



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

HELENA DE CARVALHO SCHUCH

MARCADORES ELETROFISIOLÓGICOS EM CONVULSÕES EPILEPTIFORMES  
INDUZIDAS POR PENTILENOTETRAZOL (PTZ)

Dissertação apresentada como requisito parcial para a  
obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde  
pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da  
Saúde da Universidade de Brasília.

Orientador: Fabio Viegas Caixeta

BRASÍLIA  
2022

HELENA DE CARVALHO SCHUCH

MARCADORES ELETROFISIOLÓGICOS EM CONVULSÕES EPILEPTIFORMES  
INDUZIDAS POR PENTILENOTETRAZOL (PTZ)

Dissertação apresentada como requisito parcial para a  
obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde  
pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da  
Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovada em 19 de maio de 2022

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Fabio Viegas Caixeta (Presidente)  
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Hindiael Aeraf Belchior  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Profa. Dra. Ana Carolina Mortari  
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Jair Trapé Goulart (Suplente)  
Universidade de Brasília

*Dedico à minha família, que é minha base e minha força,  
E ao meu noivo, companheiro de todos os momentos.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, que sempre me ofereceu amparo nos momentos de dificuldade, e foi exemplo de força e determinação para o alcance de meus objetivos. Em especial, à Suely, minha mãe, que me foi amiga, conselheira e fonte de suporte durante toda essa caminhada, e ao Guilherme, meu noivo. Agradeço ao meu pai, Flávio, que me apoiou e incentivou à carreira acadêmica; aos meus irmãos, Fernanda e Augusto, e à minha prima-irmã, Isadora, pelos conselhos e pelo apoio incondicional. Também à Ivone, minha segunda mãe, que auxiliou em minha criação.

Agradeço aos meus amigos por me acolherem em suas vidas, pelas risadas, e por sempre vibrarem junto comigo. Especialmente, agradeço à minha melhor amiga, Cibelle, e aos amigos que cultivei a partir do grupo de pesquisa do laboratório: Mariana, Bruna Carvalho, Luana, Pedro Henrique, Fernando e Isabella. Esse trabalho só foi possível devido à presença desses parceiros de pesquisa.

Agradeço ao meu orientador, Fábio Viegas Caixeta, que também foi meu amigo e sempre confiou em meu potencial. Obrigada por me acolher em seu recém estabelecido laboratório, ainda durante a minha graduação e pelos últimos seis anos. Completo esses três anos e quatro meses de mestrado com orgulho e com a consciência de que aprendi muito e me tornei, de fato, uma pesquisadora por meio de seus ensinamentos.

Agradeço à professora Dra. Marcia Renata Mortari, por ceder o espaço do NeuroPharmaLab (Laboratório de Neurofarmacologia da Universidade de Brasília), me acolhendo em seu laboratório e em sua rotina de trabalho. Somente por meio da disponibilidade e colaboração da prof. Dra. Márcia e de sua equipe, que me ensinaram as técnicas aqui utilizadas, foi possível realizar esse trabalho.

Também agradeço aos pesquisadores e mentores: Dr. Rafael Plakoudi Souto Maior, Dra. Isabela Almeida Viana Ramos e Dr. Danilo Gustavo Rodrigues de Oliveira. Obrigada por compartilharem seus conhecimentos comigo.

Por fim, sou grata ao suporte financeiro da CAPES, do CNPq, da UnB e da FAP-DF.

“If I have seen further it is by standing on the shoulders of Giants”  
*(Isaac Newton)*

## RESUMO

A epilepsia é uma doença crônica multifatorial de gravidade variável, caracterizada por um limiar mais baixo para excitação de circuitos neuronais. Essa redução do limiar excitatório de redes neuronais desencadeia convulsões recorrentes, e gera consequências neurobiológicas, cognitivas, psicológicas e sociais. A doença apresenta maior incidência em países em desenvolvimento, e está associada a uma taxa de 30% de resposta refratária aos medicamentos disponíveis. Fica evidente, então, a necessidade por tratamentos alternativos, de melhor relação custo-benefício e baseados na fisiopatologia da doença. O jejum consiste em um tratamento alternativo com muito potencial, embora pouco explorado por apresentar resultados variáveis na literatura. Para viabilizar estudos sobre os possíveis efeitos do jejum sobre crises epileptiformes (e o envolvimento do sistema endocanabinóide nesse mecanismo), este trabalho apresenta a implementação de uma metodologia para avaliação completa dos efeitos do jejum em crises epileptiformes agudas, tanto em aspectos neurais quanto comportamentais. Neste estudo, nove ratos Wistar receberam doses de 70 mg/kg do convulsivante Pentilenotetrazol (PTZ). Para os bioensaios de indução de crises epileptiformes, uma cânula foi implantada cirurgicamente no ventrículo lateral direito de cada rato e cinco eletrodos craniais foram posicionados acima dos córtices cerebrais frontal, parietal e occipital. Após a recuperação da cirurgia, os ratos foram conectados a um sistema de gravação de vídeo-EEG sem fio. Os dados comportamentais foram classificados de acordo com a escala revisada de Racine para crises epileptiformes induzidas por PTZ proposta por Van Erum et al. (2019). Os perfis de registro eletroencefalográfico (EEG) foram inspecionados visualmente, por meio de rotinas de código MATLAB desenvolvidas para a definição de correlatos neuronais de crises epileptiformes comportamentais. Os dados coletados replicam os padrões eletrofisiológicos reportados na literatura, viabilizando pesquisas futuras com eletrofisiologia *in vivo* no atual grupo de pesquisa. No presente estudo apresentamos protocolos otimizados de cirurgia, análise de dados eletrofisiológicos e considerações sobre aspectos metodológicos que podem ser otimizados para pesquisas futuras.

**Palavras-chave:** Eletroencefalograma; Endocanabinóides; Epilepsia; Jejum; Anticonvulsivante.

## ABSTRACT

Epilepsy is a complex chronic disease of variable severity characterized by a lower neuronal threshold for recurrent unprovoked seizures. The disease has higher incidence in developing countries and is associated with a 30% refractory response rate, which reflects the need for cost-effective, pathophysiologically-based treatment options. Fasting is an alternative treatment with a lot of potential, although it has been little explored because it presents variable results in the literature. To enable studies on the relationship of endocannabinoids in the possible effects of fasting on induced epileptiform seizures, this work presents the implementation of a methodology for the complete evaluation, both in neural and behavioral aspects, of the effects of fasting upon induced acute epileptiform seizures. In this study, nine Wistar rats (approximately 290 g) were given 70 mg/kg doses of Pentylene-tetrazole (PTZ) convulsant and subjected to seizure induction bioassays. For the bioassays, a cannula was surgically implanted at each rat's right lateral ventricle and five cranial electrodes were placed above the frontal, parietal, and occipital cerebral cortices. After surgery recovery, rats were connected to a wireless video-EEG recording system. Behavioral data was classified according to the revised Racine's scale for PTZ-induced seizures proposed in 2019 by Van Erum et.al., and electroencephalographic (EEG) recording profiles were visually inspected using MATLAB code routines, developed for defining neuronal correlates of behavioral seizures. The data collected replicates the electrophysiological and behavioral patterns reported in the literature for PTZ-induced seizures, enabling the use of in vivo electrophysiology for future research in our group. Finally, in this work we present optimized surgery protocols, new coding routines for electrophysiological data analysis and a set of considerations on methodological aspects that can be optimized for future research endeavours from our group.

