar em frequência e gravidade, fazendo com que o paciente escolha entre conviver com as crises ou ter uma vida com os efeitos negativos dos fármacos (Macleod & Appleton, 2004; Hauser *et al.*, 2017).

Os tratamentos farmacológicos para a Epilepsia se iniciaram em 1857 com o uso de brometo de potássio, que hiperpolariza a membrana neuronal, equilibrando as correntes sinápticas excitatórias anormais. Observou-se que o brometo reduzia as frequências das crises em pacientes epiléticos e, assim, os pesquisadores começaram a fazer combinações dele com outros compostos como *Borax Belladonna*, afim de aumentar a eficácia farmacológica. Porém, estes pacientes descreveram sofrer com efeitos colaterais como dores de cabeça, cansaço excessivo, delírios, perda de apetite, entre outros (Krall *et al.*, 1978). Por conta desses efeitos adversos, pesquisas com novos fármacos se fazem necessárias até os dias atuais. Atualmente, três técnicas são utilizadas para o desenvolvimento desses fármacos: 1) modificações químicas/estruturais de fármacos já existentes, afim de se obter uma eficácia maior ou menos efeitos adversos; 2) *Screening* de novas substâncias com potencial antiepilético, em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*; 3) Uso de compostos que agem em processos subjacentes às atividades de crises cerebrais, inibindo seletivamente a excitação ou aumentando a neurotransmissão inibitória (Łuszczki, 2009).

Hoje, existem três gerações de FAEs, que são divididas temporalmente. A primeira geração de FAEs surgiu após o brometo de potássio, e teve seu próximo fármaco disponível em 1912, o fenobarbital, composto que aumenta a inibição sináptica mediada pelo GABA, se ligando a receptores do tipo GABA-A e prolongando sua abertura. Ele já existia no mercado como um sedativo e se mostrou menos tóxico que o brometo de potássio em PCE, contudo, pacientes também mostraram efeitos adversos, como depressão, hiperatividade e até complicações respiratórias. O fenobarbital é um dos FAEs mais prescrito até hoje, principalmente por conta de seu baixo custo. Esta

geração de FAEs inclui também outros fármacos desenvolvidos até os anos 1970s: primidona, fenitoína, etosuximida, ácido valproico, entre outros, com mecanismos diversos como inibição de canais de sódio, antagonismo de receptores do tipo NMDA (N-metil D-Aspartato), potencialização da transmissão mediada por GABA, entre outros. A segunda geração abrange os benzodiazepínicos, a carbamazepina, felbamato, gabapentina e outros. Era esperado que esses fármacos tivessem uma farmacocinética mais favorável em comparação com os da primeira geração, porém nem todos conseguiram sucesso, e continuam sendo limitados aos efeitos negativos, como comprometimento motor em alguns casos. A terceira geração dos FAEs começou em 2008 com a aprovação da lacosamida e alguns de seus outros representantes incluem: vigabatrina, clobazam, rufinamida, acetato de eslicarbazepina, brivaracetam (LaPenna & Tormoehlen, 2017; Abou-Khalil, 2016) (Tabela 1). Vale a pena ressaltar que a nova geração de FAEs não está isenta de efeitos adversos, porém eles se mostram mais toleráveis do que os das gerações anteriores (French & Gazzola, 2011). Assim, faz-se necessário novos fármacos antiepiléticos com maior eficácia e menos efeitos adversos para a melhoria da qualidade de vida das PCE.

Tabela 1. Relação da terceira geração dos Fármacos antiepiléticos, indicando o mecanismo de ação e os efeitos adversos.

Fármaco	Mecanismo de ação	Indicação	Efeitos adversos
Lacosamida (2008)	Aumenta a inativação lenta de canais de sódio dependentes de voltagem	Crises focais, generalizadas e síndrome de Lennox-Gastaut	Tontura, dor de cabeça, diplopia, náusea e vômito
Rufinamida (2008)	Prolonga a inativação de canais de sódio dependentes de voltagem	Crises focais e síndrome de Lennox-Gastaut	Sonolência, tontura, fadiga, dor de cabeça, vômitos, náusea, tremor, diminuição do apetite, constipação
Estiripentol (2008)	Modulação de receptores GABA-A	Crises refretárias associadas à síndrome de Dravet	Sonolência, lentidão da função mental, ataxia, diplopia, perda de apetite, náusea e dor abdominal
Vigabatrina (2009)	Potencialização de receptores GABA	Crises focais refratárias e espasmos infantis	Sonolência, fadiga, tontura, depressão, psicoses, hepatite, comprometimento respiratório, vertigem
Clobazam (2011)	Potencialização de receptores GABA	Crises focais, generalizadas e síndrome de Lennox-Gastaut	Sonolência, alterações comportamentais e de humor, hiperexcitabilidade psicomotora, ataxia e infecção do trato respiratório
Retigabina (2011)	Abertura de canais de potássio dependentes de voltagem	Crises focais	Sonolência, tontura, ataxia, parestesia, amnésia, visão turva, náusea, infecção do trato urinário, alucinações, ansiedade
Perampanel (2012)	Antagonista de receptores de glutamato do tipo AMPA	Crises focais e generalizadas tônico-clônicas	Sonolência, tontura, dor de cabeça, fadiga, irritabilidade, ideação suicida
Acetato de eslicarbazepina (2013)	Bloqueia canais de sódio dependentes de voltagem	Crises focais	Tontura, visão turva, náuseas e vômitos, ataxia, dor de cabeça, sonolência e fadiga, problemas hepáticos
Brivaracetam (2013)	Inibe liberação pré-sináptica de neurotransmissores excitatórios	Crises focais	Sonolência, dor de cabeça, tontura e fadiga

(Referências: Younus & Reddy, 2017; LaPenna & Tormoehlen, 2017; Nickles & Wirrell, 2017; Campos et al., 2018.)

1.3 Epilepsia do Lobo Temporal

Entre os pacientes adultos com Epilepsia fármaco-resistente, a principal característica comum é a presença de um foco epiléptico no lobo temporal (Bora & Meletti, 2016). A Epilepsia do Lobo Temporal (ELT), assim denominada em decorrências das crises originarem-se em estruturas mesiais do lobo temporal, especialmente a formação hipocampal (Andersen *et al.*, 2006), é a de maior relevância clínica, principalmente devido à sua gravidade e à alta porcentagem de pacientes resistentes aos FAE disponíveis (White & Löscher, 2014).

Neste tipo de Epilepsia fármaco-resistente, geralmente, as crises não ocorrem naturalmente desde o nascimento do paciente, elas começam a se desenvolver em fases tardia da vida em decorrência à um insulto inicial em estruturas do lobo temporal. Este insulto ocorre no tecido cerebral antes de que os sinais da ELT se tornem evidentes, existindo um período latente entre o dano cerebral e o aparecimento de crises recorrentes não provocadas nos pacientes (Minjarez *et al.*, 2017). Por isso, a ELT pode ser considerada nestes casos como uma forma adquirida de Epilepsia, com suas crises sendo resultado de uma reorganização dos circuitos neuroniais durante o período latente por consequência de lesões, tumores ou infecções do Sistema Nervoso Central (SNC), ou até doenças cerebrovasculares (Annegers & Hauser, 1996). Esse processo de reorganização dos circuitos após um insulto que acaba por gerar as crises recorrentes e espontâneas (CRE) nos indivíduos com ELT é chamado de epileptogênese. Segundo a ILAE, a epileptogênese se estende desde o momento do insulto, que faz com que se tenham mudanças celulares e moleculares da estrutura e função cerebral, levando a uma diminuição do limiar para crises e, assim, causando hiperexcitabilidade, até o surgimento das CREs (Sharma *et al.*, 2017).

Na ELT, o processo de epileptogênese faz com que as CREs ocorram principalmente na formação hipocampal, que recebe aferências indiretas de todo o córtex cerebral, é parte do sistema límbico e é composta pelo hipocampo, o córtex adjacente à este, córtex entorrinal (CE), o complexo subicular e o giro denteado (GD). O hipocampo propriamente dito é localizado entre o GD e o complexo subicular, e é subdivido nas camadas CA1-4 em humanos. O GD é composto por três camadas, a camada que contém os dendritos das células granulares (CG), células excitatórias mais presentes no GD, que projetam seus axônios para a camada CA3 do hipocampo. Segue-se a camada na qual estão localizados os corpos celulares das CG, e a última camada com vários tipos celulares, principalmente neurônios glutamatérgicos e interneurônios inibitórios GABAérgicos. Na principal via de entrada de informações na formação hipocampal, a perfurante, as CG recebem aferências excitatórias do CE, e

projetam seus axônios (as fibras musgosas) para a camada CA3 do hipocampo. Os axônios das células da CA3, denominados colaterais de *Schaeffer*, se projetam ipsilateralmente para a neurônios piramidais da camada CA1, que através do complexo subicular, encaminha a informação para o CE, que se conecta com áreas corticais e subcorticais. O GD limita a quantidade de transmissões excitatórias que vão do CE para o hipocampo através de interneurônios inibitórios GABAérgicos, assim, evitando uma hiperexcitação no circuito, o que não se observa em modelos animais e pacientes com ELT (Kiernan, 2012; Navidhamidi *et al.*, 2017).

Alterações neuropatológicas em pacientes com ELT podem ser consequências das CREs ou resultado direto do dano cerebral inicial que levou às crises. Essas alterações são associadas a mudanças na formação hipocampal, incluindo diminuição do seu tamanho, com perda neuronal e lesões. Esse quadro é denominado esclerose hipocampal, caracterizada por uma grande perda de neurônios piramidais, chegando em até 80% de perda de neurônios na CA1, e em quantidades menores, porém também prejudiciais nas outras camadas (O'Dell *et al.*, 2012). Acompanhando a esclerose hipocampal, outras anomalias histológicas presentes nos indivíduos com ELT são brotamentos das fibras musgosas no GD, gliose hipocampal, dispersão de CG em locais anormais, causando uma reorganização no circuito neuronal. Os axônios das CG, as fibras musgosas, se reorganizam e brotam para formarem novas conexões sinápticas com interneurônios ou outras CG, esses brotamentos causam, entre outras coisas, conectividade anormal entre as camadas do GD, maior conexão entre o GD e o hipocampo, levando a uma hiperexcitabilidade (Cavazos & Cross, 2006; Thom, 2014).

1.4 Modelos Animais de ELT

Para o estudo da ELT em modelos animais, um insulto mimetiza o dano cerebral dos pacientes, o que inicia um período latente onde ocorrem cascatas de eventos e mudanças estruturais no circuito cerebral, caracterizando a epileptogênese, e então o aparecimento das CREs, resultando em uma condição crônica de crises não provocadas (Sloviter & Bumanglag, 2012). Cada modelo mimetiza algum aspecto da Epilepsia, e todos são úteis para a investigação dos mecanismos complexos de epileptogênese e a geração das CREs, assim como o estudo da farmacoresistência e de potenciais tratamentos (Bielefeld *et al.*, 2017). Diversos protocolos existem para causar o dano no tecido e simular o insulto inicial (para revisão, ver Nirwan *et al.*, 2018) como crises induzidas por febre, *kindling* elétrico e administração de convulsivantes químicos, dentre estes, os mais utilizados são a pilocarpina e o ácido caínico (Lopes-Aguiar, 2014).

A pilocarpina é um potente agonista muscarínico colinérgico muito utilizado em estudos que mimetizam uma condição crônica de ELT, e quando administrada nos animais acarreta uma progressão de alterações histopatológicas e comportamentais de crise, assim como mudanças eletroencefalográficas, semelhantes aos quadros de ELT em humanos (Turski *et al.*, 1983; Curia *et al.*, 2008; Minjarez *et al.*, 2017) (Figura 1).

Existe uma grande demanda de modelos animais adequados que mimetizam o complexo quadro que é a Epilepsia em humanos, e cada vez mais modelos crônicos da doença estão sendo recomendados em pesquisas de *screening* de novos FAEs (Lidster *et al.*, 2016).

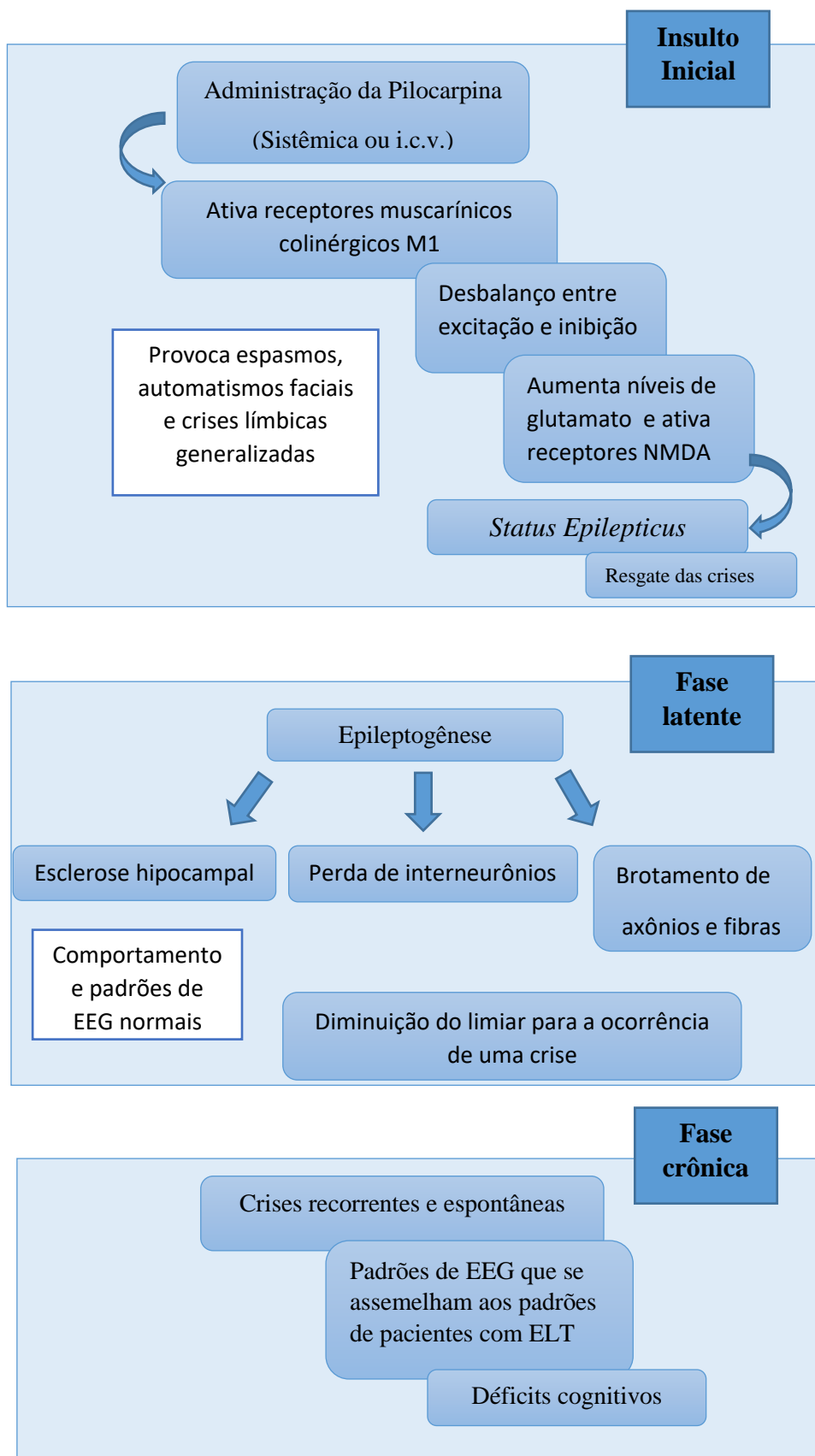


Figura 1. Desenho esquemático das fases do modelo animal de ELT induzido por pilocarpina. O modelo se inicia com o insulto inicial, com a administração do convulsivante e estabelecimento do *Status Epilepticus*. Logo após o sujeito experimental entra na fase latente com a epileptogênese, o que acarreta a fase crônica com crises recorrentes e espontâneas.

1.5 Peptídeos como potenciais novos tratamentos

Com base nas restrições e falhas no tratamento descritas anteriormente, há uma grande demanda para o desenvolvimento de novos FAEs mais efetivos, uma vez que ainda não foi possível a oferta de novos compostos com alta eficácia para a ELT (Bialer & White, 2010), que possam ser capazes de diminuir a excitação e aumentar a inibição neuronal (Radzik *et al.*, 2015) e uma abordagem mais focada para o tratamento de Epilepsias fármaco-resistentes (Kwan *et al.*, 2011).

Existem vários estudos com neuropeptídeos endógenos com ação antiepiléptica, além de seus análogos, que mostram uma maior afinidade com o receptor alvo, e por causa da habilidade destes compostos em suprimir circuitos excitatórios do cérebro, eles são uma estratégia interessante para o tratamento da Epilepsia (Robertson *et al.*, 2011; Khomane *et al.*, 2012). Um destes peptídeos, a galanina, age modulando a hiperexcitabilidade neuronal tendo seus receptores presentes em várias regiões do tecido cerebral, inclusive na formação hipocampal. Estudos com análogos da galanina mostraram uma potente atividade antiepiléptica destes quando injetados diretamente no cérebro, podendo ser potenciais fármacos para a Epilepsia, porém, sofrem uma rápida degradação metabólica, sendo pouco estáveis e pouco eficazes em atravessar a barreira hematoencefálica (Robertson *et al.*, 2011; Metcalf *et al.*, 2017).

O neuropeptídeo Y, que é bem expresso em interneurônios gabaérgicos de regiões do córtex e da formação hipocampal, também tem seu efeito antiepiléptico estudado. Ele age inibindo a liberação de glutamato nas sinapses dos neurônios das fibras musgosas para as células da camada CA3, e dos colaterais de Schaffer para a camada CA1 do hipocampo (Robertson *et al.*, 2011; Ledri *et al.*, 2015). Outros dois neuropeptídeos homólogos, neuropeptídeo W e neuropeptídeo B, também já foram estudados quanto às suas possíveis atividades antiepilépticas, mostrando uma supressão de crises induzidas eletricamente. Análogos sintéticos do neuropeptídeo W que tenham uma maior capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, podem surgir como potenciais tratamentos para a Epilepsia (Green *et al.*, 2010). Outro peptídeo endógeno que tem sua atividade antiepiléptica avaliada é o hormônio, liberador de tireotrofina, TRH, classificado como peptídico. Alguns análogos deste já foram sintetizados com mudanças em aminoácidos que os tornam mais estáveis, afinal o peptídeo original, apesar de se mostrar um potente antiepiléptico em modelos animais, tem baixa disponibilidade oral e de meia vida no plasma (Khomane *et al.*, 2012).