**Key-words:** EEG; Endocannabinoids; Epilepsy; Fasting; Anticonvulsant.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Figura reproduzida, sem modificações, do artigo “Epidemiological profile of epilepsy in low income populations”, com autorização da editora Elsevier (licença nº 5318920323302). A figura mostra diferenças na prevalência, incidência e lacuna de tratamento na epilepsia entre alguns países. A cor dos círculos representa a classificação dos países de acordo com a renda per capita; vermelho = baixa renda, amarelo = renda média baixa, verde = renda média alta, azul = renda alta. P = prevalência de epilepsia ativa, número de casos por 1.000 pessoas. I = Incidência de epilepsia, número de novos casos por 100.000 pessoas/ano. TG = gap de tratamento expresso em porcentagem. ≠ sem dado ..... 18
- Figura 2.** Imagem esquemática criada com BioRender.com demonstrando o controle por feedback negativo em neurônios hipotalâmicos, levando a supressão local da atividade neuronal, com bloqueio da liberação de hormônios esteroides em resposta ao estresse gerado pela restrição alimentar ..... 25
- Figura 3.** Um par de ratos Wistar machos em gaiola forrada com maravalha..... 31
- Figura 4.** Animal, sob anestesia, durante protocolo cirúrgico para implante de eletrodos e cânulas. Note o esquema de posicionamento utilizado para os eletrodos (parafusos) e cânula (▼)..... 34
- Figura 5.** Animal conectado ao headstage do sistema wireless 8200-K9-SE3 da Pinnacle Technologies para captação de EEG. .... 35
- Figura 6.** Rato wistar posicionado em arena, cercada por um cilindro acrílico de Plexiglass, para registro de vídeo-EEG. Note que esse animal não possui restrição de movimento, o que contribui significativamente para uma análise comportamental mais acurada. À esquerda temos uma imagem ampliada a partir do manual de usuário do equipamento utilizado, demonstrando um camundongo com o mesmo equipamento de registro wireless..... 36
- Figura 7.** Esquema de montagem de eletrodos para coleta de EEG. A) Esquema figurativo da posição de implantação craniana de eletrodos e cânula. B) Exemplo de conector Millmax soldado a fios de cobre para permitir conexão com eletrodos implantados. C) sistema de captação wireless..... 37



- Figura 8.** Sistema de captação do sinal de EEG. À esquerda podemos ver, em detalhe, a placa de recepção do sinal, e à direita temos a visão superior do conector Millmax, após este ser implantado no animal. Ao lado do conector é possível visualizar a entrada da cânula para injeção i.c.v, recoberta por um fragmento de aço inoxidável. ....38
- Figura 9.** Cérebro retirado por craniotomia. Note o dano tecidual causado pela cirurgia de implantação de cânulas e eletrodos. ....39
- Figura 10.** Ratos durante bioensaios para indução de convulsões epileptiformes. A esquerda, frame de vídeo em visão lateral do animal. A direita, exemplo de frame de vídeo superior. ....40
- Figura 11.** Reproduzida do artigo “PTZ-induced seizures in mice require a revised Racine scale” (Van Erum et al., 2019), sem modificações, sob a licença Creative Commons BY 4.0. A figura indica a Escala adaptada para convulsões induzidas por PTZ em 7 níveis, e os correlatos comportamentais e eletrofisiológicos encontrados pelos autores utilizando camundongos. ....41
- Figura 12.** Gráfico reproduzido com autorização da pesquisadora Msc. Flavia Maria Medeiros Gomes e colaboradores (Relatório de Iniciação Científica 2010-2011), denotando resultados obtidos previamente quanto à latência para estabelecimento de crise máxima em animais submetidos a dosagem de 70 mg/kg de PTZ intraperitoneal. (\*) Indica diferença significativa entre os grupos PTZ 70 na condição ad libitum e quando submetidos ao jejum de 24 h. (#) Denota diferença significativa em relação ao grupo PTZ 70 no jejum .....44
- Figura 13.** Latência para estabelecimento de crise máxima em animais submetidos a dosagem de 70 mg/kg de PTZ e sujeitos ou não ao jejum de 24h. Não houve diferença significativa entre os grupos em jejum e com alimentação livre (ad Libitum). PTZ (n = 5), PTZ + Jejum (n = 3), PTZ + AM251 em jejum (n = 2) e PTZ + AM251 (n = 2). ....44
- Figura 14.** Esquema adaptado, com permissão de “John Wiley and Sons” (licença nº 5318800360556), a partir do artigo “The neurophysiological bases of EEG and EEG measurement: A review for the rest of us”. A figura ilustra a dissipação passiva de potenciais elétricos de neurônios corticais pós sinápticos através de tecidos das meninges, do crânio e músculos até a superfície cortical, onde ocorre sua captação por eletrodos de registro. ....47

- Figura 15.** Imagem reproduzida do artigo “EEG seizure detection and prediction algorithms: a survey”, sob a licença Creative Commons BY 4.0. Figura denota exemplo de sinal de EEG contendo crise epiléptica. Períodos identificados por software automatizado, demonstrando o uso de tais ferramentas na área. Repare a identificação visual clara de períodos de crise, denotando a relevância do EEG na classificação e diagnóstico de crises epiléticas. ....50
- Figura 16.** Exemplo de sinal bruto de EEG. As cores demonstram períodos correspondentes a convulsões epileptiformes de diferentes graus de intensidade, de acordo com a escala proposta por Van Erum e colaboradores. Amarelo = período basal; verde = grau convulsivo 0 a 2; azul = grau 4; rosa = grau 5 a 6. 58
- Figura 17.** Comparação com a literatura de um exemplo de ritmo basal obtido no EEG, alguns segundos após a administração de PTZ. Repare na frequência de 7 a 10 oscilações por segundo em cada canal, sendo este o ritmo Theta comumente observado durante o comportamento de exploração em ratos. Na figura, o sinal de 7-10 Hz aparece mais intenso no eletrodo parietal, pois é o único eletrodo mais próximo ao hipocampo, que é o principal foco de origem desta atividade oscilatória, e também para as convulsões induzidas por PTZ .....60
- Figura 18.** Comparação com a literatura de um registro exemplar obtido no EEG demonstrando o primeiro padrão elétrico associado a convulsões parciais (0 a 2). A extinção de componentes de alta frequência do sinal é evidenciada pela redução da quantidade de micro oscilações no sinal. Denota-se também a presença de picos espaçados de forma intermitente e com amplitude elevada.61
- Figura 19.** Comparação com a literatura de um exemplo de padrão elétrico de convulsões generalizadas do tipo mioclonias de cabeça (grau 3), demonstrando os picos de atividade elétrica correlacionados aos eventos de mioclonia. ....62
- Figura 20.** Comparação com a literatura de um registro de EEG exemplificando o padrão máximo de convulsões generalizadas observadas, associadas a convulsões tônico-clônicas, e conseqüente perda de controle postural do animal. ....63
- Figura 21.** Comparação com a literatura mais atual, denotando o achado de um registro de EEG exemplar do correlato de parada cardiorrespiratória e extensão muscular tônica (grau 7 de crise epileptiforme), anteriormente apenas identificado em camundongos. ....64

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Coordenadas estereotáxicas para posicionamento de cânula e eletrodos, com base na posição de bregma para ratos de aproximadamente 290 g .....	<b>34</b>
<b>Tabela 2</b> - Escala de Racine adaptada a partir de Van Erum et. al. (2019), para convulsões induzidas por PTZ .....	<b>42</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINEs	Anti-Inflamatórios Não Esteroidais
AMS	Área Motora Suplementar
APM	Área Pré Motora
BHB	Beta-Hidroxibutirato
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado Do Cérebro
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CBD	Cannabidiol
CBDV	Cannabidivarin
CEUA	Comissão de Ética em Uso de Animais
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CONCEA	Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal
COX	Ciclo-Oxigenases
DMSO	Dimetil Sulfóxido
EEG	Eletroencefalograma
FAP-DF	Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal
FDA	Administração Federal de Alimentos e Medicamentos dos EUA
GABA	Ácido Gama – Aminobutírico
HPA	Eixo Hipotálamo – Pituitária – Adrenal
IB	Instituto de Biologia

I.C.V.	Intracerebroventricular
I.P.	Intraperitoneal
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
M1	Córtex Motor Primário
M. E. S	Modelo De Indução de Crises Epilépticas Por Eletrochoque
P. A	Potenciais de Ação
P. P. S	Potenciais Pós-Sinápticos
PTZ	Pentilenotetrazol
RMS	Raiz Quadrática Média ( <i>Root Mean Square</i> )
SBNeC	Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento
s.c.	Subcutâneo
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SNR	Razão Sinal – Ruído ( <i>Signal to Noise Ratio</i> )
SUDEP	Morte Súbita Inesperada em Epilepsia
THC	Tetrahidrocannabidiol
THCV	Tetrahidrocannabidivarin
UnB	Universidade de Brasília