Além desses neuropeptídeos, diversos peptídeos exógenos isolados de peçonhas são estudados como possíveis fármacos para Epilepsia. Existem várias famílias de peptídeos isolados da peçonha de animais do gênero *Conus*, as conotoxinas, amplamente estudadas como potenciais tratamentos para dor crônica e Epilepsia, alguns destes já em testes clínicos (Han *et al.*, 2008; Gao *et al.*, 2017). A conotoxina com propriedade antiepiléptica melhor descrita é a conotoxina G, CGX-1007, isolada da peçonha do *Conus geographus*. Ela age inibindo receptores do tipo NMDA, como um antagonista competitivo ao sítio de ligação do glutamato, e assim, modulando correntes pós-sinápticas excitatórias, no córtex cerebral e no hipocampo. A CGX-1007 se encontra em fase I de testes clínicos como potencial fármaco para a Epilepsia intratável (Essack *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2017), e é considerado como base para o desenvolvimento de novos peptídeos sintéticos com atividade antiepiléptica (Beraud & Chandy, 2011).

Outro grupo de animais que têm os peptídeos de suas peçonhas bem estudados são os artrópodes. Um peptídeo isolado da peçonha do escorpião *Centruroides limpidus limpidus*, denominado, CII9, mostrou suprimir crises em análises comportamentais e eletroencefalográficas quando injetado diretamente no cérebro de ratos (Corona *et al.*, 2003). Peptídeos da peçonha de *Buthus martensi* Karsch também já foram estudados em modelos de Epilepsia, sendo o peptídeo BmK AEP, o primeiro peptídeo isolado de peçonha de escorpião que mostrou atividade antiepiléptica (Zhou *et al.*, 1989; Zhang *et al.*, 2019). Polipeptídeos e peptídeos de peçonhas de aranhas, como os isolados de aranhas do gênero *Agelenopsis* e da aranha *Phoneutria nigriventer*, respectivamente, também foram descritos como antiepiléticos (Jackson and Scheideler, 1996; Pinheiro *et al.*, 2006).

Moléculas isoladas de peçonhas de vespas também têm sido estudadas com ação antiepiléptica. Tal é o caso do peptídeo neuropolybina isolado da peçonha da vespa *Polybia paulista*, testado em modelo agudo de crises induzidas por Pentilenotetrazol (PTZ), em ratos e camundongos (Couto *et al.*, 2012; Silva, 2013). Além de apresentar atividade atiepiléptica também no modelo crônico de ELT induzido por pilocarpina (Gomes, 2016).

Em 2005, Mortari e colaboradores coletaram ninhos da vespa social *Polybia occidentalis* (Polistinae: Vespida) em Ribeirão Preto- SP, eutanaziaram os animais por congelamento e extraíram as glândulas de peçonhas para estudos e purificação da peçonha desnaturada. Após testes de indução aguda de crises por epiléticos químicos padrões: bicuculina, picrotoxina, ácido caínico e PTZ e o tratamento subsequente com injeção da peçonha desnaturada intracerebroventricularmente (i.c.v.) em ratos, foi possível observar uma proteção significativa contra as crises máximas induzidas

principalmente pelo ácido caínico, seguido por bicuculina, picrotoxina e, por último, PTZ. De forma interessante, mesmo as doses testadas da peçonha desnaturada não protegendo significativamente das crises induzidas pelo PTZ, as latências para o início das crises tiveram um aumento significativo e dose-dependente. A partir destes dados, foi feito o isolamento e a caracterização estrutural de um novo peptídeo antiepilético, sendo denominado occidentalina-1202 (OcTx-1202). Em modelos de indução aguda de crise, o OcTx-1202 mostrou um potente efeito antiepilético contra crises induzidas pelos compostos químicos ácido caínico e pentilenotetrazol (Mortari, 2007).

Após os primeiros estudos sobre a atividade antiepilética da peçonha da *P. Occidentalis* e o isolamento do OcTx-1202, foram realizados testes com o análogo natural da OcTx-1202 (OcTx-1202s) e um análogo criado a partir da sequência primária (neurovespina) com modificações a fim de tornar o peptídeo mais estável e aumentar o efeito antiepilético (Dos Anjos, 2013). Ambos apresentaram uma potente atividade antiepilética dose-dependente em um modelo agudo de crises induzida por ácido caínico quando injetados via i.c.v e via intraperitoneal (i.p.). Porém, observando as doses-efetivas 50% (DE₅₀) calculadas, a neurovespina se mostrou aproximadamente 6 vezes mais potente do que o análogo natural. O análogo neurovespina foi testado no modelo crônico de ELT pela indução de *status epilepticus* (SE) por pilocarpina, onde foi capaz de reduzir a frequência, o tempo de duração e a gravidade das CREs em comparação ao grupo controle em todas as doses avaliadas (Dos Anjos, 2017).

Desta forma, observa-se um grande potencial para o uso de peptídeos direcionados para o desenvolvimento de novos fármacos neuroativos. Nos últimos anos, diversos compostos isolados da peçonha de vespas com atividade no SNC de mamíferos têm sido descritos, especialmente os peptídeos (Mortari *et al.*, 2007a). Ditos compostos podem ser úteis em pesquisas na área de neurociências com o intuito de melhorar a compreensão dos eventos relacionados às transmissões sinápticas e proporcionar a busca por novos fármacos para o tratamento de distúrbios neurológicos, como a Epilepsia (Mortari *et al.*, 2007b). Adicionalmente, estes peptídeos também servem como base para a síntese de novos peptídeos bioinspirados com modificações que os tornem mais eficazes, a fim de melhorar as propriedades farmacológicas dos mesmos (Lee *et al.*, 2009).

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

O objetivo do presente trabalho é avaliar a atividade antiepiléptica do peptídeo nor-1202, um novo peptídeo bioinspirado a partir da occidentalina-1202, em modelos agudos e crônico de Epilepsia.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar do efeito farmacológico do peptídeo nor-1202 em modelos agudos de crises epilépticas induzidas por ácido caínico e pilocarpina, quando injetado via intracerebroventricular.
- Verificar se o peptídeo é capaz de proteger contra crises induzidas no modelo agudo de pilocarpina quando injetado de forma sistêmica (intraperitoneal e subcutânea).
- Definir as DE_{50} do peptídeo para os dois convulsivantes, assim como determinar a curva dose-resposta.
- Verificar o efeito antiepiléptico do peptídeo no modelo crônico de ELT induzido por pilocarpina, monitorando as crises recorrentes e espontâneas dos sujeitos durante o período crônico.

3. Material e Métodos

3.1 Peptídeo

O peptídeo nor-1202 foi sintetizado pela empresa AminoTech Pesquisa e Desenvolvimento Ltda. (relatório de qualidade, Anexo), tendo como base a occidentalina-1202 (Glu-Gln-Tyr-Met-Val-Ala-Phe-Trp-Met-NH₂), com modificações na sequência englobando a substituição das metioninas presentes no original por norleucina (Glu-Gln-Tyr-Nle-Val-Ala-Phe-Trp-Nle-NH₂).

A sequência de aminoácidos do peptídeo sintetizado, sua massa monoisotópica e o grau de pureza foram confirmados por Espectrometria de Massas e sequenciamento *De Novo*, seguindo o método MALDI-TOF/TOF (dados não mostrados), com o auxílio do técnico químico Adolfo de Souza do Departamento de Ciências Fisiológicas da UnB.

Para a utilização do peptídeo nos ensaios experimentais, este foi solubilizado em solução fisiológica 0,9% com adição de 10% de sulfóxido de dimetilo (DMSO).

3.2 Sujeitos Experimentais

Para avaliar a potencial atividade antiepiléptica do peptídeo, camundongos Swiss machos (*Mus musculus*) foram utilizados. A manipulação dos sujeitos experimentais seguiu as normas estipuladas nos Princípios Éticos na Experimentação Animal, o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e a Lei Arouca (Lei 11.794/2008). O projeto foi submetido à Comissão de Ética no Uso Animal do Instituto de Ciências Biológicas (CEUA/IB) da Universidade de Brasília – UnB e deferido, protocolo 17/2017 (Anexo B). Os grupos de animais do modelo crônico de ELT por pilocarpina foram usados em colobaração com outro projeto do Laboratório de Neurofarmacologia da UnB, projeto este que também foi submetido ao CEUA/IB.

Os camundongos pesando entre 18 a 30 g foram adquiridos do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, acondicionados em caixas de polipropileno (41 x 34 x 16 cm – comprimento x largura x altura), mantidos em estufas com ciclo claro/escuro de 12/12 horas, temperatura (25°C) e umidade (55%) controladas. Durante todo o período de experimento foram oferecidas água e ração específica para camundongos *ad libitum*.

3.3 Procedimento cirúrgico de implantação da cânula-guia

Para a administração i.c.v. nos camundongos, foi realizado um procedimento estereotáxico para implantação de uma cânula guia no ventrículo lateral cerebral (VL) direito. Os sujeitos experimentais foram anestesiados com solução de cloridrato de quetamina (75 mg/kg i.p.; Ceva) e cloridrato de xilazina (15 mg/kg i.p.; Ceva) diluídas em solução fisiológica e, então foram afixados em um estereotáxico (Insight Equipamentos®) e uma assepsia com iodopolividona 10% (Vic Pharma®) foi realizada. Os sujeitos receberam injeção local subcutânea de cloridrato lidocaína com hemitartarato de norepinefrina (30 mg/ml com 0,04 mg/ml; *Dentsply Pharmaceutical*). O crânio foi exposto para a implantação da cânula guia no VL seguindo as medidas estereotáxicas: AP: -0,2 mm; ML:-1,0 mm; DV:-2,3 mm, tendo como base a linha do bregma, de acordo com o Atlas de Paxinos & Franklin (2001). No lado contralateral à cânula foi fixado um parafuso de aço inoxidável para garantir equilíbrio com a cânula e uma maior aderência da resina acrílica (Dentbras®) polimerizada com líquido acrílico (Dentbras®) (Figura 2). A cânula é constituída por um segmento de 10 mm agulha hipodérmica BD 0,70 x 25 (22G) e foi selada com um fio de aço inoxidável evitando sua obstrução. Para auxiliar a cicatrização e impedir infecções foi administrada uma pomada tópica de sulfato de neomicina e bacitracina (5 mg/g e 250 UI/g; Medley) ao redor da resina logo após o término da fixação da cânula. Os camundongos ficaram em observação até se recuperaram da anestesia, e foram levados de volta ao biotério. Após 5-7 dias de recuperação pós-procedimento estereotáxico, os camundongos foram submetidos aos protocolos experimentais.

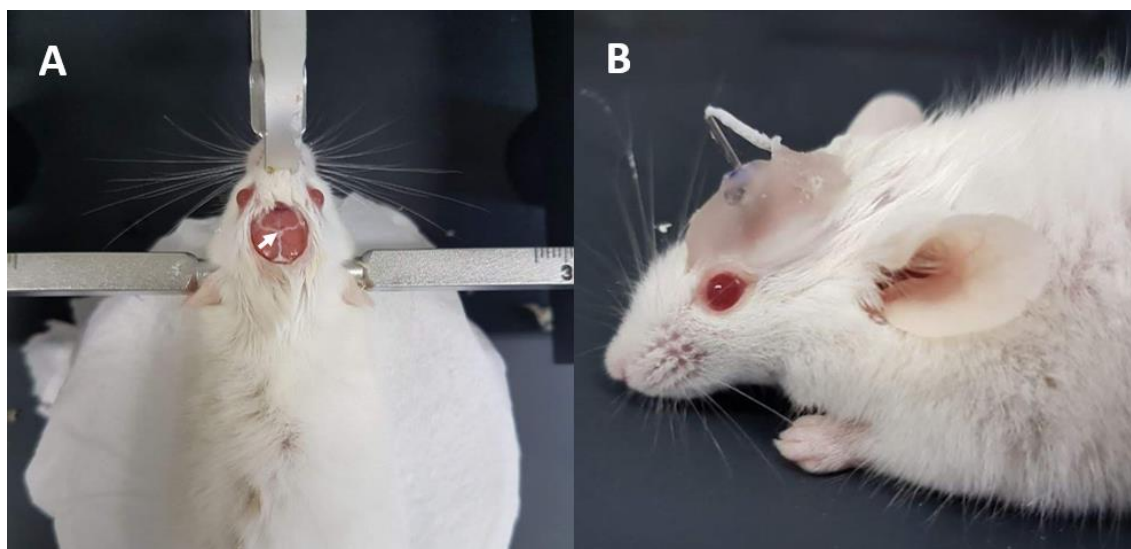


Figura 2. Implantação de cânula guia no ventrículo lateral direito. (A) Crânio exposto mostrando marcação do Bregma (seta). (B) Camundongo após o procedimento completo com cânula guia e parafuso de apoio implantados.

3.4 Modelos agudos de indução de crises epiléticas

Utilizando o modelo de indução aguda de crises epiléticas por um composto químico, primeiramente se injeta no animal o composto estudado, no caso o peptídeo nor-1202, e após um período, o indutor das crises. Para analisar a atividade antiepilética, foram utilizados o modelo de indução de crises epiléticas por ácido caínico (1,25 µg/animal i.c.v.; *Sigma-Aldrich*®) e pilocarpina (250 mg/kg i.p., *Sigma-Aldrich*®).

3.4.1 Indução de crises por ácido caínico

Neste modelo, os animais foram infundidos por meio da cânula-guia utilizando uma bomba de infusão (BI-2008, AVS Projetos) acoplada à uma microseringa (Gastight 10 µL, Modelo 1701 N SYR, Hamilton®) com taxa de 1 µL/min, com as doses do peptídeo (6; 3 e 0,3 µg/animal) via i.c.v. e, após 15 minutos foi feita a infusão i.c.v. do ácido caínico. Os animais do grupo controle negativo foram infundidos i.c.v. com solução fisiológica 0,9% e adição de 10% DMSO (1 µL), e no grupo controle positivo os animais foram tratados com o antiepilético Diazepam (DZP) (Compaz®; 4 mg/kg, Cristália) 30 minutos antes do convulsivante. Após a infusão do ácido caínico os animais foram colocados na arena de acrílico e tiveram seus comportamentos registrados em vídeo por 30 minutos. Primeiro foram feitos os testes com a dose de 3 µg/animal, e a partir dos resultados obtidos foram escolhidas as outras duas doses (6 e 0,3 µg/animal).

Os animais submetidos aos ensaios de indução aguda de crise epilética por ácido caínico foram divididos nos seguintes grupos independentes:

- Grupo veículo (controle negativo): Animais nos quais foi administrada uma dose de solução fisiológica 0,9% (1 µL; i.c.v) com adição de 10% de DMSO, e após 15 minutos foram submetidos a infusão de ácido caínico (n= 6).
- Grupo DZP (controle positivo): Animais que receberam um tratamento prévio com diazepam (Compaz®; 4 mg/kg, i.p) 30 minutos antes da administração de ácido caínico (n= 6).
- Grupo nor-1202: Animais que receberam uma das três doses independentes do peptídeo [6 (n=7); 3 (n=8) ou 0,3 (n=8) µg/animal i.c.v.] solubilizado em

solução fisiológica 0,9% com adição de 10% DMSO e após 15 minutos receberam a administração do ácido caínico.

3.4.2 Indução de crises por pilocarpina

No modelo de indução química por pilocarpina 15 minutos antes da administração do peptídeo, os animais receberam uma injeção i.p. do antagonista colinérgico metil-escopolamina (4 mg/kg; *Boehringer Ingelheim*) afim de prevenir os efeitos periféricos do composto epiléptico e reduzir a mortalidade dos animais (Clifford et al., 1987).

Para os testes com as doses do peptídeo injetadas via i.c.v. (grupos independentes) (6; 3 ou 0,3 µg/animal), foi feita administração por meio de uma bomba de infusão (BI-2008, AVS Projetos) acoplada à uma microseringa (*Gastight* 10 µL, Modelo 1701 N SYR, *Hamilton*®) com taxa de infusão de 1 µL/min. Após 15 minutos da injeção do peptídeo, a pilocarpina foi injetada via i.p. Nos animais do grupo controle negativo, foi injetada uma dose i.c.v. de solução fisiológica 0,9% (1µL) com adição de 10% DMSO, e a pilocarpina 15 minutos depois. No grupo controle positivo os animais foram tratados com o DZP, 30 minutos antes do convulsivante.

Nos ensaios para verificar a atividade antiepiléptica do peptídeo quando injetado de maneira sistêmica, foram testadas duas vias de administração, sendo elas, a via subcutânea e a intraperitoneal. Para a via subcutânea foram testadas duas concentrações do peptídeo, 8 e 4 mg/kg, e para a via i.p. foi testada a concentração de 8 mg/kg, injetadas nos animais 30 minutos antes da administração da pilocarpina. Os camundongos foram submetidos ao mesmo procedimento de injeção prévia de metil-escopolamina (4 mg/kg). Nestes experimentos o grupo controle positivo com tratamento de DZP também foi utilizado e o grupo salina foi feito com injeção de 100 µL de solução fisiológica 0,9%, injetada via i.p. ou subcutânea.

Seguindo a administração da pilocarpina, os camundongos foram colocados em uma arena de acrílico tendo seus comportamentos filmados por 30 minutos.

Os animais submetidos aos ensaios de indução aguda de crise epiléptica por pilocarpina foram divididos nos seguintes grupos independentes:

- Grupo veículo (controle negativo): Animais nos quais foi administrado solução fisiológica 0,9% (1 µL) com adição de 10% de DMSO e após 15 minutos foram submetidos a administração da pilocarpina, para os ensaios via i.c.v. (n=9). Nos ensaios via subcutânea (n=7) e i.p. (n=7) os animais foram administrados com 100 µL de solução salina e após 30 minutos administrados com pilocarpina.

- Grupo Diazepam (DZP) (controle positivo): Animais que receberam um tratamento prévio com diazepam (Compaz®; 4 mg/kg, i.p.) 30 minutos antes da administração de pilocarpina (n= 8). Foi utilizado o mesmo grupo DZP para todos os ensaios agudos de pilocarpina (i.c.v., i.p. e subcutâneo).
- Grupo nor-1202: Animais nos quais foi administrado uma das três doses independentes do peptídeo [6 (n=10); 3 (n=9) ou 0,3 (n=8) µg/animal i.c.v.] solubilizado em solução fisiológica 0,9% com adição de 10% DMSO e após 15 minutos foram submetidos a administração da pilocarpina, para os ensaios via i.c.v. Nos ensaios via subcutânea [8 (n=9) ou 4 (n=8) mg/kg] e i.p. [8 mg/kg (n= 8)] os animais foram administrados com as concentrações do nor-1202 e após 30 minutos administrados com pilocarpina.

3.4.3 Avaliação comportamental das crises epiléticas

Para a avaliação comportamental das crises epiléticas foi observada a influência do peptídeo na latência para o estabelecimento da primeira crise generalizada (classe máxima) e a porcentagem de proteção contra crises de classe máxima, além da influência na latência e proteção contra morte dos animais. Os 30 minutos de gravação foram analisados cronometrando quanto tempo os animais demoravam para ter o primeiro evento de crise generalizada e quanto tempo demoravam para ir a óbito.

As análises foram feitas com base no índice de Racine (1972) modificado por Shibley e Smith (2002) para o modelo de pilocarpina (Tabela 2) e no índice de Racine (1971), modificado por Pinel & Rovner (1978) para o ácido caínico (Tabela 3). Essas classificações foram modificadas para se adequar aos comportamentos observados nos protocolos experimentais deste trabalho. Após o término das análises dos comportamentos foi feito o cálculo da DE₅₀ do peptídeo no modelo de pilocarpina utilizando os dados dos ensaios com as doses do peptídeo infundidas via i.c.v.