## SUMÁRIO

<b>1 APRESENTAÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2 PRIMEIRO CAPÍTULO</b> .....	<b>15</b>
2.1. INTRODUÇÃO .....	15
2.1.1. Panorama Mundial e Nacional da Epilepsia.....	15
2.1.2. Fisiopatologia da Epilepsia.....	19
2.1.3. Jejum e Canabinóides no Tratamento de Epilepsia .....	23
2.2. OBJETIVOS .....	28
2.2.1. Objetivo Geral .....	28
2.2.2. Objetivos Específicos.....	29
2.3. METODOLOGIA.....	29
2.3.1. Aspectos Éticos .....	29
2.3.2. Colaboradores .....	30
2.3.3. Animais.....	31
2.3.4. Fármacos.....	31
2.3.5. Delineamento de Grupos Experimentais .....	32
2.3.6. Procedimento Cirúrgico .....	33
2.3.7. Teste de Indução Aguda de Convulsões .....	35
2.3.8. Aquisição do Sinal de EEG .....	37
2.3.9. Eutanásia e Perfusão.....	38
2.3.10. Análise de Dados Comportamentais .....	39
2.3.11. Análise Histológica e de Posicionamento da Cânula.....	42
2.4. RESULTADOS PARCIAIS.....	43
2.4.1. Efeito do Jejum e do Bloqueio de Receptores Endocanabinóides nas Convulsões Induzidas por PTZ.....	43
2.4.2. Achados Histológicos .....	45

<b>3</b>	<b>SEGUNDO CAPÍTULO</b>	<b>46</b>
3.1.	INTRODUÇÃO	46
3.1.1.	O Eletroencefalograma na Saúde e na Doença	46
3.1.2.	EEG Aplicado A Modelos Animais Em Epilepsia	51
3.2.	OBJETIVOS	55
3.2.1.	Objetivo Geral	55
3.2.2.	Objetivos Específicos	55
3.3.	METODOLOGIA	56
3.3.1.	Definição do Grupo Experimental	56
3.3.2.	Análise de Dados Eletrofisiológicos	57
3.3.3.	Aprovação Ética	57
3.4.	RESULTADOS	58
3.4.1.	Correlatos Eletrofisiológicos das Convulsões Induzidas por PTZ	58
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>65</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>73</b>

## 1 APRESENTAÇÃO

O padrão oscilatório da atividade elétrica neuronal fundamenta a percepção, a consciência, os pensamentos e sentimentos que nós experimentamos (Mitra & Bokil, 2008). São neurônios sensoriais que captam a luz, os cheiros, os gostos e os sons, e transformam todas essas energias em um sinal neural. Sendo assim, pode-se interpretar que o substrato fisiológico para a própria essência humana está embasado na coordenação de um complexo sistema de células nervosas, intrincadamente organizadas de forma a dispararem em padrões rítmicos alternados, que terminam por codificar, em padrões elétricos, as percepções cognitivas e sensoriais abstratas da mente.

Durante essa fase inicial das Neurociências, os padrões fluidos de atividade neuronal eram desconhecidos pela comunidade científica, que tinha o foco das Neurociências restrito à observação de comportamentos de pessoas com epilepsia a partir da ablação focalizada de pequenas regiões corticais. Nessa época, o estudo da epilepsia foi pivotal na correlação entre região anatômica e função fisiológica de diferentes partes do cérebro (Kandel et al., 2014).

Hoje, os esforços para a compreensão da dinâmica da atividade neuronal, subjacente ao desenvolvimento de comportamentos abstratos complexos, se expande para o desenvolvimento de toda uma área de conhecimento dentro das Neurociências: a Neurociência de Sistemas (Mitra & Bokil, 2008). A presente dissertação trabalha dentro do campo da Neurociência de Sistemas, propondo a utilização de técnicas atuais de eletroencefalografia (EEG) para retornar à solução do problema enfrentado pelos primeiros neurocientistas, que procuravam elucidar a função através da observação do comportamento atípico.

O presente trabalho é separado em dois capítulos que exploram padrões fisiológicos de atividade neuronal atípica associada às crises epiléticas. No primeiro capítulo é explorado um possível mecanismo fisiopatológico para o desenvolvimento sistêmico de crises epiléticas. No segundo capítulo inspecionaremos padrões eletrofisiológicos a fim de apresentar marcadores experimentais correlatos ao comportamento de crise epilética, contribuindo para a elucidação da fisiopatologia das epilepsias, e o possível desenvolvimento de novos alvos farmacológicos para tratamentos inovadores.



## 2 PRIMEIRO CAPÍTULO

### 2.1. INTRODUÇÃO

#### 2.1.1. Panorama Mundial e Nacional da Epilepsia

A etimologia da palavra “epilepsia” remete às descrições de crises epiléticas, ou convulsões, como estas eram relatadas na antiguidade: como ataques ou possessões, entendidas como de origens sobrenaturais. Desde os tempos babilônicos, a epilepsia vem sendo historicamente descrita em meio ao estigma social – o que pode explicar o isolamento, a falta de procura por tratamento, a alta taxa de desemprego e a predominância de alguns distúrbios psicológicos em pessoas epiléticas, como ansiedade e depressão (Ali, 2018; Guilhoto et al., 2021). Somente no século XIX, cento e três anos após a escrita do primeiro livro moderno sobre epilepsia, é que essa doença, de importante ocorrência global, foi primeiro reconhecida por suas características físicas e não-contagiosas. Neste período, a epilepsia foi descrita pela primeira vez como uma disfunção física do Sistema Nervoso Central (SNC), causada pela repentina e paroxística descarga neuronal (Ali, 2018; Guilhoto et al., 2021; Patel & Moshé, 2020). Hoje em dia, a epilepsia é reconhecida como uma doença complexa, multifatorial, caracterizada pela predisposição patológica para convulsões devido a um limiar reduzido para a ocorrência de episódios convulsivos recorrentes, espontâneos e periódicos (Fisher et al., 2014).

A epilepsia é um dos distúrbios cerebrais mais comuns, impactando múltiplos aspectos do bem-estar ao longo da vida de cerca de 70 milhões de pessoas em todo o mundo (em torno de 1% da população mundial), com maior incidência e uma possível maior prevalência em países em desenvolvimento (Fiest et al., 2017; Thijs et al., 2019). A heterogeneidade da ocorrência da epilepsia e sua maior incidência em países em desenvolvimento econômico pode ser explicada tanto por fatores sócio-geográficos (e.g., maior ocorrência de trauma perinatal ou maior presença de fatores de risco para inflamações e parasitoses), quanto por fatores que influenciam na

predisposição genética à doença, como consanguinidade ou histórico familiar de epilepsia (Ali, 2018; Fiest et al., 2017).

O principal sintoma das epilepsias são as convulsões epiléticas agudas. Os grupos mais afetados por convulsões epiléticas agudas são bebês e idosos, caracterizando uma incidência de distribuição bimodal (Beghi, 2020; Fiest et al., 2017). Com a atual redução da tendência global à epilepsia – que pode ser atribuída a uma redução de fatores de risco ambientais (como o aumento da sanitização) e à introdução de medidas preventivas das condições epileptogênicas (e.g., prevenção de traumas no período perinatal) – a distribuição da incidência da epilepsia tenderá a se tornar unimodal, afetando com mais frequência a população idosa, o que é previsto pelo aumento da expectativa de vida e a redução da taxa de mortalidade. Assim, a atual prevalência reduzida da epilepsia em grupos de idade mais elevada, tenderá a aumentar, enquanto será bastante reduzida em bebês (Beghi, 2020; Fiest et al., 2017).

A prevalência mundial de epilepsias ativas é aproximadamente 0.64% da população (Beghi, 2020). No Brasil, a prevalência da doença ativa foi estimada em 0.54% da população, variando de 0.16% até 0.82% dentre populações de diferentes classes socioeconômicas (Fantezia Andraus & Alves Borges, 2002; Noronha et al., 2007). Assim, a prevalência no Brasil é semelhante a de países em desenvolvimento, predominando no país a desigualdade no acesso ao tratamento contra epilepsia. Há, no Brasil, aproximadamente 3 milhões de pessoas afetadas por epilepsias (1,4% da população do país), e cerca de metade dessas não recebe tratamento adequado (Fernandes et al., 2007). No país, a doença prevalece dentre populações em vulnerabilidade econômica e em pessoas acima de 59 anos (Li et al., 2007), com uma prevalência de 0.85% em idosos (Noronha et al., 2007).