Tabela 2. Classificação das crises límbicas induzidas por pilocarpina baseada no índice de Racine (1972), modificado por Shibley e Smith (2002) (modificado).

Classe	Comportamento do camundongo
1 e 2	Automatismos faciais, enrijecimento da cauda, tremores de duração de poucos segundos, <i>freezing</i> precedendo os comportamentos anteriores
3	Crises tônico-clônicas pouco intensas marcadas por mioclonias unilaterais dos membros e os demais comportamentos das classes 1 e 2
4	Crises mioclônicas bilaterais dos membros podendo ter elevações e manifestações da classe 3
5	Crises mioclônicas bilaterais dos membros anteriores e posteriores com perda transitória do controle postural (Crise generalizada)

Tabela 3. Classificação de crises epiléticas, segundo o índice de Racine (1971), modificado por Pinel & Rovner (1978) (modificado).

Classe	Comportamento do camundongo
1 e 2	Movimentos orofaciais e mioclonia de cabeça
3	Mioclonia das patas anteriores
4 e 5	Elevação e queda
6	Todos os anteriores em sequência
7	Vocalizações, rolamentos e pulos violentos repetidos, além de um período de hipertonia

3.5 Modelo Crônico de ELT

Após o término de todos os ensaios de indução aguda de crise epiléptica e do cálculo de sua DE_{50} para os convulsivantes, o peptídeo foi testado no modelo crônico de ELT com crises espontâneas e recorrentes pós SE induzido quimicamente por pilocarpina. Este modelo é subdividido em 3 fases: fase aguda, onde ocorre o insulto inicial (SE); fase silenciosa, onde ocorre a epileptogênese (processo onde ocorrem mudanças estruturais e funcionais no cérebro normal); e fase crônica, onde o animal apresenta crises espontâneas e recorrentes (Figura 3).

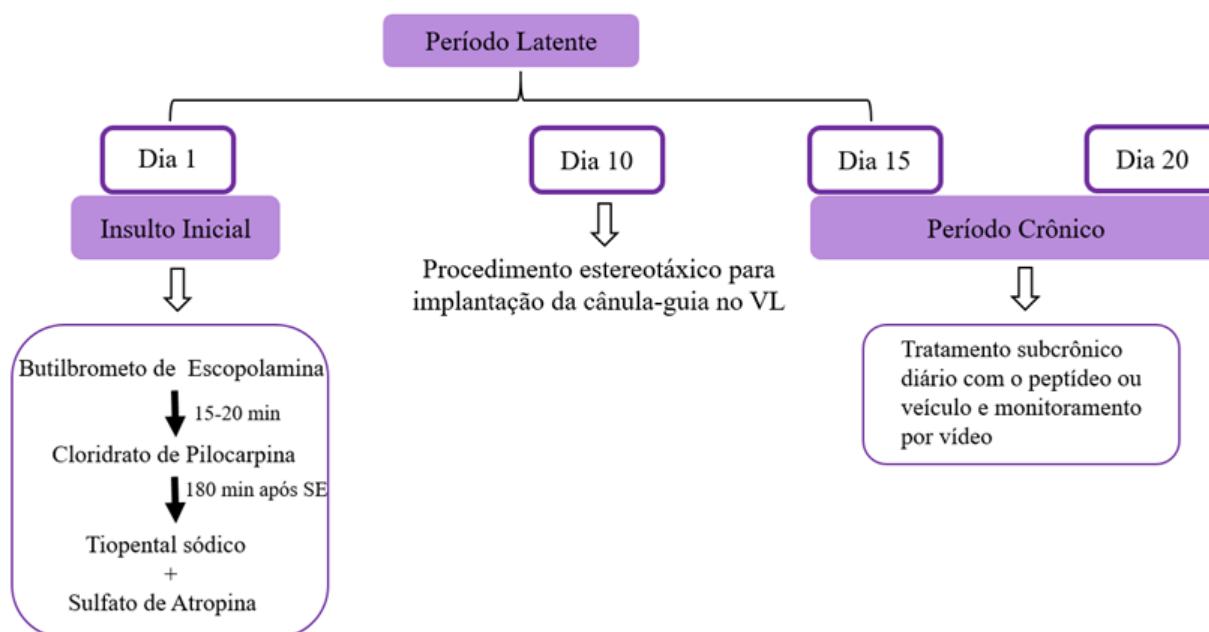


Figura 3. Desenho esquemático ilustrando as fases do protocolo experimental de modelo crônico de Epilepsia do Lobo Temporal induzido quimicamente por pilocarpina.

3.5.1 Indução de *Status Epilepticus*

Primeiramente, os camundongos receberam uma dose de metil-escopolamina (4 mg/kg, i.p.), para reduzir os efeitos sistêmicos da pilocarpina. Após 20 min foi administrada sistemicamente a pilocarpina (210 mg/kg, i.p.) solubilizada em solução fisiológica, dose utilizada para induzir o SE e manter uma alta taxa de sobrevivência estabelecida previamente (Dos Anjos, 2017). Os animais ficaram em observação, tendo seus comportamentos monitorados e em alguns minutos, eles passaram a apresentar respostas que progridem para o quadro de SE (corresponde a fase aguda, na qual o animal tratado com pilocarpina começa a apresentar crise de classe 5 ininterrupta, com duração maior ou igual a 30 minutos ou crises repetidas de duração menor, sem

recuperação da consciência entre as crises) (Scott, 2014; Cross, 2014). A avaliação comportamental para o estabelecimento do SE foi baseada no mesmo índice utilizado no modelo agudo de indução de crises com pilocarpina (Tabela 2).

Os animais foram mantidos por 180 minutos neste estado, e após este tempo foi feita a administração de tiopental sódico (50 mg/kg, i.p.) para que os animais fossem resgatados das crises ininterruptas que caracterizam o SE, e a administração de sulfato de atropina (0,1 mg/animal, i.p.; Hypofarma). Os camundongos foram monitorados durante as 24 horas seguintes, hidratados com soro glicosado 5% (100 µL) e alimentados por uma sonda.

Após esse período agudo, os camundongos que sobreviverem foram submetidos, no 10º dia após o SE (período latente), a um procedimento estereotáxico para implantação da cânula-guia no ventrículo lateral direito seguindo o mesmo protocolo dos ensaios do modelo agudo.

3.5.2. Tratamento e monitoramento das CRE

A partir do 15º dia após o SE, os camundongos entram na fase crônica do modelo (Fernandes, 2013). Nesse momento, foram tratados diariamente contra as CRE durante os cinco primeiros dias do período crônico do modelo. A DE_{50} do peptídeo calculada para o convulsivante pilocarpina (0,8722 µg/animal) ou o veículo (solução fisiológica 0,9%), ambos com adição de 10% de DMSO, foram administrados por via i.c.v. (grupos independentes) por meio de uma bomba de infusão (BI-2008, AVS Projetos) acoplada à uma microseringa (Gastight 10 µL, Modelo 1701 N SYR, Hamilton®) com taxa de infusão de 1 µL/min (Figura 4). O fármaco DZP foi administrado via i.p. nos animais que compõem o grupo controle positivo.



Figura 4. Camundongo recebendo o tratamento com o peptídeo nor-1202 durante a fase crônica do modelo de Epilepsia do Lobo Temporal, via intracerebroventricular por meio de uma microseringa acoplada a bomba de infusão.

Após os tratamentos os animais eram levados de volta ao biotério onde foi feito o monitoramento das CRE, todos os cinco dias às 9h. Um aparato com uma câmera gravadora de vídeo digital (Sony DCR-SR47) foi instalada acima da caixa dos camundongos, e registrou os comportamentos durante 10 h diariamente (Figura 5). Os camundongos continuaram recebendo ração e água *ad libitum* durante todo o período crônico do modelo. O dorso dos animais foi pintado para possível identificação individual.



Figura 5. Camundongos após tratamento na fase crônica do modelo de ELT por pilocarpina tendo seus comportamentos registrados via vídeo durante 10h por dia para observação das crises recorrentes e espontâneas.

3.5.3. Quantificação das CRE

Após os cinco dias que foram estabelecidos de fase crônica, foi feita a análise dos comportamentos filmados e quantificação das crises, utilizando o mesmo índice para o modelo agudo de pilocarpina. Isto foi feito seguindo método de análise cega, no qual quem analisou os vídeos dos camundongos não tinha conhecimento sobre o que foi administrado em cada sujeito durante o tratamento. Anteriormente, foi feito um índice de concordância entre as análises de todos os pesquisadores que quantificaram as crises nos vídeos, a fim de obter análises mais semelhantes possíveis. Foi contabilizado o tempo total em segundos que os sujeitos experimentais ficaram em crises e a quantidade de CRE durante as 10 h de gravação diárias. Esta análise temporal foi dividida em duas fases: a fase imediata, que corresponde às cinco primeiras horas após o tratamento, e a tardia, fase que corresponde das cinco às dez horas posteriores ao tratamento.

3.5.4. Grupos experimentais

Os animais submetidos ao protocolo do modelo crônico de ELT foram divididos nos seguintes grupos independentes:

- Grupo sadio (n=5): animais que não foram submetidos ao SE, e durante a fase crônica foram tratados com solução fisiológica 0,9% (1 µL; i.c.v) com adição de 10% de DMSO.
- Grupo epiléptico (n=5): animais submetidos ao SE, e tratados com solução fisiológica 0,9% (1 µL; i.c.v) com adição de 10% DMSO. Este grupo representa os animais doentes, o grupo controle negativo.
- Grupo nor-1202 (n=7): animais submetidos ao SE e que foram tratados com a DE₅₀ estabelecida para o peptídeo (0,8722 µg/animal) via i.c.v. solubilizada em em solução fisiológica 0,9% com adição de 10% DMSO.

3.6 Análise do posicionamento da cânula

Após cada bioensaio, os camundongos foram eutanasiados e seus tecidos cerebrais foram infundidos via i.c.v com o corante azul de metileno, a fim de verificar macroscopicamente o posicionamento da cânula. No caso da cânula de ter sido implantada no local correto, o corante se espalha por todo o ventrículo lateral cerebral e, assim, esse animal pode ser considerado nas análises estatísticas.

3.7 Análises Estatísticas

A análise estatística dos dados obtidos foi feita utilizando-se o *software* GraphPad Prism® 7.0 (San Diego, CA, USA). Os dados foram submetidos à análise de distribuição normal (*Shapiro-Wilk*, *Kolmogorov-Smirnov* e *D'Agostino & Pearson*). Foi utilizado a análise de variância (ANOVA) de uma via para verificar a significância dos tempos de latência para o início das crises máximas induzidas pelos agentes convulsivantes propostos, para a latência de morte dos animais, e para a duração das crises no modelo agudo. Para análise da significância dos resultados obtidos que não passaram nos testes de normalidades, foi utilizado o teste Kruskal-Wallis. Para análise da porcentagem de proteção contra crises induzidas e proteção contra morte foi utilizado

o teste do Qui-quadrado seguido pelo pós-teste exato de *Fisher*. Os valores de DE₅₀ foram calculados por regressão não-linear sigmoidal.

4. Resultados

4.1 Análise da posição das cânulas guias

Apenas os resultados dos animais que apresentaram a cânula guia inserida corretamente no VL (Figura 6) foram utilizados nas análises estatísticas.



Figura 6. Exemplo de tecido cerebral com o ventrículo lateral direito completamente infundido pelo corante azul de metileno indicando um correto posicionamento da cânula guia.

4.2 Modelo agudo de crises induzido por ácido caínico

4.2.1 Proteção contra crise máxima

Os dados de proteção contra a crise máxima (classe 7) induzidas por ácido caínico foram submetidos ao teste do Qui-quadrado seguido pelo pós-teste *Fisher* (Figura 7). O grupo veículo infundido com solução salina i.c.v. não protegeu animais contra crise máxima. O grupo controle positivo, tratado com DZP i.p. teve 100% de proteção, sendo estatisticamente diferente do grupo veículo, $p < 0,01$.

Os testes mostraram que as doses do peptídeo nor-1202 injetadas via i.c.v. não tiveram diferenças significativas de proteção contra a crise máxima em relação ao grupo veículo. A dose de 6 $\mu\text{g}/\text{animal}$ protegeu 42,8% dos animais, a dose intermediária de 3 $\mu\text{g}/\text{animal}$ protegeu 37,5%, e 25% dos animais infundidos com a dose de 0,3 $\mu\text{g}/\text{animal}$ não apresentaram a crise máxima durante os 30 minutos de experimento.

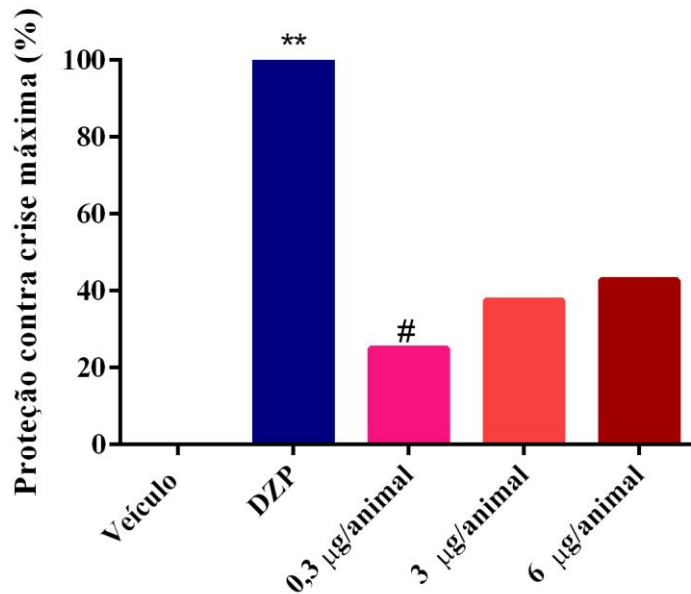


Figura 7. Porcentagem de proteção do peptídeo nor-1202 infundido via i.c.v. contra crise epiléptica de classe 7 induzida por ácido caínico i.c.v. Todos os dados foram submetidos ao teste do Qui-quadrado seguido pelo pós-teste Fisher.

(**) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo veículo (controle negativo) $p < 0,01$.

(#) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo DZP (controle positivo), $p < 0,05$.

4.2.2 Latência para primeira crise máxima

Os valores de latência para o início das crises de classe 7 no modelo agudo de ácido caínico, foram submetidos ao teste ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey, considerando-se $p < 0,05$ [$F(4,29) = 1,818$] (Figura 8).

Como citado anteriormente, o grupo DZP não apresentou crises da classe 7, sendo assim, as latências para este grupo foram consideradas 1800 segundos, tempo total que os animais ficaram em gravação. E, assim, entre o grupo DZP e o grupo veículo houve diferença significativa, $p < 0,05$.

As latências das doses do peptídeo não se mostraram diferentes estatisticamente do grupo veículo, e também não foram diferentes entre si. A menor dose de 0,3 µg/animal foi significativamente diferente do grupo DZP, $p < 0,05$.

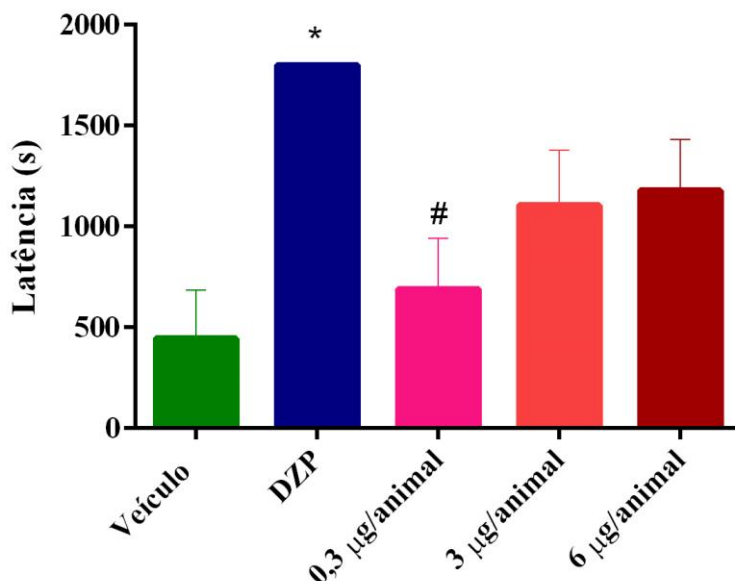


Figura 8. Latência em segundos para a primeira crise epiléptica de classe 7 no modelo de ácido caínico. Para os animais que não apresentaram crise máxima foi considerada uma latência de 1800 segundos, indicando que durante todo o período de gravação esse animais não tiveram o comportamento. ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey, $p < 0,05$ e $F(4,29) = 1,818$. (*) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo veículo (controle negativo) $p < 0,05$.

(#) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo DZP (controle positivo), $p < 0,05$.

4.2.3. Porcentagem de sobrevivência dos animais

Os dados de porcentagem de sobrevivência dos camundongos após a indução das crises agudas por ácido caínico foram submetidos ao teste do Qui-quadrado seguido pelo pós-teste *Fisher* (Figura 9). Os animais do grupo controle positivo, tratados com DZP i.p. tiveram 100% de sobrevivência após os 30 minutos de gravação, e o grupo veículo 0%.

A maior dose (6 µg/animal) avaliada do peptídeo protegeu 71,72% do grupo contra morte, e a dose de 3 µg/animal protegeu 62,5%. As duas doses foram significativamente diferentes do grupo veículo, $p < 0,05$. No grupo tratado com a dose de 0,3 µg/animal, 50% dos animais sobreviveram após a indução das crises.

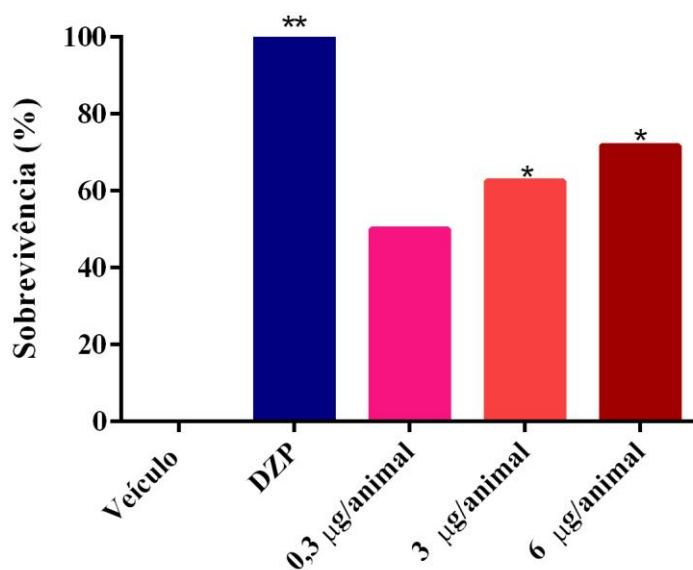


Figura 9. Porcentagem de sobrevivência dos animais após indução aguda de crises por ácido caínico. Dados submetidos ao teste do Qui-quadrado seguido pelo pós-teste Fisher.