Ainda, a saturação do sistema de saúde durante a recente pandemia de SARS-CoV-2, o estresse psicológico e a dificuldade no acesso a medicamentos antiepiléticos durante esse período podem ter resultado no agravamento da lacuna já existente no acesso a tratamentos contra a epilepsia no Brasil. Relatos de pessoas com epilepsia e de profissionais de saúde da área descrevem a piora na qualidade de vida e o aumento na frequência de convulsões em pessoas com epilepsia no Brasil durante a pandemia, sendo o referido aumento na frequência de convulsões um fenômeno também descrito globalmente (Guilhoto et al., 2021).

A epilepsia se torna mais frequente em locais onde o risco de infecções é aumentado pela falta de saneamento básico e pela maior incidência de doenças

infecciosas ou traumáticas não tratadas, como o HIV, meningites e outras (Ali, 2018), o que leva a um maior índice de mortalidade de pessoas epiléticas e maior incidência da doença em países em desenvolvimento. Nesses locais, também prevalece um maior número de diagnósticos errôneos, o que pode ser explicado pela falta de equipamentos e condições diagnósticas apropriadas para caracterização sintomatológica da doença, ou pela indisponibilidade de medicamentos mais atuais e com menos efeitos colaterais no mercado local dos países em desenvolvimento (Beghi, 2020). Conseqüentemente, aproximadamente 80% da população epilética de países de baixo poder aquisitivo não recebe tratamento efetivo ou é erroneamente diagnosticada com epilepsia, com esse número sendo reduzido para a ainda alta porcentagem de 50% da população em países de médio poder aquisitivo (Ali, 2018; Guilhoto et al., 2021). Um fator que contribui para tal estatística é o forte estigma social atrelado à doença.

Apesar da grande disparidade entre países de alto e baixo poder aquisitivo no tratamento de epilepsias (Figura 1), existem populações no Brasil que apresentam um dos menores índices (menos de 10%) de pessoas epiléticas sem acesso a tratamento. Além disso, já foi demonstrado no Brasil a viabilidade da implementação de tratamento de custo acessível contra a epilepsia por profissionais de saúde básica (Meyer et al., 2010), e há um crescente esforço para a conscientização e a redução do estigma associado a epilepsia no país (Fernandes et al., 2007).

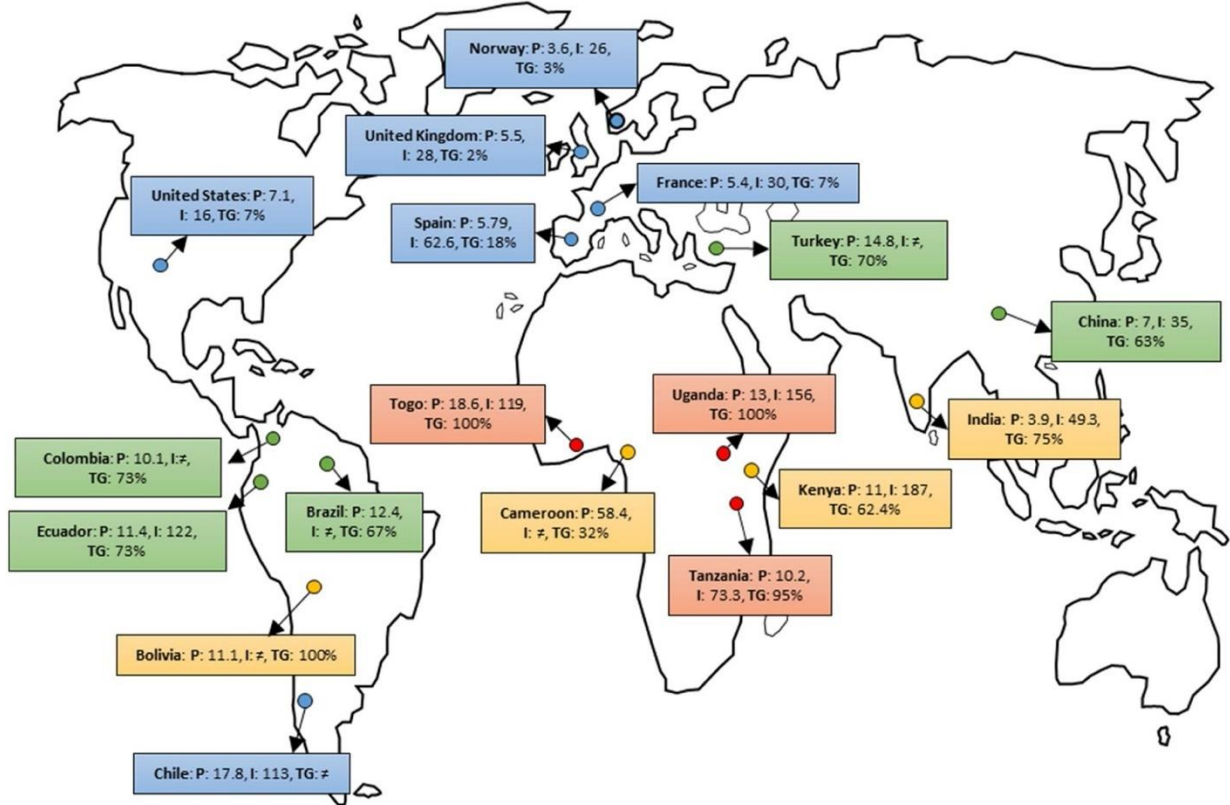


Figura 1. Figura reproduzida, sem modificações, do artigo “Epidemiological profile of epilepsy in low income populations”, com autorização da editora Elsevier (licença nº 5318920323302). A figura mostra diferenças na prevalência, incidência e lacuna de tratamento na epilepsia entre alguns países. A cor dos círculos representa a classificação dos países de acordo com a renda per capita; vermelho = baixa renda, amarelo = renda média baixa, verde = renda média alta, azul = renda alta. P = prevalência de epilepsia ativa, número de casos por 1.000 pessoas. I = Incidência de epilepsia, número de novos casos por 100.000 pessoas/ano. TG = gap de tratamento expresso em porcentagem. ? sem dado

Além da heterogeneidade da incidência de epilepsias entre classes socioeconômicas, há, ainda, uma tendência para maior incidência da doença em homens (Fiest et al., 2017). Ainda assim, não se deve subestimar o impacto dessa doença entre mulheres, pois essas são especialmente afetadas pela epilepsia devido ao ciclo hormonal mensal feminino, às interações farmacológicas de antiepilépticos com pílulas anticoncepcionais, devido aos riscos associados à gravidez e também à maior propensão a distúrbios psicossomáticos, que são complicadores tanto da condição epilética quanto da busca por tratamento (Ali, 2018).

O objetivo atual para o tratamento da epilepsia consiste na total extinção de convulsões, com mínimo ou nenhum efeito adverso. Infelizmente, dentre os casos de epilepsia, apenas 70% dos pacientes respondem ao uso de medicamentos, e somente em 50% dos casos é atingido o objetivo de extinção completa de convulsões com o uso relatado dos medicamentos anticonvulsivantes presentes no mercado. Além

disso, deve-se considerar que o custo por medicamentos pode ser um fator limitante ao tratamento, em especial ao se considerar tratamentos de longo prazo (Ali, 2018).

No entanto, o presente foco na extinção das convulsões pode também ofuscar a necessidade por tratar das diversas comorbidades associadas a epilepsia, o que gera impactos severos na qualidade de vida de pessoas com epilepsia. Portanto, deve-se atentar para a igual contribuição de características tanto fisiopatológicas quanto sociais ao se avaliar o desenvolvimento e agravamento da doença (Ali, 2018). Para ressaltar a contribuição psicossocial da doença, vale citar que o risco de mortalidade é maior para pessoas com epilepsia, e que dentre os principais fatores para tal risco, além da Morte Súbita Inesperada em Epilepsia (SUDEP), encontra-se o suicídio (Beghi, 2020).

### **2.1.2. Fisiopatologia da Epilepsia**

A epilepsia é uma doença crônica, cujo desdobramento leva a modificações neuronais permanentes, levando à frequente reincidência de convulsões espontâneas, que constitui o principal sintoma da epilepsia. Convulsões espontâneas indicam um aumento transitório paroxístico da atividade encefálica, não estando necessariamente atreladas a um diagnóstico de epilepsia, a não ser quando recorrentes (Kandel et al., 2014). Convulsões podem ocorrer em praticamente todos os animais com um sistema nervoso desenvolvido, sendo assim, a pesquisa em epilepsia não está restrita a humanos, possuindo um longo histórico de estudos comparativos em animais, já que todo SNC é fundamentalmente propenso ao desbalanço do equilíbrio de excitação-inibição neuronal, o que pode levar a um quadro de atividade paroxística (espasmos agudos involuntários, ou crise epiléptica) (Grone & Baraban, 2015). Em animais, durante a prática veterinária, são consideradas convulsões apenas as crises caracterizadas por movimentos tônico-clônico com aparente perda de consciência, de origem genética ou idiopática, sendo os demais eventos epilépticos englobados como de origem “estrutural”, e denominados crises epilépticas.

Crises epilépticas podem ser desencadeadas tanto pela exacerbação dos circuitos neuronais excitatórios quanto pela desinibição de circuitos inibitórios

(Scharfman, 2007). Podendo ser, portanto, causadas por múltiplos mecanismos, que incluem, mas não se limitam a, fatores genéticos, estruturais, metabólicos, imunológicos e infecções (Scheffer et al., 2017). Alguns exemplos de promotores de convulsões são: malformações congênitas, traumas mecânicos, acidentes cerebrovasculares, febres, tumores, produção autoimune de anticorpos contra proteínas de neuro receptores e, por fim, mutações genéticas, que podem ocorrer tanto em neuro receptores quanto em canais iônicos dependentes de ligante. Devido ao fenômeno de plasticidade neural, uma série de alterações fisiopatológicas são associadas a um cérebro epilético, as quais modificam irreversivelmente a excitabilidade dos neurônios, e podem causar morte neuronal por excitotoxicidade (Purves et al., 2012; Rang et al., 2016).

A fisiopatologia da epilepsia inclui um grande número de consequências neurobiológicas, cognitivas, psicossociais e sociais, e a redução ou melhoramento dos episódios convulsivos constitui um conceito chave para reduzir as diversas consequências da atividade neural sistêmica atípica e excessiva durante o desenvolvimento da doença (Fisher et al., 2014; Scheffer et al., 2017). Na epilepsia, as crises podem afetar o cérebro de diferentes maneiras, e a classificação de crises epiléticas em diferentes tipos procura consolidar abordagens específicas para o tratamento de diferentes causas e sintomatologias que podem ser associadas à epilepsia, buscando contornar o factual desafio de se determinar a origem e o mais apropriado curso de tratamento para cada paciente epilético (Ali, 2018).

Em humanos, e em modelos animais de convulsões, que são comparativos da condição humana, as crises epiléticas assumem um sistema de classificação mais extenso do que na avaliação veterinária. Sendo assim, as crises epiléticas podem ser classificadas em: parciais (também denominadas focais ou locais), generalizadas, ou não-classificáveis (de início desconhecido), e podem ter intensidades e frequências variáveis, e serem convulsivas ou não (Yacubian, Elza Márcia Targas. Kochen, 2014).

Crises epiléticas parciais ocorrem em uma porção encefálica relativamente limitada, não se espalhando por todo o encéfalo, e são menos severas e mais comuns do que crises epiléticas generalizadas, em todos os grupos etários (Beghi, 2020). Os sintomas de crises parciais dependem da região acometida do cérebro, e são geralmente precedidas por sintomas autonômicos ou psíquicos relacionados ao aumento súbito de atividade elétrica na região cerebral do foco convulsivo. Esse efeito, precedente a crises epiléticas, é denominado de “aura”, por gerar fenômenos

sensoriais atípicos que são comumente identificados pelos portadores da epilepsia, que aprendem a identificar a ocorrência das auras como um aviso de uma crise epiléptica iminente.

As crises epiléticas generalizadas são iniciadas em ambos hemisférios cerebrais, e se espalham bilateralmente por todo o encéfalo, sem apresentar um início focal ou sintoma precedente, e podem ser divididas em episódios convulsivos ou não convulsivos, sendo os episódios não convulsivos também conhecidos como crises de ausência (Kandel et al., 2014; Yacubian, Elza Márcia Targas. Kochen, 2014). Os episódios convulsivos mais comuns são as convulsões tônico-clônicas, em que a musculatura esquelética estriada se contrai de forma involuntária em padrões que alternam momentos de contração intensa (aumento contínuo do tônus muscular), e momentos de contração-relaxamento repetidos e descoordenados (clônus muscular) (Beghi, 2020; Kandel et al., 2014).

As crises de ausência são caracterizadas pela breve perda de consciência com interrupção de toda a atividade motora, mas sem perda de controle postural, e comumente ocorre em crianças, tendo sido denominada de “pequeno mal” por muitos anos por assemelhar-se a um estado breve de transe, sem que o paciente tenha posterior percepção do ocorrido. Esse tipo de crise possui características singulares e facilmente reconhecidas no sinal eletroencefalográfico (EEG).

Já as convulsões tônico-clônicas são caracterizadas por seu início abrupto e pelas características de contração e extensão muscular estereotipada, que podem levar a perda de controle postural e perda do controle sobre funções fisiológicas, sendo denominado de “grande mal” devido a seus severos sintomas físicos. Esse tipo de convulsão não é tão facilmente diferenciado de outros tipos de crises generalizadas no EEG, e é comumente seguido por um período pós-ictal de supressão da atividade elétrica neuronal, em que o paciente relata sonolência ou dor muscular (Kandel et al., 2014). As crises generalizadas costumam ser prevalentes ao longo da vida (Fiest et al., 2017), e são associadas a maior mortalidade em pessoas com epilepsia, assim como as epilepsias noturnas e as refratárias a medicamentos. O risco de mortalidade é reduzido com a extinção das crises, principalmente quando estas são convulsivas (Beghi, 2020).

Os sintomas da epilepsia variam de acordo com a natureza das crises epiléticas e a distribuição das descargas elétricas no cérebro, podendo afetar o controle motor, a percepção sensorial, o comportamento e o estado de consciência

do indivíduo afetado pela doença (Yacubian, Elza Márcia Targas. Kochen, 2014). Sendo assim, crises epiléticas parciais (ou focais) são também classificadas de acordo com o grau de comprometimento da consciência causado, e crises tanto parciais como generalizadas são, adicionalmente, sub classificadas de acordo com a presença de sintomas motores ou não (Beghi, 2020; Patel & Moshé, 2020; Yacubian, Elza Márcia Targas. Kochen, 2014).

O substrato biológico da perda do controle motor, durante uma crise epilética, consiste no espalhamento da atividade epilética para áreas corticais envolvidas no processamento e controle da atividade motora. A hiperexcitação de neurônios no córtex motor (M1), na área pré motora (APM) e na área motora suplementar (AMS), regiões corticais responsáveis pelo planejamento, direcionamento e execução da atividade motora, ocasiona movimentos descontrolados de extensão e/ou contração muscular, caracterizando a sintomatologia tônica (hiperextensão muscular), clônica (contração muscular repetida) ou tônico-clônica (contração seguida de hiperextensão muscular, em padrões estereotipados) das crises epiléticas.

O grau de acometimento do controle motor é um dos principais critérios para a classificação de crises epiléticas (Bear et al., 2017; Yacubian, Elza Márcia Targas. Kochen, 2014). O grau mais intenso de crises epiléticas se dá quando a frequência da atividade epilética é ininterrupta, de forma que essa é classificada como *Estatus Epilepticus*, condição que pode levar à morte (Rang et al., 2016). Apesar do grande avanço nos sistemas de classificação de crises epiléticas (Fisher et al., 2017), ainda é necessário um conjunto de especialistas, equipamentos sofisticados e uma análise holística do paciente para atingir um diagnóstico confiável de epilepsia, que muitas vezes não é acessível para populações de menor poder aquisitivo.