(*) e (**) Diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo veículo (controle negativo) $p < 0,05$ e $p < 0,01$ respectivamente.

4.2.4 Latência para a morte

Os valores de latência para a morte dos animais no modelo agudo de ácido caínico, foram submetidos ao teste ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de *Tukey*, considerando-se $p < 0,05$ [$F(4,29) = 1,296$] (Figura 10).

As latências para morte no grupo DZP foram consideradas também 1800 segundos, pois os animais não morreram durante os 30 min de gravação. Este, foi diferente estatisticamente do grupo veículo, $p < 0,001$.

As três doses avaliadas via i.c.v. do peptídeo tiveram suas latências para a morte significativamente maiores do que o grupo veículo ($p < 0,01$ para as doses de 3 e 0,3 µg/animal, e $p < 0,001$ para a maior dose de 6 µg/animal).

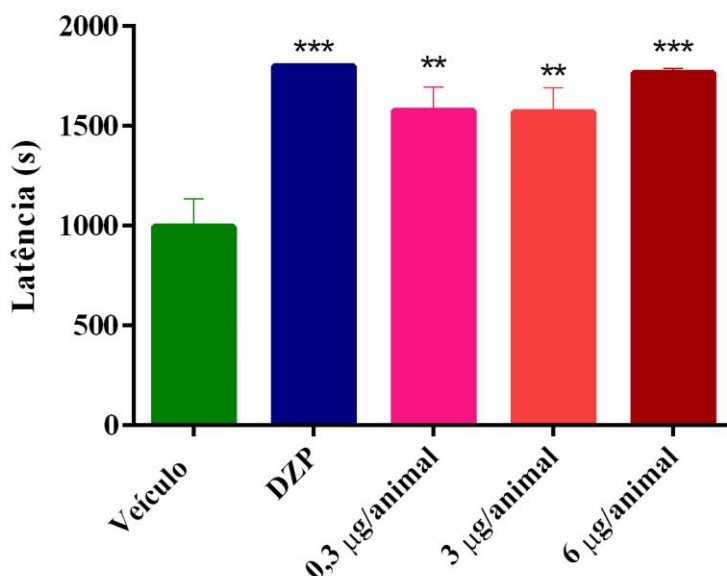


Figura 10. Latência em segundos para a morte dos animais após indução de crises por ácido caínico. Para os animais que não morreram foi considerada uma latência de 1800 segundos, indicando que os animais sobreviveram durante toda a gravação. ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey, $p < 0,05$ e $F(4,29) = 1,296$.

(**) e (***) Diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo veículo (controle negativo) $p < 0,01$ e $p < 0,001$ respectivamente.

4.3 Modelo agudo de indução de crises por pilocarpina

4.3.1 Proteção contra crise máxima

Os dados de proteção contra a crise máxima (classe 5) induzidas por pilocarpina foram submetidos ao teste do Qui-quadrado seguido pelo pós-teste *Fisher* (Figura 11). O grupo controle positivo, tratado com DZP i.p. teve 100% de proteção contra a crise 5.

Em relação à infusão i.c.v., o peptídeo nor-1202 em sua maior dose avaliada i.c.v. (6 µg/animal) protegeu 80% dos animais contra a crise epiléptica máxima, sendo estatisticamente significativa em relação ao grupo veículo ($p < 0,01$). Na dose de 3 µg/animal, 55,5% dos animais não tiveram a crise máxima ($p < 0,05$). A dose de 0,3 µg/animal protegeu 25% dos animais (Figura 11A).

As concentrações do peptídeo nor-1202 injetadas por via subcutânea 8 e 4 mg/kg, protegeram 22,22 e 12,5% dos animais contra crise máxima, respectivamente. E não foram significativamente diferentes do grupo veículo, contudo, foram estatisticamente diferentes do grupo tratado com DZP, $p < 0,01$ (Figura 11B).

No grupo veículo dos ensaios com administração i.p. 14,28% dos animais não apresentaram a crise máxima. A concentração de 8 mg/kg do peptídeo nor-1202 não protegeu animais da crise 5, e assim, não foi significativamente diferente do grupo veículo, mas sim do grupo DZP, $p < 0,001$ (Figura 11C).

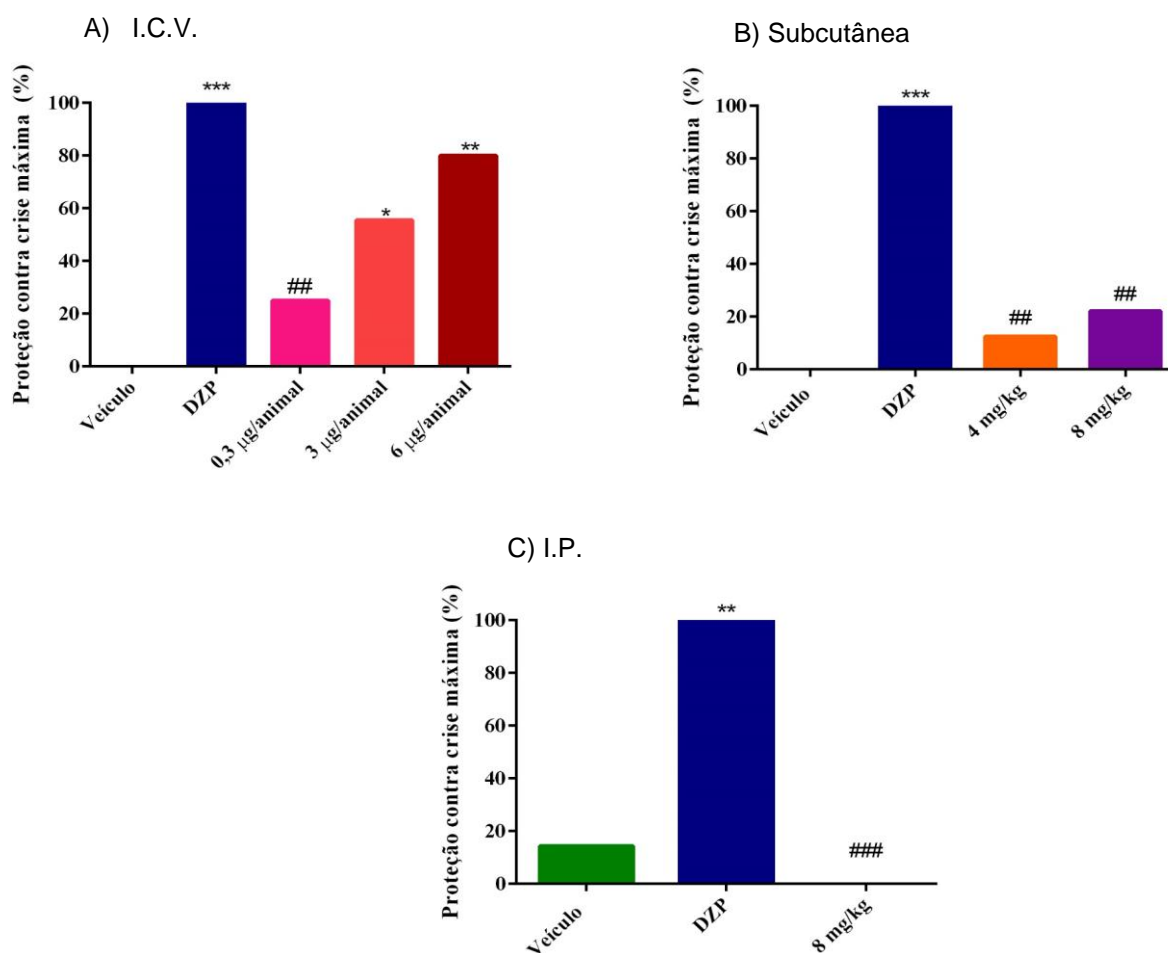


Figura 11. Porcentagem de proteção do peptídeo nor-1202 contra crise epiléptica de classe 5 induzida por pilocarpina. Todos os dados foram submetidos ao teste do Qui-quadrado seguido pelo pós-teste *Fisher*. (A) nor-1202 infundido via i.c.v. (B) nor-1202 injetado via subcutânea. (C) nor-1202 injetado via i.p.

(*), (**) e (***) Diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo veículo (controle negativo) $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$ respectivamente.

(##) e (###) Diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo DZP (controle positivo), $p < 0,01$ e $p < 0,001$ respectivamente.

4.3.2 Latência para primeira crise máxima

Os dados de latência para a primeira crise máxima de classe 5 nos ensaios com infusão via i.c.v. foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn [$K= 22,98$] (Figura 12A). Foi verificada diferença significativa entre o grupo veículo e o grupo tratado com DZP ($p<0,01$). Em relação ao peptídeo nor-1202, sua maior dose de 6 $\mu\text{g}/\text{animal}$ se mostrou significativamente diferente ao grupo veículo ($p<0,01$). A dose de 6 $\mu\text{g}/\text{animal}$ se mostrou significante estatisticamente da menor dose 0,3 $\mu\text{g}/\text{animal}$ ($p<0,05$).

Quando administrado pela via subcutânea o peptídeo não mostrou diferenças significativas na latência para primeira crise máxima em relação ao grupo veículo em nenhuma das duas concentrações avaliadas, 8 e 4 mg/kg . Ambas as concentrações se mostraram estatisticamente diferentes apenas do grupo DZP, $p<0,01$. Dados submetidos ao teste ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de *Tukey*, notando-se $p<0,05$, [$F(3,28)= 2,942$] (Figura 12B).

Os valores de latência para o início das crises de classe 5 com administração via i.p. foram submetidos ao teste ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de *Tukey* [$F(2,19)= 3,943$]. A concentração do peptídeo 8 mg/kg não aumentou as latências para as crises em relação ao grupo veículo, sendo diferente estatisticamente do grupo DZP, $p<0,0001$ (Figura 12C).

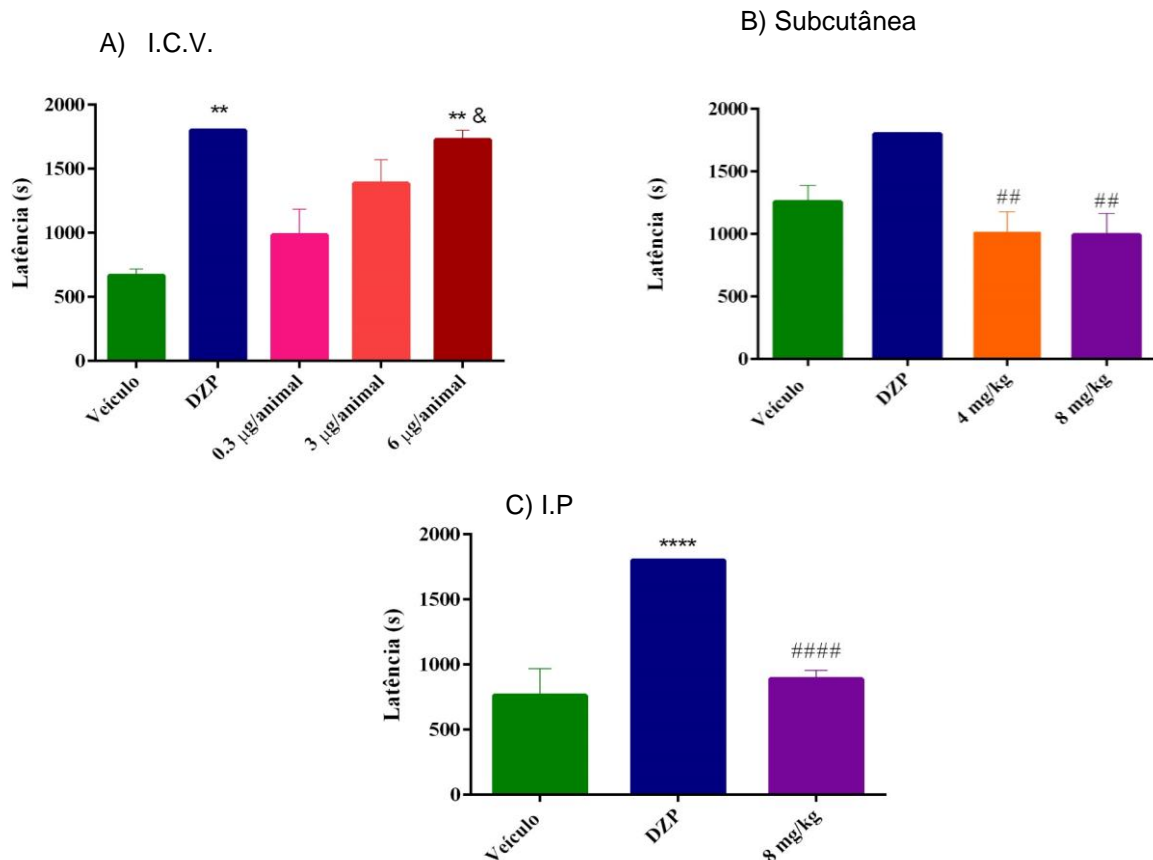


Figura 12. Latência em segundos para a primeira crise epiléptica de classe 5. Para os animais que não apresentaram crise máxima foi considerada uma latência de 1800 segundos, indicando que durante todo o período de gravação esse animais não tiveram o comportamento. (A) nor-1202 infundido via i.c.v. Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn, $p < 0,05$ [$K = 22,98$]. (B) nor-1202 injetado via subcutânea, ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey, $p < 0,05$ $F(3,28) = 2,942$. (C) nor-1202 injetado via i.p. ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey, $p < 0,05$ $F(2,19) = 3,943$.

(**) e (***) Diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo veículo (controle negativo) $p < 0,01$ e $p < 0,0001$ respectivamente.

(##) e (####) Diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo DZP (controle positivo), $p < 0,01$ e $p < 0,0001$ respectivamente.

(&) Diferenças estatisticamente significativas em relação à dose de $0,3 \mu\text{g}/\text{animal}$, $p < 0,05$.

4.3.3. Porcentagem de sobrevivência dos animais

Os dados de porcentagem de sobrevivência dos camundongos após a indução das crises agudas por pilocarpina foram submetidos ao teste do Qui-quadrado seguido pelo pós-teste *Fisher* (Figura 13). Os animais do grupo controle positivo, tratados com DZP i.p. tiveram 100% de sobrevivência após os 30 minutos de gravação.

Quanto à sobrevivência dos animais após infusão i.c.v., 12,5% dos pertencentes ao grupo veículo sobreviveram após os 30 minutos, havendo diferença significativa entre este e o grupo DZP, $p < 0,05$. O grupo que foi submetido a infusão i.c.v. do peptídeo na dose de $6 \mu\text{g}/\text{animal}$ teve uma porcentagem de sobrevivência de 90%, mostrando diferença significativa em relação ao grupo veículo, $p < 0,01$, e à dose de $0,3 \mu\text{g}/\text{animal}$, $p < 0,05$. A dose de $3 \mu\text{g}/\text{animal}$ protegeu 77% dos animais da morte, e foi estatisticamente diferente do grupo veículo, $p < 0,05$. Já a menor dose avaliada $0,3 \mu\text{g}/\text{animal}$ protegeu 25% dos animais, e foi diferente do grupo DZP ($p < 0,05$) (Figura 13A).

Em relação à administração subcutânea o grupo veículo mostrou uma sobrevivência de 75%, não sendo estatisticamente diferente do grupo controle positivo. As concentrações do peptídeo quando injetadas via subcutânea não mostraram uma diferença significativa em relação ao veículo. A concentração de $8 \text{ mg}/\text{kg}$ mostrou uma porcentagem de sobrevivência de 44,44%, sendo diferente estatisticamente do grupo DZP, $p < 0,05$. A concentração de $4 \text{ mg}/\text{kg}$ protegeu 50% dos animais contra morte (Figura 13B).

Os dados de sobrevivência dos animais quando injetados via i.p. não mostraram diferenças significativas entre os grupos. O grupo veículo quando injetado com solução

salina i.p. mostrou uma sobrevivência de 42,8% e a concentração do peptídeo nor-1202 de 8 mg/kg protegeu 62,5 animais (Figura 13C).

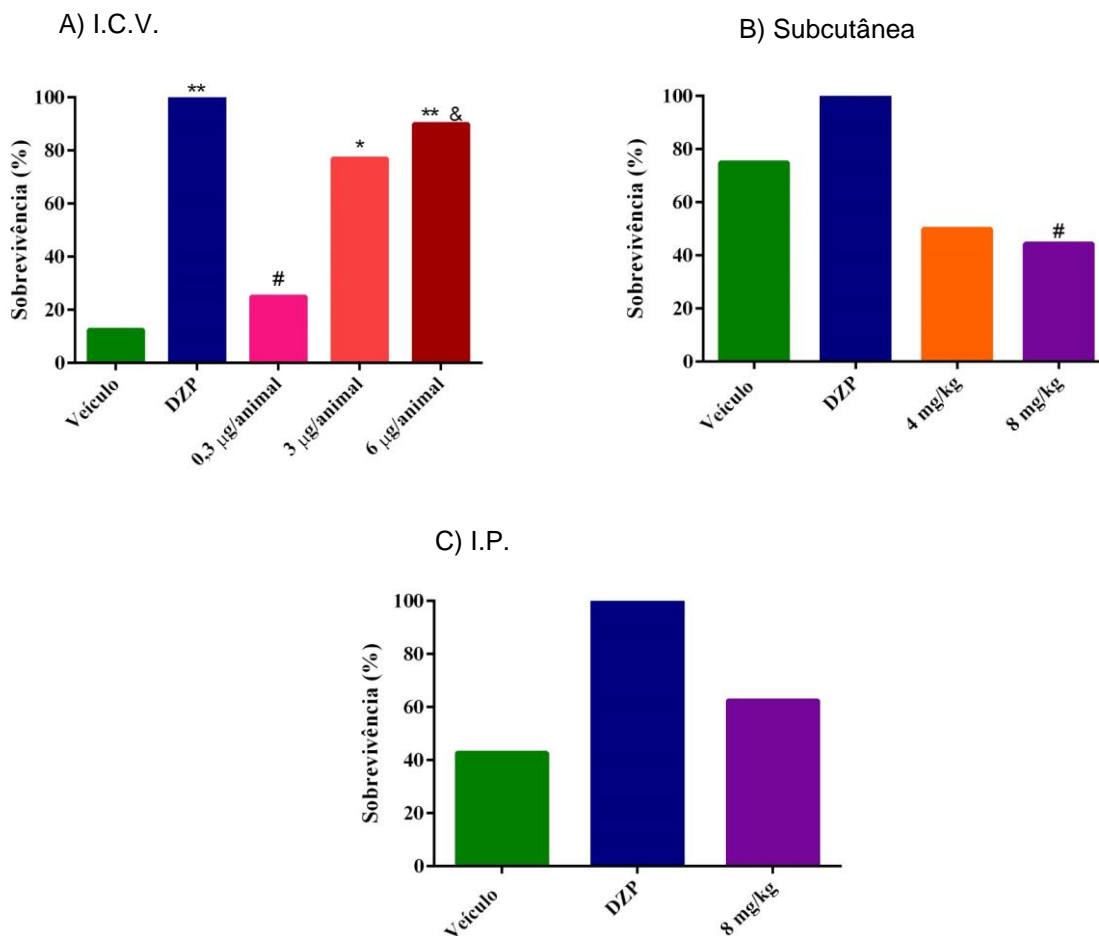


Figura 13. Porcentagem de sobrevivência dos animais após indução aguda de crises por pilocarpina. Dados submetidos ao teste do Qui-quadrado seguido pelo pós-teste Fisher.