### 2.1.3. Jejum e Canabinóides no Tratamento de Epilepsia

Apesar do vasto conhecimento clínico e científico gerado nos últimos 100 anos sobre a epilepsia, ainda não há consenso sobre as vias patológicas da epilepsia, nem sobre o melhor alvo farmacológico para o tratamento da doença (Thijs et al., 2019). As opções de tratamento atuais são focadas em soluções paliativas para controle sintomatológico, cenário este que leva a um terço dos pacientes serem refratários ao tratamento farmacológico disponível (Younus & Reddy, 2018). A avaliação da etiologia da doença é, portanto, fundamental para mudar a incerteza acerca do tratamento da epilepsia. Assim, existe um grande interesse no desenvolvimento de métodos alternativos de tratamento que visam esclarecer os mecanismos subjacentes à doença. Um método de tratamento alternativo que é relatado desde a antiguidade para o controle de convulsões consiste na restrição alimentar transitória, ou seja, na implementação de jejum e outras dietas que simulam os efeitos metabólicos do jejum, como a dieta cetogênica (Bailey et al., 2005).

A dieta cetogênica foi introduzida como tratamento para epilepsia refratária ainda em 1921, e é bem consolidada como um método de redução da frequência de convulsões em crianças e adolescentes com epilepsia resistente a tratamento farmacológico (Verrotti et al., 2020). A dieta cetogênica compartilha diversas características metabólicas com o jejum, em especial, a produção de corpos cetônicos, o que torna interessante o estudo do jejum no tratamento de epilepsias refratárias a medicamentos. O principal corpo cetônico liberado na corrente sanguínea durante a restrição alimentar é o Beta-Hidroxiacetil-CoA (BHB). O BHB é um sinalizador para produção do Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF), que é um dos principais reguladores da atividade neuronal, estando envolvido em mecanismos de plasticidade e aumento de sinapses neuronais (Phillips, 2019).

Também foi demonstrado que corpos cetônicos, como o BHB, influenciam no metabolismo energético cerebral por meio da formação de mitocôndrias, do aumento da produção de neurotransmissores inibitórios, da redução de excitabilidade da membrana celular de neurônios, da alteração da expressão de canais iônicos e da proteção contra estresse oxidativo. Outros fatores importantes à regulação da atividade neuronal que são aumentados durante a adaptação metabólica ao jejum são a expressão do neuropeptídeo YY e a síntese de Ácidos Graxos Poli-Insaturados, que

possivelmente influenciam no equilíbrio excitação-inibição neuronal, e podem, conseqüentemente, atuar no controle de convulsões (Verrotti et al., 2020).

O uso de jejum e dietas com restrição alimentar para o tratamento de epilepsias refratárias revela a substancial relação dessa doença com o metabolismo fisiológico. O jejum já foi demonstrado como terapia de prevenção e tratamento de diversas doenças neurodegenerativas, dentre elas a epilepsia. Na epilepsia, o jejum demonstra reduzir a severidade e a frequência de convulsões em humanos, e demonstrou tendências ao mesmo efeito em outros mamíferos (Phillips, 2019).

Para além da simples restrição calórica, os benefícios do jejum sobre a saúde metabólica parecem estar associados à sua aplicação intermitente, funcionando como um sistema liga-desliga. Enquanto a restrição calórica é uma abordagem contínua, o jejum intermitente induz dois estados metabólicos opostos, alternando a utilização de corpos cetônicos com a utilização de carboidratos e glicose como fonte energética. Durante a fase *Ad Libitum* (“à vontade”, traduzido do Latim), ou seja, de alimentação livre, são estimuladas vias metabólicas de reparo e crescimento, enquanto durante o jejum são estimuladas as vias de sobrevivência e reciclagem de metabólitos (Phillips, 2019). Possivelmente, os efeitos benéficos do jejum sobre epilepsias sejam explicados pela alternância entre as vias metabólicas de dispêndio e a reciclagem de metabólitos, que são fundamentais à modulação da atividade neuronal.

A adaptação do organismo de mamíferos ao jejum ocorre tanto por meio da supressão da atividade simpática do Sistema Nervoso Autônomo, quanto pela supressão de hormônios regulatórios associados à reprodução e à tireoide, com a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (Ahima, 1999). Tais mecanismos de regulação culminam na otimização da resiliência ao estresse, da bioenergética e da plasticidade neuronal (Phillips, 2019). Essa adaptação leva à liberação de uma série de hormônios na corrente sanguínea em resposta ao estresse fisiológico causado pelo jejum, primeiramente estimulando a liberação das reservas de glicose do organismo (glicólise) e, com o prolongamento do tempo em jejum, adaptando o metabolismo à produção (cetogênese) e consumo de ácidos graxos como fonte de energia (Ahima, 1999; Malcher-Lopes, 2010).

Em especial, hormônios esteroides, como os glicocorticoides, são aumentados no sangue durante o jejum, estimulando o comportamento de hiperfagia (estímulo da ingestão de alimentos) e a liberação de hormônios contra regulatórios como glucagon, epinefrina e cortisol (Castonguay, 1991; Phillips, 2019). Os glicocorticoides liberados

durante o jejum desencadeiam um controle de feedback negativo não genômico no hipotálamo, via mecanismo de sinalização G proteica (Figura 2). Esse mecanismo resulta na supressão da liberação de glutamato pré-sináptico por meio da liberação de endocanabinóides, que, por sua vez, levam à supressão local da atividade neuronal (Malcher-Lopes, 2010; Malcher-Lopes et al., 2006).

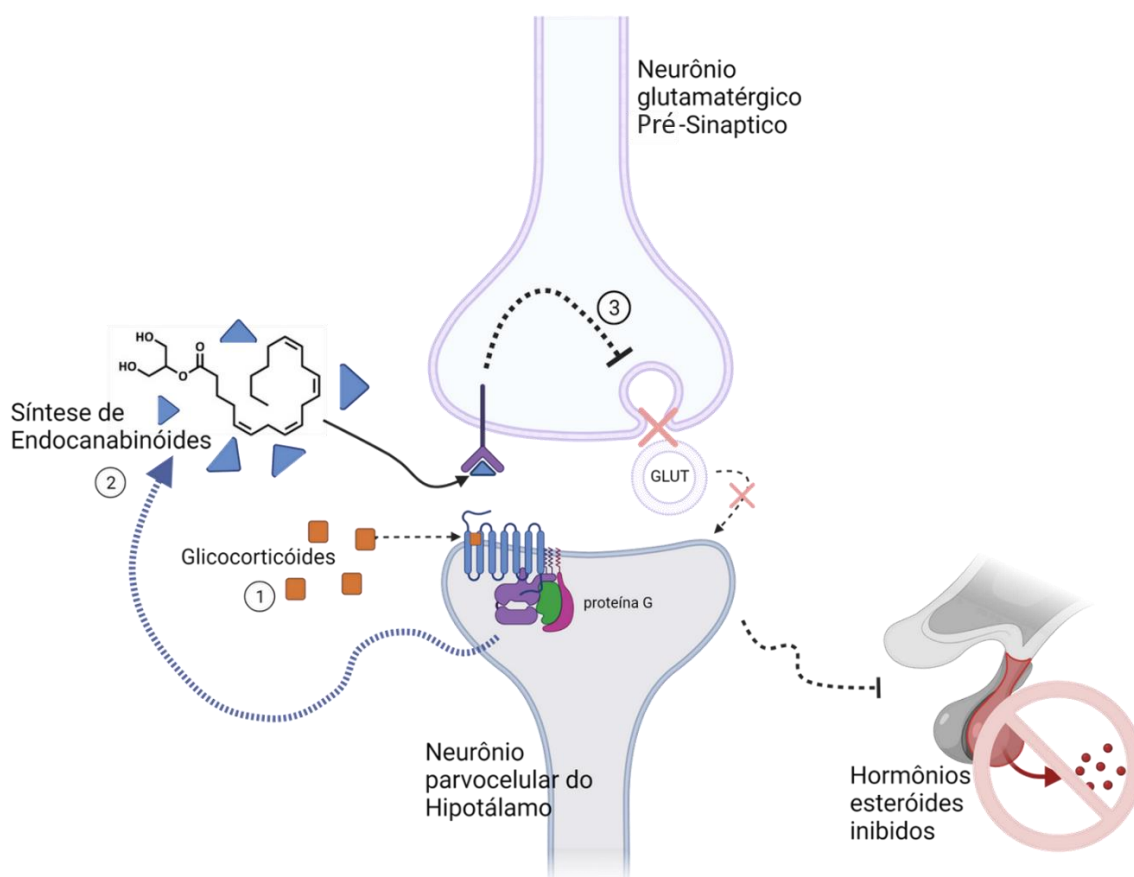


Figura 2. Imagem esquemática criada com BioRender.com demonstrando o controle por feedback negativo em neurônios hipotálâmicos, levando a supressão local da atividade neuronal, com bloqueio de liberação de hormônios esteróides em resposta ao estresse gerado pela restrição alimentar