(*) e (**) Diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo veículo (controle negativo) $p < 0,05$ e $p < 0,01$ respectivamente.

(#) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo DZP (controle positivo), $p < 0,05$.

(&) Diferença estatisticamente significativa em relação à dose de 0,3 µg/animal, $p < 0,05$.

4.3.4. Latência para morte

Os valores de latência para a morte dos animais após a injeção de pilocarpina, foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn, sendo considerado $p < 0,05$.

Nos ensaios com infusão i.c.v. houve diferença significativa entre o grupo DZP e o grupo veículo ($p < 0,01$). O peptídeo nor-1202 quando administrado via i.c.v. mostrou diferenças estatísticas com relação ao grupo veículo nas doses de 6 e 3 $\mu\text{g}/\text{animal}$, $p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente [K=20,83] (Figura 14A).

Em relação às administrações do peptídeo pelas vias subcutânea [K=7,188] e i.p. [K=5,216], os testes não revelaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos avaliados na latência para a morte dos animais (Figuras 14B e 14C).

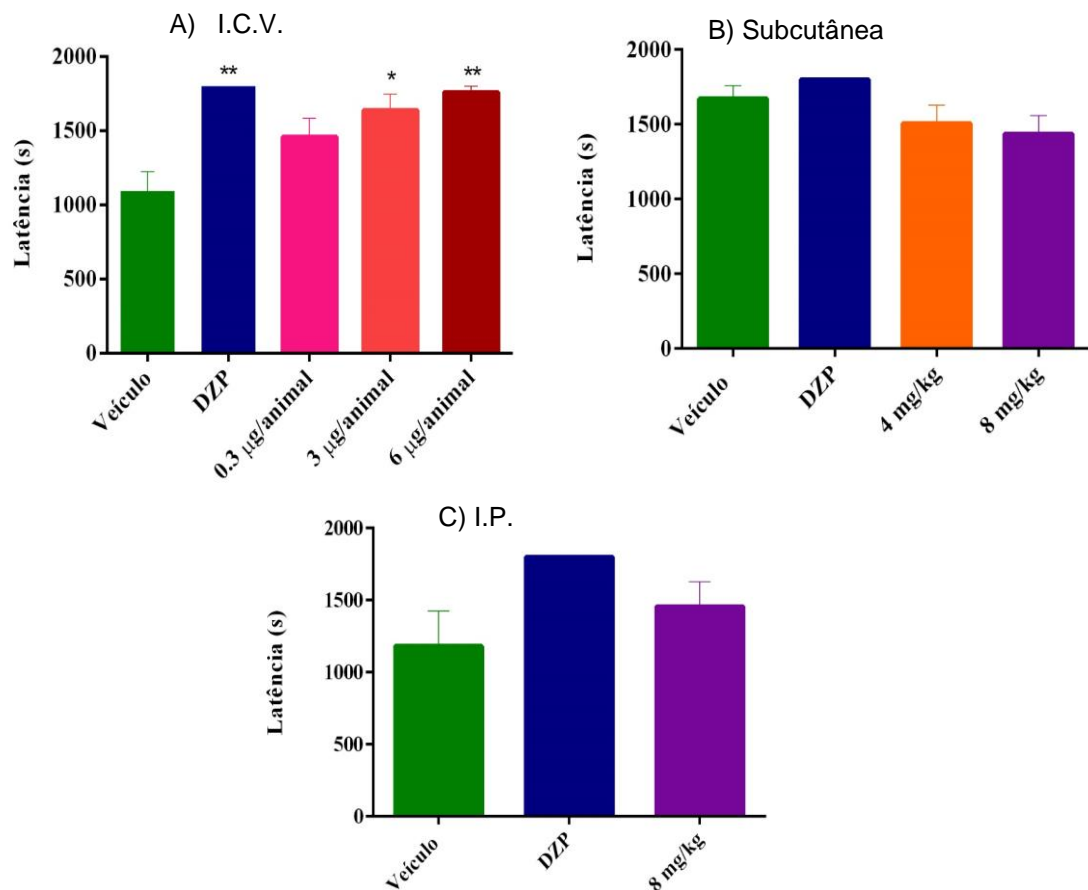


Figura 14. Latência em segundos para a morte dos animais após indução de crises por pilocarpina. Para os animais que não morreram foi considerada uma latência de 1800 segundos, indicando que os animais sobreviveram durante toda a gravação. Dados submetidos ao teste

Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn, $p < 0,05$. (A) Infusão via i.c.v. [K= 20,83]. (B) Administração via subcutânea [K=7,188]. (C) Administração via i.p. [K=5,216].

(*) e (**) Diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo veículo (controle negativo) $p < 0,05$ e $p < 0,01$ respectivamente.

4.4. Cálculo da DE_{50}

Como o peptídeo nor-1202 não mostrou atividade antiepiléptica no modelo agudo induzido por ácido caínico, não foi calculada a DE_{50} para este convulsivante.

O cálculo da DE_{50} do peptídeo nor-1202 para o modelo agudo de pilocarpina, foi feito utilizando regressão não-linear sigmoidal e utilizando os dados de porcentagem de sobrevivência dos animais após a indução química das crises epilépticas.

A DE_{50} calculada foi de 0,8722 $\mu\text{g}/\text{animal}$ e o intervalo de confiança foi de 0,3066 – 2,481 $\mu\text{g}/\text{animal}$ ($R^2 = 0,9978$), para a pilocarpina (Figura 15).

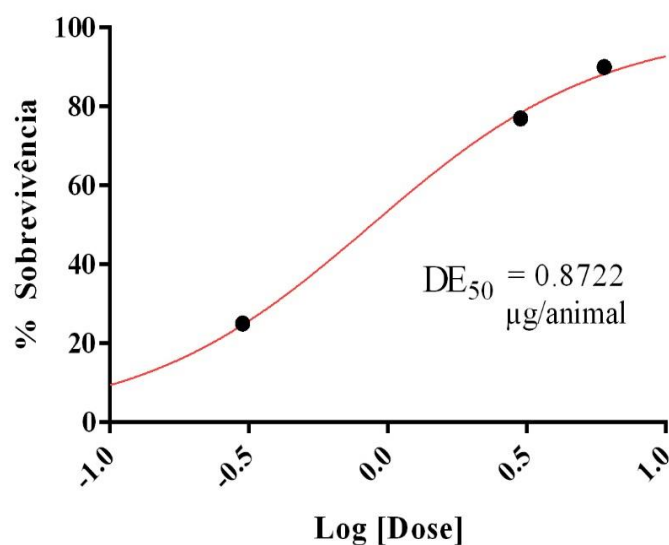


Figura 15. Curva de porcentagem de sobrevivência dos animais após indução de crises epilépticas por pilocarpina ($R^2 = 0,9978$). Regressão não-linear sigmoidal.

4.5. Avaliação da atividade antiepiléptica no modelo de ELT

4.5.1. Tempo de CRE

Os dados obtidos quanto ao tempo total em segundos de CREs que os camundongos apresentaram durante os cinco dias de tratamento da fase crônica estão representados na Figura 16. Os valores foram submetidos ao teste ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de *Tukey* [$F(2,14) = 4,501$; $p < 0,05$]. Quanto ao tempo total de CREs, diferença significativa foi obtida entre o grupo epiléptico e o grupo sadio ($p < 0,05$). O grupo tratado com o peptídeo nor-1202 não mostrou diferenças em relação ao tempo que os animais permaneceram em crises, nem em relação ao grupo sadio, nem ao grupo epiléptico.

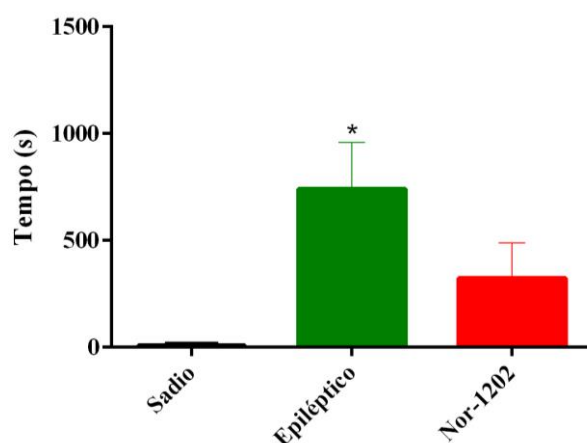


Figura 16. Tempo em segundos da somatória das CREs durante o período crônico. Dados submetidos ao teste ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de *Tukey* [$F(2,14) = 4,501$; $p < 0,05$]. (*) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo sadio ($p < 0,05$).

Na figura 17 está ilustrado o tempo em segundos de CREs apresentado pelos animais, em cada um dos dias do período crônico. Houveram diferenças estatísticas entre o grupo sadio e o grupo epiléptico nos dias 2 ($p < 0,01$), 3 ($p < 0,05$) e 4 ($p < 0,05$). Não foram observadas diferenças significativas entre o grupo tratado com o peptídeo nor-1202 em relação aos grupos sadio e epiléptico em nenhum dos dias de tratamento.

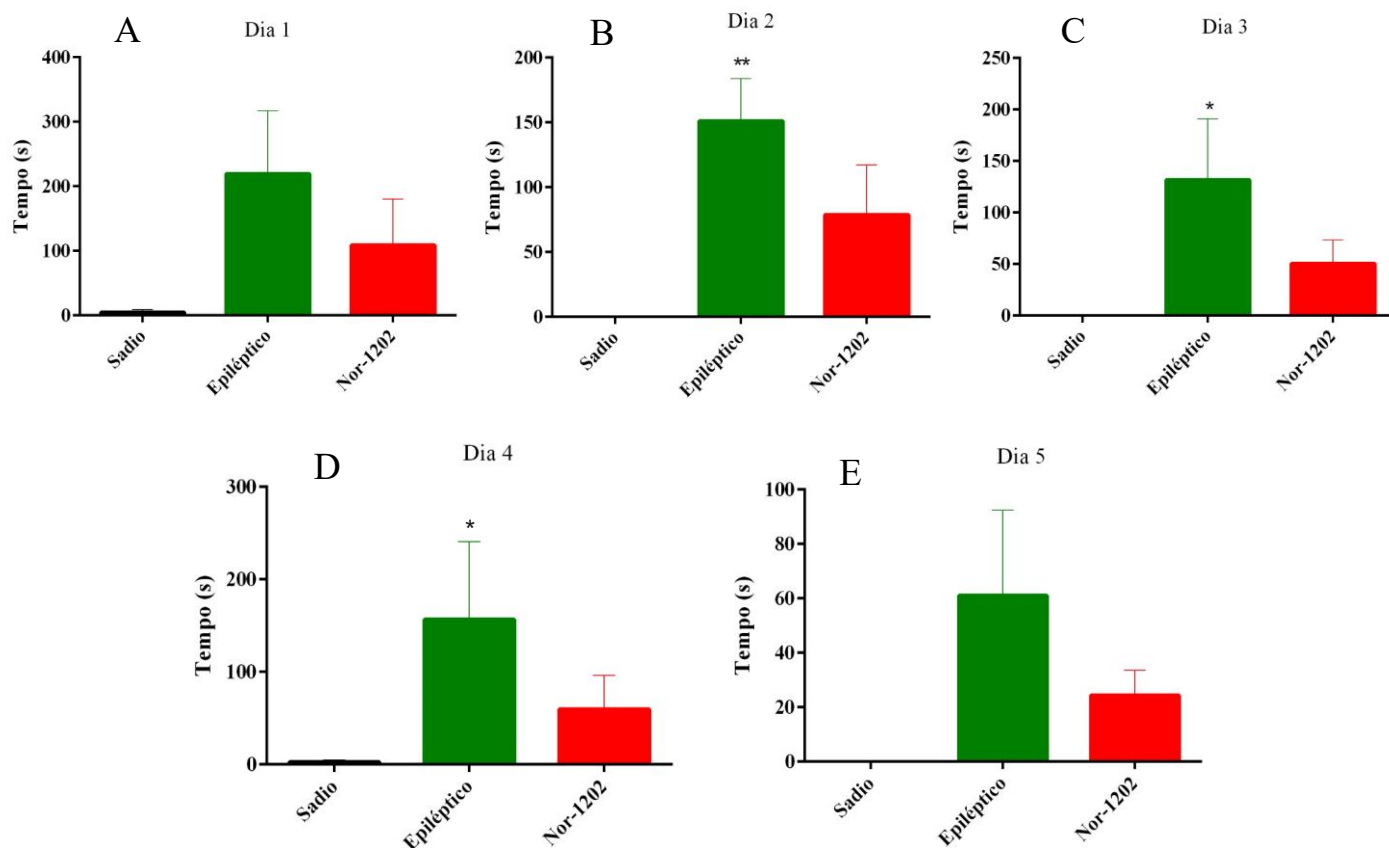


Figura 17. Tempo (segundos) de CREs em cada dia do período crônico após tratamento. (A) Dia 1. (B) Dia 2. (C) Dia 3. (D) Dia 4. (E) Dia 5. Dados submetidos ao teste Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn, $p < 0,05$. (*) e (**) Diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo sadio, $p < 0,05$ e $p < 0,01$ respectivamente.

A fim de se verificar se o peptídeo estaria sendo eliminado pelo organismo antes do fim das 10 horas de filmagem diárias e de uma melhor avaliação do efeito do peptídeo, foi feita a análise do tempo em segundos das CREs dividido em duas fases: fase imediata (cinco primeiras horas pós tratamento) e fase tardia (cinco últimas horas de filmagem) (Figura 18). O grupo tratado com o peptídeo não demonstrou diferenças estatisticamente significativas sobre o tempo de CREs dos animais nas fases imediata e tardia em nenhum dos dias de tratamento em relação aos grupos sadio e epiléptico.

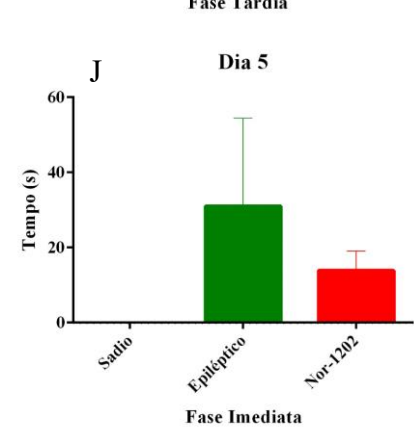
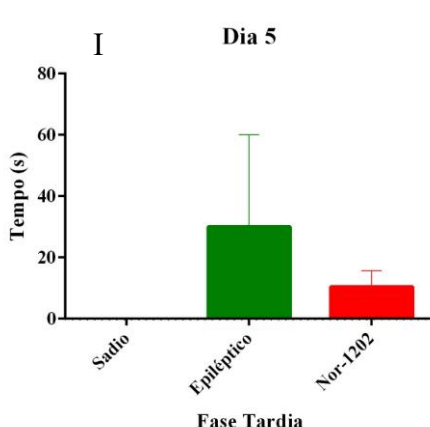
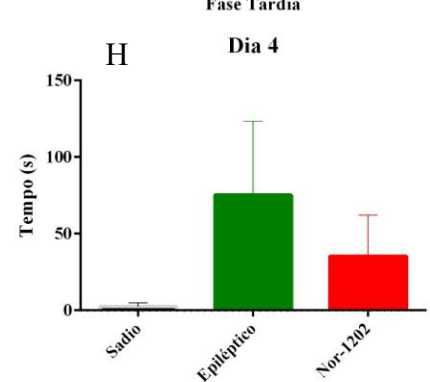
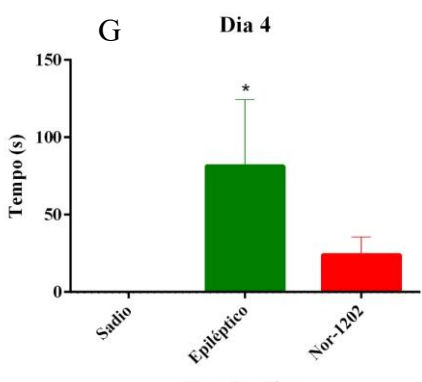
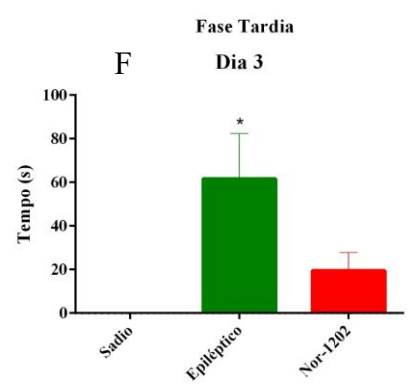
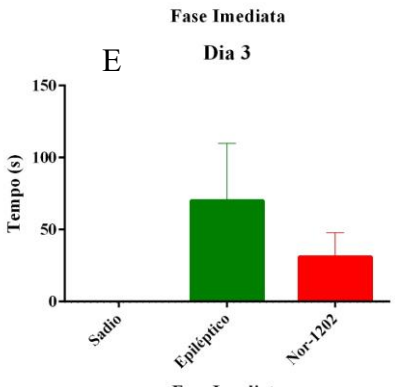
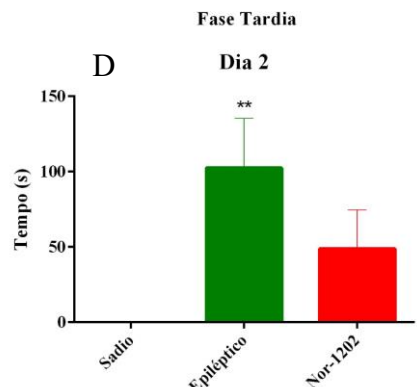
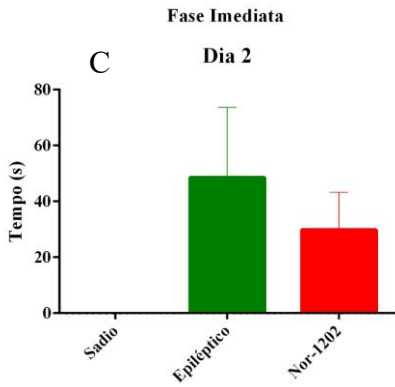
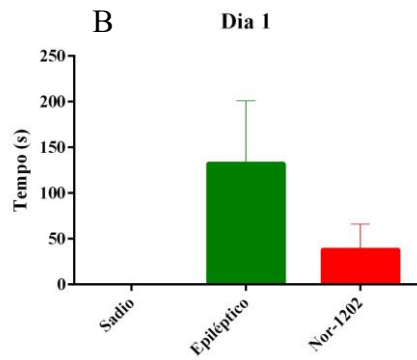
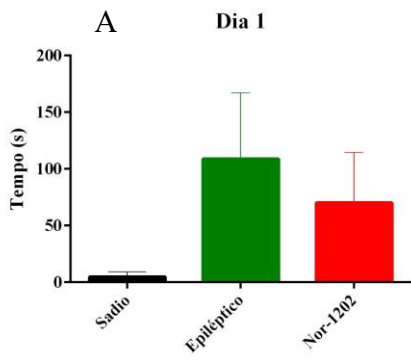


Figura 18. Duração das CREs (segundos) em cada fase de todo o período crônico. Fase imediata: primeiras cinco horas após o tratamento. Fase tardia: cinco horas restantes de observação. (A) Dia 1 fase imediata, Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn, $p < 0,05$. (B) Dia 1 fase tardia, Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn, $p < 0,05$. (C) Dia 2 fase imediata, ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de *Tukey* [$F(2,14) = 2,657$; $p < 0,05$]. (D) Dia 2 fase tardia, Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn, $p < 0,05$. (E) Dia 3 imediata, ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de *Tukey* [$F(2,14) = 2,066$; $p < 0,05$]. (F) Dia tardia, ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de *Tukey* [$F(2,14) = 7,998$; $p < 0,05$]. (G) Dia 4 imediata, Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn, $p < 0,05$. (H) Dia 4 tardia, Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn, $p < 0,05$. (I) Dia 5 imediata, ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de *Tukey* [$F(2,14) = 1,541$; $p < 0,05$]. (J) Dia 5 tardia, Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn, $p < 0,05$.