Os endocanabinóides suprimem a atividade neuronal por meio da ligação endógena a neuro receptores do tipo CB1 e CB2, que são amplamente distribuídos tanto no sistema nervoso central como no periférico. Receptores CB1 se encontram distribuídos no SNC, especialmente em redes neuronais GABAérgicas, mas também em redes glutamatérgicas (Lu & Mackie, 2021), exercendo efeito inibitório sobre ambas, e sendo, assim, pivotais aos sistemas de regulação da excitação e inibição sináptica, que são alterados na fisiopatologia da epilepsia (Perucca, 2017). Esses receptores são abundantes no Giro Denteado do Hipocampo, no Cerebelo e nos Núcleos da Base (Malcher-Lopes, 2010), sendo essas regiões cerebrais

particularmente envolvidas nos sintomas da epilepsia. Receptores CB2 são expressos na micróglia e no Sistema Nervoso Periférico (SNP), e particularmente em vias imunológicas (Perucca, 2017).

Por sua ampla distribuição, receptores CB1 e CB2 encontram-se envolvidos em uma variedade de funções metabólicas e vias fisiopatológicas do SNC e do SNP. A regulação dessas vias envolve a síntese e liberação de endocanabinóides (Basavarajappa et al., 2017). Os endocanabinóides também são chamados de Canabinóides Endógenos, pois essas substâncias compartilham afinidade a receptores CB1 e CB2 com os mais de 100 compostos ativos de plantas do gênero *Cannabis*, os canabinóides.

Plantas do gênero *Cannabis* vêm sendo descritas por seu potencial medicinal desde o ano 2.700 Antes de Cristo, possuindo ação analgésica, antiinflamatória, relaxante muscular, cognitiva, estimulando o apetite, inibindo o enjoo e sendo descritas detalhadamente, ainda em 1843, como tratamento anticonvulsivante para epilepsia (Perucca, 2017).

Dentre os canabinóides, já foi demonstrado e consolidado que o Tetrahydrocannabidiol (THC) e o Cannabidiol (CBD) possuem atividade anticonvulsivante no SNC (Reddy, 2017). No entanto, modelos pré clínicos demonstraram efeitos variáveis do THC sobre convulsões, apresentando considerável risco de agravamento de convulsões, efeitos adversos e potencial dependência farmacológica (Perucca, 2017). Conseqüentemente, o CBD é o único já aprovado para o tratamento de epilepsia refratária, por não possuir propriedades psicoativas e apresentar um perfil anticonvulsivante estável (Cristino et al., 2019; Perucca, 2017).

Em 2018, a Administração Federal de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos (FDA), com base em três estudos duplo-cego controlados por placebo demonstrando as primeiras evidências concretas do potencial anticonvulsivante do CBD (Perucca, 2017), aprovou o uso adjuvante de CBD no tratamento de convulsões nas síndromes de Dravet e Lennox-Gastaut. O CBD também já foi demonstrado como uma ferramenta adicional efetiva para a redução da frequência e severidade de convulsões epiléticas em adultos e, especialmente, em crianças com epilepsia refratária a medicamentos, e já foi testado como tratamento para convulsões em diversas síndromes e desordens neurológicas, além da epilepsia (Cristino et al., 2019).

Outros canabinóides similares ao THC, mas que não apresentam perfil psicoativo, como o Tetrahydrocannabidivarin (THCV) e o Cannabidivarin (CBDV), vêm sendo cada vez mais estudados para aplicação em epilepsia e outras doenças neurodegenerativas como Parkinson, desordens metabólicas e algumas formas raras de autismo (Cristino et al., 2019; Perucca, 2017). CBD e CBDV apresentam expressiva propriedade anticonvulsivante e alta tolerabilidade, com resultados consistentes em modelos animais pré-clínicos. Esses compostos não são ligantes expressivos de CB1 e CB2 e, portanto, não se caracterizam como moduladores do sistema endocanabinóide (Rosenberg et al., 2017).

Apesar dos grandes avanços recentes em terapias baseadas em canabinóides, o desenvolvimento dessas terapias é frequentemente bloqueado pela inespecificidade dos efeitos centrais de canabinóides, que, por se ligarem à receptores CB1 distribuídos por todo o SNC, podem acabar desencadeando diversos prejuízos colaterais ao tratamento sendo estudado. A descoberta da atuação de receptores CB2 no SNP e, em especial, da via de sinalização endógena para canabinóides (sistema endocanabinóide), trouxe esperança para o desenvolvimento seguro dessas terapias por meio da elucidação das vias subjacentes à ação de canabinóides, impulsionando inúmeros estudos pré-clínicos com o uso de endocanabinóides. Esses estudos, embora altamente promissores, ainda são sub explorados (Basavarajappa et al., 2017; Cristino et al., 2019; Rosenberg et al., 2017).

Embora os mecanismos específicos pelos quais endocanabinóides atuam sobre convulsões ainda sejam desconhecidos, já foi demonstrado diversas vezes na literatura que convulsões epileptiformes induzidas em modelos agudos pré-clínicos estão diretamente relacionadas com a liberação de endocanabinóides no cérebro, e que estas são afetadas pela modulação de receptores CB1 e CB2 (Perucca, 2017). Entretanto, são sugeridos tanto efeitos anticonvulsivantes como risco pró-convulsivo durante a regulação e desregulação da sinalização endocanabinóide no SNC, com resultados variáveis e muitas vezes contraditórios na literatura atual (Rosenberg et al., 2017), o que indica a necessidade por maior esclarecimento das vias subjacentes à modulação do sistema endocanabinóide, e o efeito de diferentes neuroreceptores sobre convulsões epileptiformes.

Foi demonstrado que, em modelos animais de convulsões agudas, o agonismo de receptores CB1 usualmente produz efeitos anticonvulsivantes, enquanto o antagonismo seletivo desses (produzido, por exemplo, pelo AM251) tende a exacerbar

convulsões (Rosenberg et al., 2017). No entanto, essa generalização não parece levar em conta o mecanismo de indução de convulsões nos diferentes modelos animais utilizados. Por exemplo, seria esperado que o agonismo de CB1 melhore os sintomas de convulsões em modelos animais de indução de convulsões pela estimulação de receptores excitatórios - como relatado para modelos de indução por Pilocarpina, um agonista de receptores excitatórios para Acetilcolina (Landgrave-Gómez et al., 2016). No entanto, para modelos de indução de convulsões por meio da desinibição de circuitos inibitórios, como é o caso do PTZ, um antagonista de receptores para Ácido Gama-aminobutírico (GABA), seria esperado o efeito oposto, ou seja, a exacerbação de convulsões, já que endocanabinóides intensificam o efeito de supressão neuronal.

Assim, neste trabalho, questiona-se o mecanismo subjacente ao envolvimento de endocanabinóides nos possíveis efeitos do jejum sobre o controle de convulsões epiléticas. Propomos aqui a utilização de uma abordagem antagônica, com a avaliação da modulação de convulsões por meio de endocanabinóides liberados durante o jejum, e a supressão dessa sinalização por meio do AM251, que é um fármaco seletivamente antagonista aos receptores CB1. Espera-se que, por ser utilizado um modelo de indução por PTZ, as convulsões sejam exacerbadas durante o jejum, e que tais efeitos sejam comparativamente revertidos pela supressão da ação de endocanabinóides causada pela administração de AM251 em nossos modelos animais.