(*) e (**) Diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo sadio, $p < 0,05$ e $p < 0,01$ respectivamente

4.5.2. Número de CRE

Os dados obtidos quanto ao número total de CREs apresentadas pelos camundongos durante os cinco dias do período crônico foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn, sendo considerado $p < 0,05$ (Figura 19). Foram observadas diferenças significativas entre o grupo sadio e os grupos: epiléptico e nor-1202, $p < 0,05$.

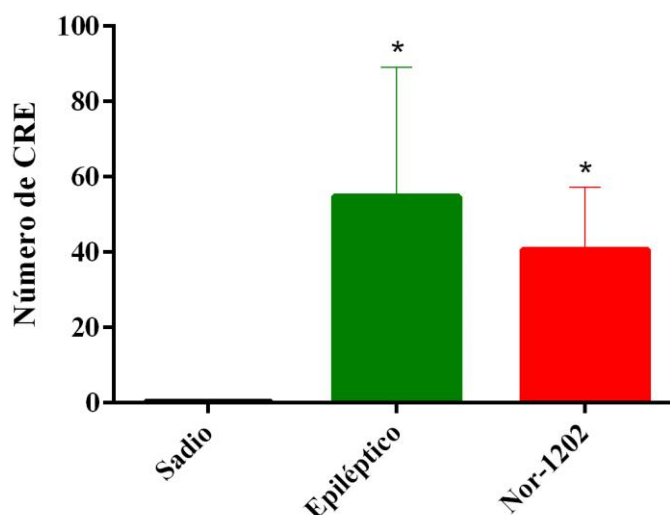


Figura 19. Número total de CREs durante os cinco dias do período crônico. Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn, sendo considerado $p < 0,05$.

(*) Diferença estatisticamente significativas em relação ao grupo sadio, $p < 0,05$.

Na figura 20 estão ilustrados os números de CREs que os grupos apresentaram em cada um dos cinco dias de tratamento do período crônico do modelo. Valores submetidos ao teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn, sendo considerado $p < 0,05$. No primeiro dia de tratamento não houve diferença do número de CREs entre os grupos. No dia 2 de tratamento, foi observada diferença entre o grupo sadio e os grupos: epiléptico e tratados com o peptídeo nor-1202 ($p < 0,05$). No dia 3 houve diferença entre o grupo sadio e o grupo epiléptico, $p < 0,05$, e nos dias 4 e 5 não houveram diferenças significativas entre os grupos analisados.

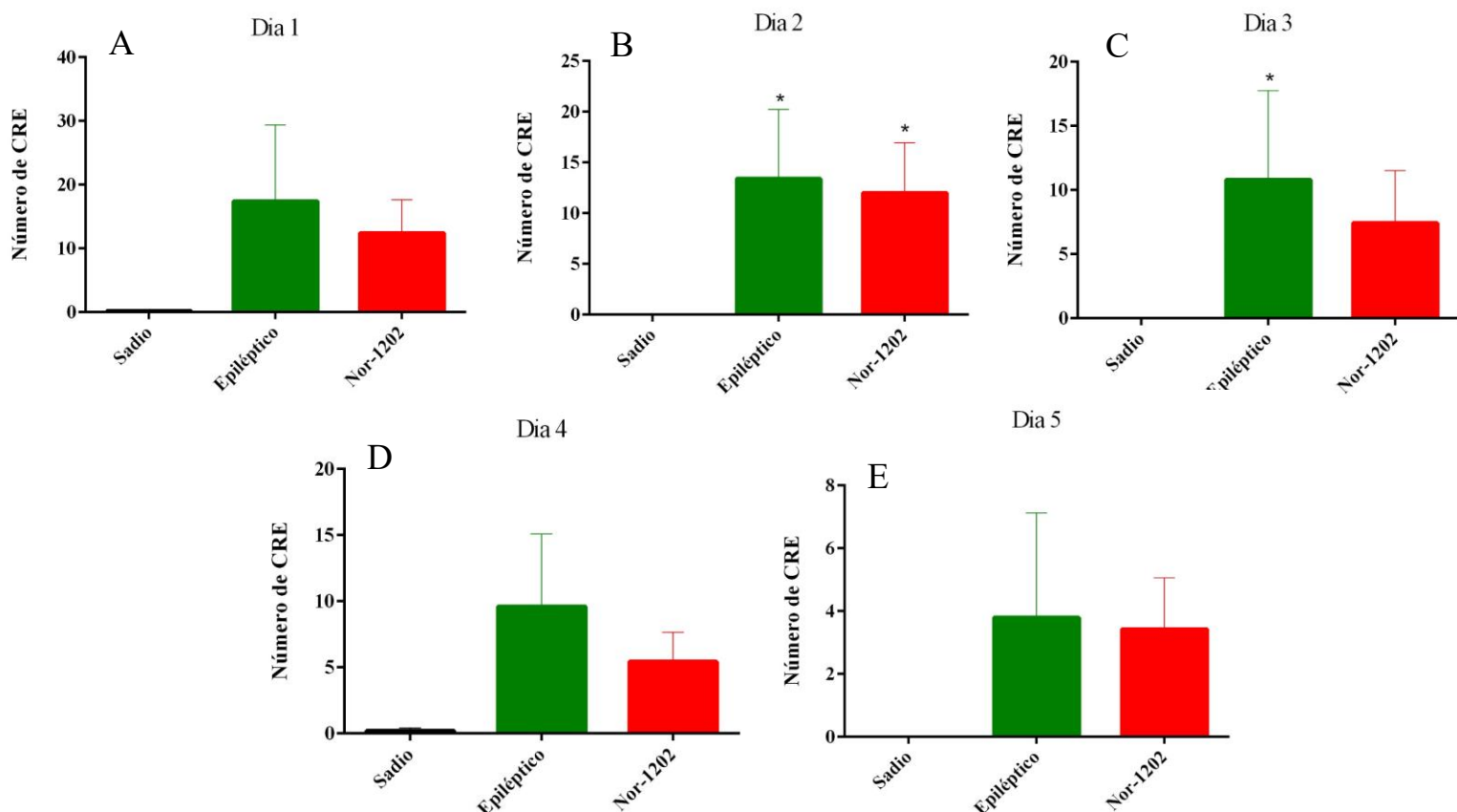


Figura 20. Número de CREs em cada dia do período crônico após tratamento. (A) Dia 1. (B) Dia 2. (C) Dia 3. (D) Dia 4. (E) Dia 5. Dados submetidos ao teste Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn, $p < 0,05$. (*) Diferença estatisticamente significativas em relação ao grupo sadio, $p < 0,05$.

Em relação a análise das CREs dividida temporalmente nas duas fases, imediata e tardia, o grupo sadio e o grupo epiléptico mostraram diferença significativa apenas na fase tardia do dia 3, $p < 0,05$. O grupo tratado com o peptídeo não mostrou diferença significativa quanto ao número de crises em relação ao grupo epiléptico em nenhuma das fases durante os cinco dias (Figura 21), mostrando que não houve diminuição do número de CREs com a administração do peptídeo nor-1202 independente de ser na fase imediata ou tardia.

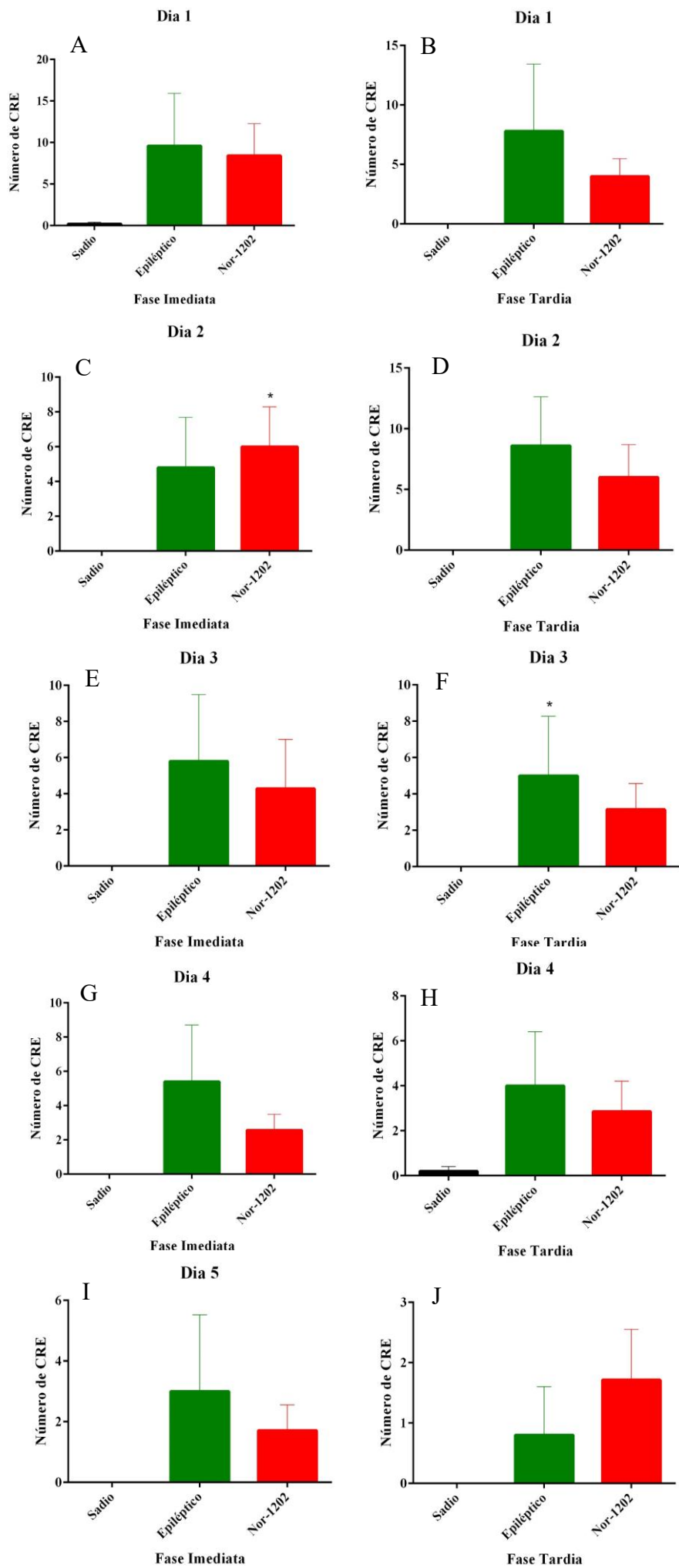


Figura 21. Número de CREs em cada fase de todo o período crônico. Fase imediata: primeiras cinco horas após o tratamento. Fase tardia: cinco horas restantes de observação.

(A) Dia 1 fase imediata, ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de *Tukey* [$F(2,14) = 1,740$; $p < 0,05$]. (B) Dia 1 fase tardia, Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn, $p < 0,05$. (C) Dia 2 fase imediata, Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn, $p < 0,05$. (D) Dia 2 fase tardia, ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de *Tukey* [$F(2,14) = 2,129$; $p < 0,05$]. (E) Dia 3 imediata, Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn, $p < 0,05$. (F) Dia 3 tardia, Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn, $p < 0,05$. (G) ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de *Tukey* [$F(2,14) = 2,016$; $p < 0,05$]. (H) Dia 4 tardia, ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de *Tukey* [$F(2,14) = 1,164$; $p < 0,05$]. (I) Dia 5 imediata, Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn, $p < 0,05$. (J) Dia 5 tardia, Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn, $p < 0,05$.

(*) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo sadio, $p < 0,05$.

5. Discussão

No contexto de desenvolvimento de novos peptídeos e potenciais fármacos bioinspirados de compostos naturais, a atividade antiepiléptica do peptídeo nor-1202 foi avaliada em roedores, seguindo modelos agudos de indução química de crises e em um modelo crônico de ELT. Mesmo modelos animais não representando a etiologia completa e a grande complexidade da doença em humanos, têm se mostrado úteis para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. Eles podem ser utilizados para identificação de novos FAEs, para se verificar a eficácia destes contra os diferentes tipos de crises e Epilepsias, e se verificar se os novos fármacos trazem alguma vantagem em relação aos já existentes no mercado, levando em consideração o tratamento das Epilepsias fármaco-resistentes. A maioria dos modelos animais utilizados para se estudar Epilepsia são modelos de crises epiléticas e não modelos de Epilepsia. Os modelos de crises epiléticas são modelos agudos, que não manifestam a condição crônica da doença com a ocorrência da epileptogênese e o aparecimento de CREs (Löscher, 2011).

A pilocarpina é um alcalóide extraído da planta *Pilocarpus jaborandi*, e age no SNC como um potente agonista colinérgico muscarínico, sendo capaz de induzir alterações comportamentais e eletroencefalográficas quando injetada sistemicamente em roedores, dose e tempo dependentes. As crises são relacionadas a um dano cerebral (SE) que se inicia em estruturas do sistema límbico, principalmente na formação hipocampal, e posteriormente se espalha por todo o encéfalo. Os neurônios piramidais da formação hipocampal são muito sensíveis a neurotoxicidade causada pela pilocarpina, levando a uma forte neurodegeneração (Turski *et al.*, 1983). A indução do SE parece depender da ativação de receptores muscarínicos do tipo M1, que causa um desequilíbrio entre a transmissão excitatória e inibitória. A pilocarpina induz um aumento nos níveis de glutamato no hipocampo após o início das crises, e assim, estas se mantêm pela ativação de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (Curia *et al.*, 2008).

Para identificação da capacidade antiepiléptica do peptídeo em questão, a pilocarpina foi utilizada no seu modelo agudo, para causar o desequilíbrio entre as cargas excitatórias e inibitórias cerebrais via ativação de receptores M1 e, assim, gerar os comportamentos de crises generalizadas nos camundongos. O fármaco DZP foi escolhido para ser o grupo controle positivo do estudo, afinal sua via de administração, injetável, o faz utilizável, ao contrário de outros anticonvulsivantes administrados por via oral. Sabe-se também que o DZP previne o desenvolvimento de comportamentos de crises límbicas generalizadas por indução de pilocarpina (Turski *et al.*, 1984). Neste

estudo, o DZP foi capaz de proteger 100% dos animais contra as crises máximas de classe 5 induzidas por pilocarpina e contra a morte.

Primeiro foram feitos ensaios com a infusão i.c.v. do peptídeo e veículo, a fim de se avaliar sua atividade antiepiléptica quando injetado diretamente no encéfalo, sem influências de barreiras biológicas ou de processos de metabolização. O peptídeo nor-1202 mostrou atividade contra crises induzidas por pilocarpina comparado ao grupo veículo (sem tratamento), tendo sua maior dose avaliada (6 µg/animal) protegendo 80% dos camundongos contra a crise máxima e a dose intermediária (3 µg/animal) 55,5%. A menor dose (0,3 µg/animal) foi diferente significativamente apenas do grupo DZP, não mostrando uma proteção. A dose de 6 µg/animal, nos animais que apresentaram a crise máxima, aumentou significativamente a latência para o estabelecimento desta crise. O aumento da latência para crises generalizadas, é um parâmetro escolhido no trabalho para a investigação de um possível novo FAE, afinal os fármacos disponíveis para a terapêutica que são ineficazes no tratamento de Epilepsias fármaco-resistentes, aumentam o tempo entre a ocorrência de crises (Löscher *et al.*, 2013).

A infusão i.c.v. do peptídeo, nas doses de 6 e 3 µg/animal também aumentou a sobrevivência dos animais. No caso dos camundongos que morreram mesmo infundidos com o peptídeo, este aumentou significativamente a latência para a morte, demonstrando que o peptídeo foi capaz de prevenir os camundongos de uma morte prematura, o que ocorreu no grupo controle negativo. Além do fato de que em todas as doses testadas a porcentagem de sobrevivência dos animais após a injeção de pilocarpina foi maior do que no grupo veículo, no qual apenas 12,5% dos animais sobreviveram aos 30 minutos de filmagem.

Após a atividade do nor-1202 contra crises agudas por indução de pilocarpina ser avaliada e confirmada, a próxima etapa do trabalho foi verificar se quando injetado sistemicamente o peptídeo também conseguiria proteger os sujeitos experimentais. Existem obstáculos biológicos para que um composto administrado de forma sistêmica consiga exercer sua atividade no SNC. Nos organismos estão presentes diversas barreiras biológicas, que dificultam a passagem e distribuição dessas substâncias para suas áreas de atividade. A maior barreira para fármacos que agem no SNC é a barreira hematoencefálica, que o separa da circulação sistêmica, mantendo a homeostase e protegendo-o de substâncias potencialmente nocivas (Pasha & Gupta, 2010). A passagem pela barreira hematoencefálica está diretamente ligada ao uso terapêutico de peptídeos, sendo que a lipofilicidade do composto tem grande influência no grau em que este vai conseguir atravessar essa barreira (Banks & Kastin, 1985).

Para esta verificação da atividade sistêmica do peptídeo foram utilizadas as vias intraperitoneal e subcutânea. Os dados mostraram que o nor-1202 não foi capaz de ter

atividade antiepiléptica quando administrado sistemicamente, já que em nenhuma das duas vias de administração avaliadas as concentrações do peptídeo (8 e 4 mg/kg, s.c.; 8mg/kg, i.p.) foram capazes de proteger os camundongos contra as crises máximas induzidas por pilocarpina. Sistemicamente, o peptídeo não aumentou a sobrevivência dos animais e não aumentou a latência para o estabelecimento das crises. Também não protegeu os animais da morte e nem aumentou a latência para a ocorrência deste evento.

Esses resultados sugerem que as alterações feitas na sequência de aminoácidos do nor-1202 o tornaram incapaz de ter atividade no SNC, quando injetado sistemicamente. Já seus análogos, o peptídeo sintetizado com a mesma sequência da OcTx-1202 e a neurovespina, foram capazes de proteger camundongos contra crises epilépticas induzidas por ácido caínico quando injetados por via i.p. na concentração de 4 mg/kg (Dos Anjos, 2013). A alteração na sequência do nor-1202 pode ter influenciado na sua penetração pelas barreiras biológicas, ou também fazendo com que o peptídeo seja metabolizado mais rapidamente pelo organismo do animal, não sendo possível sua biodisponibilidade no SNC.

O grupo veículo no ensaio com administração subcutânea teve uma latência para as crises máximas alta, não sendo diferente do grupo DZP. Este grupo controle negativo, teoricamente, teria que ter uma latência baixa para crises generalizadas, afinal nenhum composto com a finalidade de prevenir as crises foi injetado, apenas solução fisiológica, porém, isto não foi observado. Sabe-se que a carga genética do animal afeta a suscetibilidade dele às crises induzidas por convulsivantes químicos, como a pilocarpina (Schauwecker, 2012; Winawer *et al.*, 2007). A diferença na eficácia da pilocarpina em gerar crises generalizadas em diferentes linhagens de camundongos já foi observada, porém, os mecanismos disto ainda permanecem desconhecidos. Pode ser explicado em parte por diferentes níveis da expressão de glicoproteína-P na barreira hematoencefálica, que serve como mecanismo de proteção contra compostos estranhos ao organismo. Experimentos com animais *knockout* para o gene da glicoproteína-P mostraram que estes tiveram a atividade convulsivante da pilocarpina potencializada em comparação a animais selvagens (Römermann *et al.*, 2015).

Outro modelo de indução aguda de crises epilépticas utilizado foi a indução química por ácido caínico. O ácido caínico é um análogo do L-glutamato, exibindo uma maior afinidade por receptores de glutamato do tipo kainato (KA) expresso em bastante quantidade na formação hipocampal, permeáveis principalmente aos íons sódio e potássio, e em menor proporção aos íons cálcio (Wang *et al.*, 2005). Após ligação do ácido caínico ao KA, ocorre uma despolarização prolongada na célula, aumento da

excitação do circuito cerebral levando ao desequilíbrio de cargas com as manifestações comportamentais das crises epilépticas (De Deyn *et al.*, 1992).

O fármaco DZP foi capaz de proteger 100% dos animais contra a crise de classe 7 (crise máxima) provocadas por ácido caínico. O peptídeo nor-1202 não teve atividade protetora significativa contra as crises máximas em nenhuma das doses avaliadas (6; 3 e 0,3 µg/animal). Além de não protegerem os camundongos das crises generalizadas, as doses testadas também não diminuíram as latências para o estabelecimento destas. Isto mostra que o peptídeo foi realmente ineficaz contra crises induzidas por ácido caínico.

Porém, em relação a sobrevivência dos animais após o insulto com ácido caínico, as doses de 6 e 3 µg/animal tiveram diferenças estatísticas em relação ao grupo veículo, mostrando que o peptídeo foi capaz de proteger os camundongos da morte. E, mesmo os animais que não sobreviveram aos 30 minutos de filmagem, demoraram mais para o óbito, tendo suas latências para a morte aumentadas em todas as doses avaliadas.

Com estes resultados, o nor-1202 se mostrou com atividade contra crises causadas por pilocarpina que age por vias muscarínicas colinérgicas e pela ativação de receptores do tipo NMDA, porém contra um convulsivante químico que age aumentando diretamente a excitação glutamatérgica via receptor cainato, o ácido caínico, foi ineficiente.

Os peptídeos análogos ao nor-1202 não foram testados em modelo agudo de indução de crises por pilocarpina. A OcTx-1202 (Mortari, 2007) foi testada em ratos, após o fracionamento da peçonha bruta, injetada via i.c.v. em ensaios agudos com os convulsivantes PTZ (um antagonista não-competitivo dos receptores GABA-A) e ácido caínico. Nesses experimentos, o peptídeo induziu um potente efeito anticonvulsivante dose-dependente contra as crises induzidas por ácido caínico, com as doses de 1, 0,5 e 0,1 µg/animal protegendo os animais de forma significativa. As latências para início de crise máxima também tiveram um aumento significativo. Nos ensaios com PTZ, a maior dose testada apresentou diferenças significativas em relação ao grupo controle. O peptídeo sintetizado com a mesma sequência da OcTx-1202 (3 e 1,5 µg/animal) e o análogo, neurovespina (3; 1,5 e 0,15 µg/animal), quando testados no modelo agudo de ácido caínico em ratos, também demonstraram proteção contra a crise máxima generalizada e aumentaram a latência para esta, quando injetados via i.c.v (Dos Anjos, 2013).

A DE₅₀ para o peptídeo nor-1202 foi calculada apenas para a pilocarpina, afinal nenhuma das três doses avaliadas se mostraram efetivas contra crises induzidas pelo ácido caínico, não havendo diferença estatística entre estas, e assim, não seria possível

determinar sua curva dose-resposta e calcular sua dose efetiva 50. Foi escolhido o critério de porcentagem de sobrevivência dos animais para se calcular a DE₅₀ para pilocarpina pois nos dados da atividade do peptídeo neste modelo, houve diferença significativa entre as doses 6 e 0,3 µg/animal. Esta variação do efeito do peptídeo proporcional às doses administradas, valida a elaboração da curva dose-resposta.

Após a verificação de que o nor-1202 foi eficaz em proteger as crises no modelo agudo de pilocarpina quando injetado via i.c.v., foi feito o modelo crônico de ELT por pilocarpina, para se avaliar o efeito da DE₅₀ quando injetada via i.c.v. Esse modelo reproduz características eletroencefalográficas da Epilepsia, além de induzir um estado crônico de hiperexcitabilidade, e alterações histopatológicas como danos no lobo temporal, hipocampo, complexo amigdalóide e córtex entorrinal (brotamento de fibras musgosas, perda de interneurônios, reorganização dos circuitos sinápticos, gliose) (Minjarez et al., 2017).

A utilização de pilocarpina em modelos crônicos que mimetizam a ELT é bem descrita, e por isso foi escolhida para o presente estudo. Como ocorre em humanos, a pilocarpina causa um dano inicial, induzido pelo SE. A duração e a severidade do SE determina a severidade também da epileptogênese que será provocada nos animais (Sharma *et al.*, 2017). Neste trabalho foi escolhida uma duração de 3 horas, padrão experimental estabelecido no laboratório de estudo após diversos experimentos prévios que demonstraram que este tempo é capaz de causar o dano cerebral necessário para estabelecimento de CREs (Dos Anjos, 2017). Após os animais se restabelecerem deste quadro de SE, eles entram em um período latente sem crises com a ocorrência da epileptogênese de aproximadamente 15 dias. Nesta fase latente ocorrem as alterações histológicas, bioquímicas, as mortes neuronais em camadas da formação hipocampal, reorganização dos circuitos, e demais alterações que vão levar a uma predisposição para gerar atividade sincronizada. Assim, tornando o cérebro do animal em um cérebro epilético com CREs numa condição crônica (Cavalheiro *et al.*, 1991).

Para se estudar a atividade antiepilética do peptídeo no modelo de ELT, foram avaliadas as CREs na fase crônica de cinco dias, levando em consideração a duração (s) e a quantidade de crises durante 10 horas de gravação diárias. As gravações começavam às 9h da manhã, sendo assim, os camundongos foram filmados no período de maior ocorrência de CREs em roedores, que é o período diurno (Cavalheiro *et al.*, 1991; Arida *et al.*, 1999).

Os animais do grupo sadio, por não passarem pelo dano cerebral causado pelo SE, não se tornam epiléticos, e assim não apresentam CREs. Porém, por serem submetidos ao procedimento estereotático para implantação da cânula-guia, podem manifestar alguns comportamentos que se assemelham a crises epiléticas, por conta

do dano no tecido cerebral causado pela presença da cânula. Estes comportamentos não influenciam os dados experimentais, afinal todos os grupos passaram por este procedimento.

Em relação ao tempo total que os camundongos tiveram de CREs durante os cinco dias da fase crônica, o grupo epilético ficou significativamente mais tempo em CREs do que o grupo sadio. Porém, o grupo tratado com o peptídeo não mostrou diferenças em relação a nenhum dos dois grupos, permanecendo em crise durante um tempo intermediário. Observado o tempo de crise em cada um dos dias, nos dias 2, 3 e 4, o grupo epilético teve estatisticamente mais CREs do que o grupo sadio, e nesses dias o peptídeo também mostrou um efeito intermediário, não apresentando diferenças em relação ao grupo sadio nem ao doente.

Quanto ao número total de CREs que os animais tiveram durante os cinco dias do período crônico, os grupos epilético e tratado com peptídeo tiveram significativamente mais crises do que o grupo sadio. Com a análise separada por dia, foi possível observar que apenas no dia 2 do tratamento, o grupo nor-1202 apresentou significativamente mais crises do que o grupo sadio. Nos demais dias o grupo do peptídeo não se mostrou diferente do grupo sadio, e nem do grupo epilético.

Com esses resultados, a dose do peptídeo infundida nos animais, não obteve um potente efeito antiepilético, porém, se mostrou com efeito intermediário, não sendo diferente significativamente do grupo que não foi submetido ao SE, principalmente em relação ao tempo de CREs. Vale ressaltar, que a dose escolhida do nor-1202 para o modelo crônico de ELT foi a dose efetiva 50% (0,87 µg/animal), dose que produz em 50% do grupo experimental uma resposta relativa à eficácia do composto. Hipotetiza-se que a DE₅₀ do peptídeo, pode ter sido uma dose baixa, não conseguindo obter um forte efeito contra as CREs, afinal o peptídeo mostrou uma tendência a ter um efeito antiepilético. Para um maior efeito e melhor avaliação da atividade antiepilética do peptídeo, em estudos posteriores, sugere-se o uso da dose efetiva 90%. A DE₉₀ não foi calculada e utilizada neste trabalho, pois este é um estudo inicial da atividade do peptídeo, e não se conhece muito sobre os seus efeitos. Como no modelo crônico de ELT o tratamento foi feito diariamente durante cinco dias consecutivos, optou-se pela DE₅₀, uma dose menor da que seria a DE₉₀, a fim de se evitar possíveis efeitos tóxicos que uma dose alta poderia vir a causar aos animais.

Para avaliar se havia diferença na duração das CREs e na quantidade destas no período logo após os tratamentos, cinco primeiras horas de filmagem, e nas cinco últimas horas, a análise foi dividida em duas fases: imediata e tardia. Porém, o peptídeo não mostrou diferenças em nenhuma das duas fases, revelando que não houve diferenças na sua atividade logo após sua infusão em relação às cinco últimas horas de

filmagem, e assim, não houve influência de processos biológicos como a eliminação do peptídeo pelo organismo.

O outro peptídeo análogo à occidentalina, neurovespina, foi avaliado em um modelo crônico de ELT por pilocarpina (Dos Anjos, 2017), com uma fase crônica com duração de 15 dias. O peptídeo foi injetado via i.p. nos animais e as concentrações de 4; 2 e 1 mg/kg reduziram a frequência e duração das CREs nos camundongos durante todos os dias avaliados.

O peptídeo neuropolybina (Gomes, 2016) idêntico a um peptídeo isolado da peçonha da vespa *Polybia paulista* também foi estudado no modelo crônico de ELT por pilocarpina, tendo sua fase crônica de 5 dias, igual ao presente estudo. Este composto foi avaliado via i.c.v. nas doses de 3 e 0,6 µg/animal. A maior dose testada foi capaz de diminuir significativamente o tempo que os camundongos tiveram de CREs nos dias 1, 3, 4 e 5 do tratamento em relação aos animais do grupo epiléptico. Quanto ao número de CREs as duas doses não foram capazes de diminuir nos animais tratados.

Como já citado anteriormente, modelos agudos de crises não reproduzem a complexidade do quadro clínico da doença, e as crises são provocadas em um cérebro não epiléptico por estímulos específicos. Modelos agudos são geralmente utilizados como *screening* para novos FAEs (White & Löscher, 2014). Modelos crônico e agudos mimetizam condições diferentes, e os mecanismos biológicos que causam crises provocadas por um insulto agudo são consideravelmente diferentes dos que causam as crises recorrentes e espontâneas de um cérebro com características epiléticas (Löscher, 2002). O peptídeo foi capaz de proteger os animais contra crises máximas após a indução por pilocarpina, impedindo que o aumento da excitação nos circuitos neuronais causado pela pilocarpina ocorresse a ponto de virar uma crise generalizada. Porém, no modelo que mimetiza a condição clínica da doença, com suas consequências neuropatológicas, o peptídeo não mostrou um forte efeito antiepilético com a dose avaliada. Não sendo capaz de proteger vigorosamente os animais das CREs que surgiram no cérebro epiléptico por conta do aumento da excitabilidade e baixa do limiar para crises resultante da epileptogênese, que ocorre na condição de Epilepsia (Curia et al. 2008). Vale ressaltar, que a ELT é uma condição com muitos pacientes fármaco-resistentes (White & Löscher, 2014), e essa dificuldade de tratamento também é reproduzida no modelo animal de ELT.

Novos peptídeos desenhados a partir de compostos isolados de peçonhas têm surgido como bons candidatos para o desenvolvimento de novos fármacos, uma vez que, apresentam atividades diversas, tais como: antimicrobianos, analgésicos, anti-inflamatórios, antitumorais, citolíticos, antinociceptivos e antiepiléticos (Silva *et al.*, 2015). Ao sintetizar peptídeos se tem a oportunidade de modificar as estruturas dos

compostos já existentes por incorporação ou substituição de aminoácidos, com o fim de se melhorar algum aspecto em relação aos peptídeos análogos, e em muitos casos esses derivados sintéticos são mais potentes, mais seletivos aos alvos moleculares, ou mais estáveis do que os naturais (Sawyer, 2005).

O objeto de estudo deste trabalho foi um novo peptídeo bioinspirado da occidentalina-1202 isolado da peçonha da vespa social *P. Occidentalis*, que teve sua sequência modificada com a substituição dos aminoácidos metioninas por norleucinas. Muitos peptídeos biologicamente ativos com metionina na composição são suscetíveis a inativação por oxidação, já que esta afeta a estrutura, estabilidade e função biológica do composto, tornando-o instável (Badgett *et al.*, 2017). Essa oxidação da metionina se dá por causa da alta reatividade do átomo de enxofre em sua molécula, que é oxidado por espécies reativas de oxigênio (Horwell *et al.*, 1994). Para se evitar esta perda de atividade, análogos são sintetizados tendo suas metioninas substituídas por aminoácidos mais resistentes a oxidação (Kim *et al.*, 2001). A substituição por norleucinas é a mais utilizada na prática química de peptídeos, já que os dois aminoácidos têm volume e propriedades conformacionais semelhantes e os peptídeos modificados se mostram mais estáveis, uma vez que é feita a retirada do átomo de enxofre (Epand & Raymer, 1987; Pal & Chakrabarti, 2001). Como esta é uma substituição corriqueira no planejamento racional de peptídeos, acreditava-se que não causasse mudanças no efeito biológico dos peptídeos. Quando a metionina não faz parte de alguma cadeia catalítica ou de algum domínio de reconhecimento do peptídeo, as características de função e estrutura são normalmente mantidas (Radchenko *et al.*, 2016).

Porém, no atual trabalho foi possível observar que a substituição de metioninas e a presença de norleucinas alterou a atividade antiepiléptica do peptídeo. A alteração mudou a efetividade do peptídeo no modelo agudo de indução de crises por ácido caínico, já que o peptídeo natural ocTx-1202 e um outro análogo, neurovespina, protegeram os animais contra crises generalizadas neste modelo, e o nor-1202 não mostrou proteção. Além de modificar a capacidade do peptídeo de agir no SNC quando administrado sistemicamente, já que os mesmo outros dois peptídeos quando injetados por via i.p. mostraram atividade.

Para melhor entender o peptídeo nor-1202 uma maior avaliação do seu efeito antiepiléptico com doses maiores (ex.: DE₉₀) e uma avaliação acerca do perfil eletroencefalográfico do peptídeo no modelo crônico de ELT, já que esta complementa as observações comportamentais e as CREs deste modelo reproduzem padrões de crises observados em pacientes com ELT (Lévesque *et al.*, 2012).

6. Conclusões

- O peptídeo nor-1202 quando injetado via intracerebroventricular foi capaz de proteger os animais contra crises generalizadas e contra o óbito no modelo agudo de pilocarpina.
- Quando injetado sistemicamente, por vias subcutânea e intraperitoneal, o peptídeo não apresentou atividades no modelo agudo de pilocarpina.
- No modelo agudo de ácido caínico, o peptídeo nor-1202 não protegeu os animais contra a crise generalizada, porém protegeu contra o óbito.
- Com a DE_{50} não foi possível observar um grande efeito antiepiléptico no modelo de ELT, mas o peptídeo mostrou atividade intermediária em relação ao tempo que os animais permaneceram tendo crises.
- A modificação na sequência de aminoácidos do peptídeo OcTx-1202 com a retirada das metioninas para substituição por norleucinas mudou a atividade antiepiléptica deste composto e sua capacidade de agir no SNC quando injetado sistemicamente.

7. Referências Bibliográficas

Abou-Khalil, B. W. Antiepileptic Drugs. *Continuum (Minneap. Minn)*. 22, 132–56 (2016).

Alves, G. In vitro and in vivo experimental models employed in the discovery and development of antiepileptic drugs for pharmaco-resistant epilepsy. *Epilepsy Research* (2018).

Andersen P. *et al.* Historical Perspective: Proposed Functions, Biological Characteristics, and Neurobiological Models of the Hippocampus. The hippocampus book. *Oxford University Press*: 9-31 (2006).

Annegers, J. F., Rocca, W. A. & Hauser, W. A. Causes of epilepsy: contributions of the Rochester epidemiology project. *Mayo Clin Proc* 71, 570–575 (1996).

Arida, R. M. *et al.* The course of untreated seizures in the pilocarpine model of epilepsy. *Epilepsy Res.* 34: 99-107 (1999).

Asadi-Pooya, A. A. & Rostami, C. History of surgery for temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Behav.* 70, 57–60 (2017).

Banks, A., & Kastin, A. J. Peptides and the Blood-Brain Barrier: Lipophilicity as a Predictor of Permeability, 15, 287–292 (1985).

Badgett, M. J., *et al.* The Separation and Quantitation of Peptides and Deamidation of Asparagine Using Hydrophilic, 818–826 (2017).

Beghi, E. Addressing the burden of epilepsy: Many unmet needs. *Pharmacol. Res.* 107, 79–84 (2016).

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* 51, 676–685 (2010).

Berg, A. T. & Scheffer, I. E. New concepts in classification of the epilepsies: Entering the 21st century. *Epilepsia* 52, 1058–1062 (2011).

- Bernstein, A. *et al.* Health, United States, 2010: With special feature on death and dying. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention, 2011-1232 (2010).
- Bialer, M. & White, H. S. Key factors in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9, 68–82 (2010).
- Bielefeld, P. *et al.* A standardized protocol for stereotaxic intrahippocampal administration of kainic acid combined with electroencephalographic seizure monitoring in mice. *Front. Neurosci.* 11, 1–9 (2017).
- Boer, H. M., . *et al.* The global burden and stigma of epilepsy. *Epilepsy Behav.* 12, 540–546 (2008).
- Bora, E. & Meletti, S. Social cognition in temporal lobe epilepsy: A systematic review and meta-analysis. *Epilepsy Behav.* 60, 50–57 (2016).
- Brodie, M. J. *et al.* Epilepsy , Antiepileptic Drugs , and Aggression : An Evidence-Based Review s. (2016).
- Castro, F.F.M. *et al.* Biochemical properties and study of antigenic crossreactivity between Africanized honey bee and wasp venom. *J. Invest. Allergol. Clin. Immunol* (1994).
- Cavalheiro, E. A. *et al.* Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. *Epilepsia.* 32: 778-82 (1991).
- Cavazos, J. E. & Cross, D. J. The role of synaptic reorganization in mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Behav.* 8, 483–493 (2006).
- Clifford, D.B., *et al.* The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures. *Neuroscience* 23, 953–968 (1987).
- Corona, M. *et al.* A novel class of peptide found in scorpion venom with neurodepressant effects in peripheral and central nervous system of the rat. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1649(1), 58–67 (2003).
- Cross, J. H. Setting the scene: Definition of prolonged seizures, acute repetitive seizures, and Status epilepticus. Do we know why seizures stop? *Epileptic Disord.* 16, S2–S5 (2014).

- Curia, G., Longo, D., Biagini, G., Jones, R. S. G. & Avoli, M. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J. Neurosci. Methods* 172, 143–157 (2008).
- Dalic, L. & Cook, M. J. Managing drug-resistant epilepsy: Challenges and solutions. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 12, 2605–2616 (2016).
- De Deyn, P.P. *et al.* Chemical models of epilepsy with some reference to their applicability in the development of aniconvulsants. *Epilepsy Reserch* 12: 87-110 (1992).
- Dos Anjos, L. C. Avaliação da atividade antiepiléptica e da expressão neuronal de c-fos de dois peptídeos sintetizados a partir da Occidentalina-1202 isolada da vespa social *Polybia occidentalis*. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília (2013).
- Dos Anjos, L. C. Atividade antiepiléptica e neuroprotetora do peptídeo neurovespina em um modelo crônico de Epilepsia do Lobo Temporal e avaliação da sua toxicidade aguda em camundongos Swiss. Tese de Doutorado. Universidade de Brasília (2017).
- Epand, R. M. & Raymer, K. E. Comparison of the interaction of methionine and norleucine-containing peptides with phospholipid bilayers. *Int. J. Pept. Protein Res.* 30, 515–521 (1987).
- Essack, M. *et al.* Conotoxins that confer therapeutic possibilities. *Marine Drugs*, 10(6), 1244–1265 (2012).
- Falco-Walter, J. J., *et al.* The new definition and classification of seizures and epilepsy. *Epilepsy Res.* 139, 73–79 (2018).
- Fisher, R. S. *et al.* ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* 55, 475–482 (2014).
- Fisher, R. S. *et al.* Epileptic seizures and epilepsy: Definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia* 46, 470–472 (2005).
- French, J. A. & Gazzola, D. M. New generation antiepileptic drugs: What do they offer in terms of improved tolerability and safety? *Ther. Adv. Drug Saf.* 2, 141–158 (2011).

- Gao, B., *et al.* Cone Snails: A Big Store of Conotoxins for Novel Drug Discovery. *Toxins*. 397 (9) (2017).
- Gao, L., *et al.* Burden of epilepsy: A prevalence-based cost of illness study of direct, indirect and intangible costs for epilepsy. *Epilepsy Res.* 110, 146–156 (2015).
- Gomes, F. M. M. Avaliação antiepiléptica do peptídeo Neuropolybina no modelo crônico de Epilepsia do lobo temporal induzido por pilocarpina em camundongos. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília. (2016).
- Green, B. R. *et al.* Analgesic neuropeptide W suppresses seizures in the brain revealed by rational repositioning and peptide engineering. *ACS Chemical Neuroscience*, 2(1), 51–56 (2011).
- Gross, R. A. A brief history of epilepsy and its therapy in the western hemisphere. *Epilepsy Res.* 12, 65–74 (1992).
- Han, T. *et al.* Conus Venoms - A Rich Source of Peptide-Based Therapeutics. *Current Pharmaceutical Design*, 14(24), (2008).
- Hauser, R. M., *et al.* The Epigenetics of Epilepsy and Its Progression. *Neurosci.* (2017).
- Horwell, D. C. *et al.* Methionine replacements in biologically active peptides, 4(19), 2263–2266 (1994).
- Hu, Q. *et al.* Efficacy and safety of antiepileptic drugs for refractory partial-onset epilepsy: a network meta-analysis. *J. Neurol.* 265, (2017).
- ILAE, disponível em <<https://www.ilae.org/>> . Acesso em Março, 2019.
- Jackson, H. C., & Scheideler, M. A. Behavioural and anticonvulsant effects of Ca⁺⁺ channel toxins in DBA/2 mice. *Psychopharmacology* 126(1), 85–90 (1996).
- Jeanne, R. L. Evolution of social behavior in the Vespidae. *Annu. Rev. Entomol.* 25, 371–396 (1980).
- Khomane, K. S. *et al.* Mechanistic insights into PEPT1-mediated transport of a novel antiepileptic, NP-647. *Molecular Pharmaceutics*, 9(9), (2012).
- Kiernan, J. A. Anatomy of the Temporal Lobe. *Epilepsy Res. Treat.* 2012, 1–12 (2012).

- Kim, Y. H., *et al.* Comparing the effect on protein stability of methionine oxidation versus mutagenesis: steps toward engineering oxidative resistance in proteins, 14(5), 343–347 (2001).
- King, G. F. Venoms as a platform for human drugs: translating toxins into therapeutics. *Expert Opin. Biol. Ther.* 11, 1469–1484 (2011).
- Kotwas, I., . *et al.* Stress regulation in drug-resistant epilepsy. *Epilepsy Behav.* 71, 39–50 (2017).
- Krall, R. L. *et al.* Antiepileptic drug development: I. History and a program for progress. *Epilepsia* 19, 393–408 (1978).
- Kwan, P. *et al.* Drug-resistant epilepsy. *N Engl J Med* 365, 919–926 (2011).
- Kwan, P. *et al.* Definition of drug resistant epilepsy: Consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia* 51, 1069–1077 (2010).
- LaPenna, P. & Tormoehlen, L. M. The Pharmacology and Toxicology of Third-Generation Anticonvulsant Drugs. *J. Med. Toxicol.* 13, 329–342 (2017).
- Ledri, M. *et al.* Differential Effect of Neuropeptides on Excitatory Synaptic Transmission in Human Epileptic Hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 35(26), 9622–9631 (2015).
- Lévesque, M. *et al.* Two seizure-onset types reveal specific patterns of high-frequency oscillations in a model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* (2012).
- Lidster, K. *et al.* Opportunities for improving animal welfare in rodent models of epilepsy and seizures. *J. Neurosci. Methods* 260, 2–25 (2016).
- Lopes-aguiar, C. *et al.* Animal models of epilepsy: use and limitations. 1693–1705 (2014).
- Löscher, W. Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease-modifying drugs. A comparison of the pharmacology of kindling and post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 50: 105-123, (2002).


- Löscher, W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure* 20, 359–368 (2011).
- Löscher, W. *et al.* New avenues for anti-epileptic drug discovery and development. *Nat. Rev. Drug Discov.* 12, 757–776 (2013).
- Łuszczki, J. J. Third-generation antiepileptic drugs: Mechanisms of action, pharmacokinetics and interactions. *Pharmacol. Reports* 61, 197–216 (2009).
- Macleod, S. & Appleton, R. E. The new antiepileptic drugs. *Arch Dis Child Educ Pr. Ed* 92, 182–188 (2007).
- Mameniskiene, R. *et al.* People with epilepsy lack knowledge about their disease. *Epilepsy Behav.* 46, 192–197 (2015).
- Metcalf, C. S. *et al.* Preclinical evaluation of intravenous NAX 810-2, a novel GalR2-preferring analog, for anticonvulsant efficacy and pharmacokinetics. *Epilepsia*, 58(2), 239–246 (2017).
- Minjarez, B. *et al.* Behavioral changes in models of chemoconvulsant-induced epilepsy: A review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 83, 373–380 (2017).
- Mortari, M. R. *et al.* Inhibition of acute nociceptive responses in rats after i.c.v. injection of Thr 6-bradykinin, isolated from the venom of the social wasp, *Polybia occidentalis*. *Br. J. Pharmacol.* 151, 860–869 (2007).
- Mortari, M. R. *et al.* Neurotoxins from invertebrates as anticonvulsants: From basic research to therapeutic application. *Pharmacol. Ther.* 114, 171–183 (2007).
- Mortari, M. R. Atividade neurobiológica e caracterização química da peçonha da vespa social *Polybia occidentalis* (Hymenoptera, Vespidae): identificação de peptídeos antinociceptivos e anticonvulsivantes. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo- Ribeirão Preto (2007).
- Mortari, M. R. *et al.* Anticonvulsant and behavioural effects of the denatured venom of the social wasp *Polybia occidentalis* (Polistinae, Vespidae). *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 97, 289–295 (2005).

- Navidhamidi, M. *et al.* Epilepsy-associated alterations in hippocampal excitability. *Rev. Neurosci.* 28, 307–334 (2017).
- Nickels, K. C. & Wirrell, E. C. Stiripentol in the Management of Epilepsy. *CNS Drugs.* (2017).
- Nirwan, N., Vyas, P., & Vohora, D. Animal models of status epilepticus and temporal lobe epilepsy : a narrative review. (2018).
- O'Dell, C. M., *et al.* Understanding the basic mechanisms underlying seizures in mesial temporal lobe epilepsy and possible therapeutic targets: A review. *J. Neurosci. Res.* 90, 913–924 (2012).
- Oyrer, J. *et al.* Ion Channels in Genetic Epilepsy: From Genes and Mechanisms to Disease-Targeted Therapies. *Pharmacol. Rev.* 70, 142–173 (2018).
- Pal, D. & Chakrabarti, P. Non-hydrogen Bond Interactions Involving the Methionine Sulfur Atom Non-hydrogen Bond Interactions Involving the Methionine Sulfur Atom. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 37–41 (2012).
- Pasha, S., & Gupta, K. Various drug delivery approaches to the central nervous system, 113–135 (2010).
- Pearson-Smith, J. N. *et al.* Oxidative Stress Contributes to Status Epilepticus Associated Mortality. *Neurochem. Res.* 42, 2024–2032 (2017).
- Pinheiro, A. C. *et al.* Neuroprotective effect on brain injury by neurotoxins from the spider *Phoneutria nigriventer*. *Neurochem Int* 49(5), 543–547 (2006).
- Radchenko, D. S. *et al.* Does a methionine-to-norleucine substitution in PGLa influence peptide-membrane interactions? *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1858, 2019–2027 (2016).
- Radzik, I. *et al.* Prospects of epileptogenesis prevention. *Pharmacol. Reports* 67, 663–668 (2015).
- Robertson, C. R. *et al.* Anticonvulsant neuropeptides as drug leads for neurological diseases. *Natural Product Reports*, 28(4), 741 (2011).

- Romermann, K. et al. Pilocarpine-Induced Convulsive Activity Is Limited by Multidrug Transporters at the Rodent Blood-Brain Barrier. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 353(2), 351–359 (2015).
- Sawyer, T. K. *Synthetic Peptides : Chemistry , Biology , and Drug Design Keywords*. 14, (2005).
- Schauwecker, P. E. Following Pilocarpine-Induced Status Epilepticus, 45(1), 297–304 (2013).
- Scheffer, I. E. et al. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia* 58, 512–521 (2017).
- Scott, R. C. Prolonged Epileptic Seizures : What are the effects of prolonged seizures in the brain ? *Epileptic Disord* 16, 6–11 (2014).
- Seidenberg, M. et al. Cognitive progression in epilepsy. *Neuropsychol. Rev.* 17, 445–454 (2007).
- Sharma, S. et al. Glial source of nitric oxide in epileptogenesis: A target for disease modification in epilepsy. *J. Neurosci. Res.* 1–15 (2017).
- Silva, J. et al. Pharmacological alternatives for the treatment of neurodegenerative disorders: Wasp and bee venoms and their components as new neuroactive tools. *Toxins (Basel)*. 7, 3179–3209 (2015).
- Simonato, M. et al. Identification and characterization of outcome measures reported in animal models of epilepsy: Protocol for a systematic review of the literature—A TASK2 report of the AES/ILAE Translational Task Force of the ILAE. *Epilepsia* 58, 68–77 (2017).
- Sloviter, R. S., & Bumanglag. A. V. Defining “epileptogenesis” and identifying “antiepileptogenic targets” in animal models of acquired temporal lobe epilepsy is not as simple as it might seem. *Neuropharmacology* 69, 3-15 (2012).
- Strine, T. W. et al. Psychological distress, comorbidities, and health behaviors among U.S. adults with seizures: Results from the 2002 National Health Interview Survey. *Epilepsia* 46, 1133–1139 (2005).

- Taylor, R. S. *et al.* Predictors of health-related quality of life and costs in adults with epilepsy: A systematic review. *Epilepsia* 52, 2168–2180 (2011).
- Thom, M. Review: Hippocampal sclerosis in epilepsy: A neuropathology review. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 40, 520–543 (2014).
- Turski, W. A. *et al.* Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: Behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav. Brain Res.* 9, 315–335 (1983).
- Turski W.A. *et al.* Seizures produced by pilocarpine in mice: a behavioral, electroencephalographic and morphological analysis. *Brain Res* 2, 237-253 (1984).
- Varilly, P. & Chandler, D. NIH Public Access. v, 265–275 (2012).
- Wang Q.S. *et al.* Kainic acid-mediated excitotoxicity as a model for neurodegeneration. *Molecular Neurobiology* 31(1–3):3-16 (2005).
- Winawer, M. R. *et al.* Susceptibility Loci in Mice, 18(1), 23–31 (2009).
- White, H. S. & Löscher, W. Searching for the Ideal Antiepileptogenic Agent in Experimental Models: Single Treatment Versus Combinatorial Treatment Strategies. *Neurotherapeutics* 11, 373–384 (2014).
- Yin, N., *et al.* Anticonvulsant Met-Enkephalin Analogues Containing Backbone Spacers Reveal Alternative Non-Opioid Signaling in the Brain. *Acs Chemical Biology*, 4(8), 659-671 (2009).
- Younus, I., & Reddy, D. S. A resurging boom in new drugs for epilepsy and brain disorders. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 11(1), 27–45 (2018).
- Zhang, F.; *et al.* BmK AEP, an Anti-Epileptic Peptide Distinctly Affects the Gating of Brain Subtypes of Voltage-Gated Sodium Channels. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 729 (2019).
- Zhou, X. H. *et al.* Purification and N-terminal partial sequence of anti-epilepsy peptide from venom of the scorpion *Buthus martensii* Karsch. *Biochem J* 257(2), 509–517 (1989).

8. Anexos






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

Brasília, 12 de julho de 2017.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPILEPTICA DE DOIS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS OBTIDOS A PARTIR DA PEÇONHA DE VESPAS SOCIALIS", Protocolo n.º 17/2017, sob responsabilidade da Professora Márcia Renata Mortari foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de: Mus musculus (120 machos). A presente aprovação é válida pelo período de: 12/7/2017 a 17/3/2020.



Prof. Dra. Paula Diniz Galera
Coordenadora da CEUA – UnB



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



AminoTech Pesquisa e Desenvolvimento Ltda.

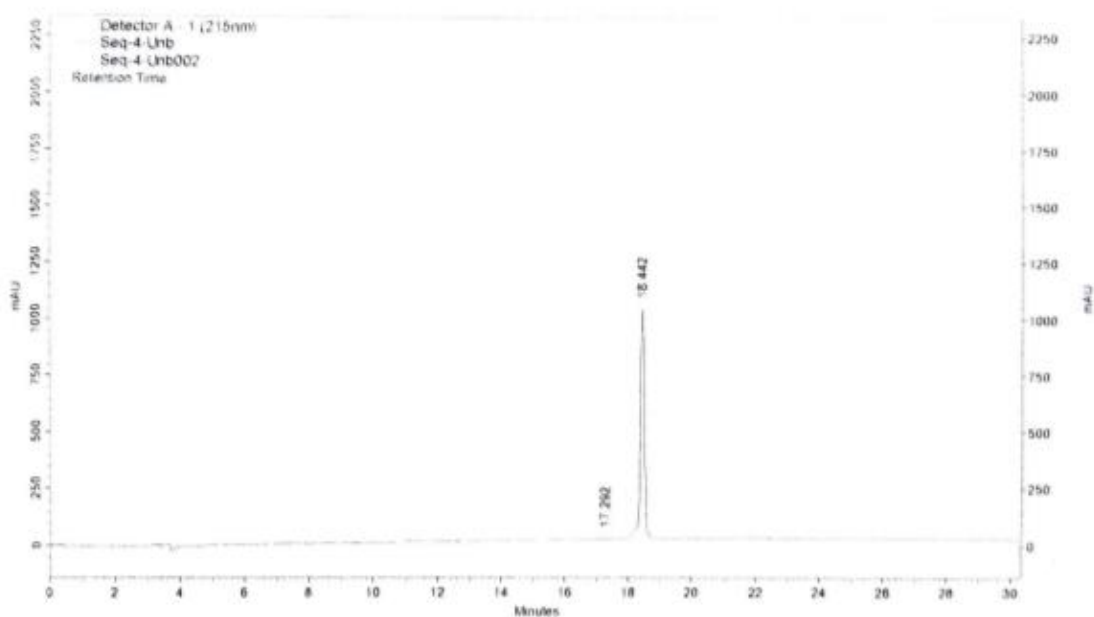
Av. Das Ameixeiras, 921- sala 2 - Diadema - São Paulo - SP

CEP: 09940-400. Telefone: (11) 3798-8179

www.aminotech.net.br; e-mail: vendas@aminotech.net.br

Laudo de Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Glu-Gln-Tyr-Nle-Val-Ala-Phe-Trp-Nle-NH₂ (Lot.# PC11004)



Detector A - 1 (215nm)

Pk #	Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
1	17,292	314999	3,068	6263	0,605
2	18,442	9950620	96,932	1028327	99,395
Totals		10265619	100,000	1034590	100,000

Condições de análise:

Amostra: 10 µL de uma solução 1 mg/mL – Coluna: RP-C18, 4.6x150 mm - Fluxo: 1 mL/min

Solventes: **A** = TFA 0,1%; **B** = CH₃CN/H₂O 9:1 com 0,1% de TFA

Detector: UV, λ₁ = 215 nm - Gradiente: 5-100% de B em 25 min



AminoTech Pesquisa e Desenvolvimento Ltda.

Av. Das Ameixeiras, 921- sala 2 - Diadema - São Paulo - SP

CEP: 09940-400. Telefone: (11) 3798-8179

www.aminotech.net.br, e-mail: vendas@aminotech.net.br

Laudo de Análise por Espectrometria de Massas

Glu-Gln-Tyr-Nle-Val-Ala-Phe-Trp-Nle-NH₂ (Lot.# PC11004)