## 2.2. OBJETIVOS

### 2.2.1. Objetivo Geral

Investigar o efeito do jejum e de canabinóides endógenos na modulação de crises epiléticas induzidas pelo modelo de convulsões agudas induzidas por PTZ.

### 2.2.2. Objetivos Específicos

- Adaptar o protocolo cirúrgico do Laboratório de Neurofarmacologia da UnB para implante crônico de eletrodos epidurais e de cânula intracerebroventricular;
- Implementar o protocolo de coleta de Vídeo-EEG por meio do equipamento *wireless* durante o modelo agudo de convulsões;
- Replicar os dados comportamentais sobre os efeitos do jejum sobre convulsões epileptiformes obtidos por Flávia Medeiros em 2011;
- Caso existam alterações diferenciais dentre os grupos jejum e com alimentação *Ad libitum*, avaliar se há reversão das alterações associadas ao jejum com a administração de fármaco bloqueador de canabinóides AM251;
- Correlacionar as alterações comportamentais associadas à indução química de convulsões agudas e a eletrofisiologia associada;
- Estabelecer rotinas de análise do sinal eletrofisiológico no ambiente de programação MATLAB;

## 2.3. METODOLOGIA

### 2.3.1. Aspectos Éticos

O manejo animal seguiu os princípios éticos do Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) e da Lei Brasileira de Arouca (número 11794/2008). Os animais foram alojados em grupos de, no máximo, cinco animais por gaiola e mantidos em um ambiente controlado de temperatura de 24 graus e 12 horas de ciclo claro/escuro.

Um grande esforço foi empregado para garantir o maior bem-estar possível aos animais utilizados neste projeto, tanto antes, quanto durante os procedimentos de cirurgia, perfusão e eutanásia aqui relatados. Para minimizar o desconforto dos animais durante a cirurgia de implante de eletrodos e cânula, o fármaco Acepran

(Acepromazina) foi adicionado a comum combinação anestésica de Cetamina e Xilazina, por promover efeito de potenciação analgésica. A Acepromazina leva a maior profundidade e duração da anestesia por meio do bloqueio central de dopamina, o que atribui mais ampla margem de segurança e maior tolerância ao protocolo cirúrgico (Arras et al., 2001; Hajighahramani & Vesal, 2007). Ainda, durante o período pós-cirúrgico, cada animal recebeu doses diárias do analgésico Meloxicam pelos três primeiros dias após serem operados, a fim de minimizar a sensação de dor durante o período de recuperação. Por fim, animais com comportamentos associados a dor e distresse não previstos durante os experimentos eram concedidos o ponto final humanitário, como forma de prevenção ao sofrimento animal.

### 2.3.2. Colaboradores

O trabalho que fundamentou essa dissertação foi arquitetado a partir de diferentes colaborações estabelecidas no departamento de Ciências Fisiológicas da UnB. O professor Dr. Renato Jose Rodrigues Malcher-Lopes foi responsável pela proposição inicial do projeto, o qual foi conceptualizado, ainda em 2011, pela professora Dra. Márcia Renata Mortari (Coordenadora do grupo de pesquisa em Neurofarmacologia da UnB), que também foi responsável por ceder o espaço, a expertise de sua equipe, e os equipamentos para o desenvolvimento dessa pesquisa durante todo o seu curso (2011-2015 e 2019-2022). O projeto foi ultimamente coordenado e desenvolvido pela autora, sob a orientação do professor doutor Fabio Viegas Caixeta, contando com a contribuição próxima do professor Rafael Plakoudi Souto Maior. Ainda, durante a execução técnica do projeto, a autora contou com a indispensável colaboração de colegas pesquisadores filiados aos três grupos de pesquisa envolvidos. Em especial, das pesquisadoras e colaboradoras Mariana Bicalho (que auxiliou a execução de todos os protocolos cirúrgicos), e Bruna Carvalho, que acompanhou todos os bioensaios de convulsão. Demais pesquisadores serão citados a seguir em diferentes seções da metodologia, juntamente a suas respectivas colaborações em partes específicas desse projeto.



### 2.3.3. Animais

Dezesseis ratos Wistar machos (Figura 3) foram utilizados para os experimentos aqui explicitados. Dentre os dezesseis ratos utilizados, um dos animais foi excluído do estudo por erro de dosagem do convulsivante, quatro animais morreram em decorrência de complicações pós-cirúrgicas, e outros dois animais foram excluídos devido a imprecisões durante o protocolo de injeção de convulsivante. Restando, portanto, nove animais para inclusão nessa pesquisa.



Figura 3. Um par de ratos Wistar machos em gaiola forrada com maravalha.

### 2.3.4. Fármacos

Os fármacos PTZ e AM251 foram utilizados, respectivamente, para indução de convulsões agudas, possibilitando a avaliação dos efeitos do jejum sobre crises epileptiformes, e para avaliar o possível envolvimento de endocanabinóides no sistema proposto de modulação de crises epileptiformes. O AM251, N-(piperidin-1-il)-5-(4-iodofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxamida, é um antagonista específico de receptores CB1, que foi administrado para induzir bloqueio seletivo de receptores canabinóides. O PTZ é um fármaco que age por desinibição de circuitos afetados pela inibição da sinalização GABAérgica, induzindo convulsões.

O AM251 atua por um mecanismo de bloqueio dos efeitos inibitórios dos endocanabinóides e de agonistas sintéticos canabinóides sobre a liberação de transmissores por meio de sua ação nos receptores pré-sinápticos canabinóides do tipo 1 (CB1) no cérebro. Por outro lado, o mecanismo de ictogênese por meio da administração de PTZ (antagonista seletivo de receptores GABA – A) é baseado na redução química da neurotransmissão mediada pelo ácido gama-aminobutírico (GABA) no SNC (Vilela et al., 2017). Dessa forma, a indução de convulsões é feita pelo método de bloqueio da inibição neuronal mediada por GABA, reduzindo do limiar de excitabilidade de circuitos neuronais necessários para desencadear convulsões (Da Silva et al., 1998).

### 2.3.5. Delineamento de Grupos Experimentais

O presente projeto de pesquisa foi realizado por meio da indução de modelos agudos de convulsão em nove ratos machos (aproximadamente 290 g), da linhagem Wistar. As convulsões foram induzidas por meio da administração do convulsivante químico Pentilenotrazol (Sigma-Aldrich®, EUA), com seis animais recebendo injeções i.p. e outros três recebendo injeções s.c (PTZ, rota intraperitoneal - *i.p.* - ou subcutânea – *s.c.*).

A dosagem de PTZ foi selecionada em concordância com resultados comportamentais obtidos anteriormente (trabalho de Iniciação Científica, Flávia Maria Medeiros, Rafael dos Santos Bessa e colaboradores), realizada em 2011 pelo laboratório de Neurofarmacologia da UnB.

A avaliação do potencial modulatório de endocanabinóides sobre as convulsões epiléticas foi realizada por meio da administração de AM251 (Tocris Bioscience®, UK), um bloqueador sintético de receptores canabinóides do tipo CB1. A avaliação dos efeitos do jejum foi realizada por meio da privação de comida em um período de 24h.

Para a realização dos experimentos, os nove animais incluídos neste trabalho foram subdivididos em quatro grupos experimentais de acordo com a condição (jejum ou alimentação *Ad Libitum*) e o tipo de tratamento (Salina ou AM251). Todos os animais receberam uma injeção intraperitoneal (*i.p.*; N = 6) ou subcutânea (*s.c.*; N = 3) na dosagem de 70 mg/kg do convulsivante PTZ para induzir o modelo de convulsão

aguda. Com isso, foram constituídos quatro grupos experimentais, de acordo com o seguinte delineamento fatorial: PTZ, PTZ + Jejum, PTZ + AM251 em jejum e PTZ + AM251.

Para cada um dos animais, foi realizado um dia de avaliação em condição controle, em dia anterior à administração de PTZ, sendo utilizados como controle injeções i.p. (ou s.c.) e intracerebroventricular (i.c.v.) de solução salina, para que fosse possível parear os dados da condição sadia com a experimental em um mesmo animal. A realização de avaliação controle foi implementada como forma de garantir que a interferência cirúrgica não houvesse desencadeado processo epileptiforme prévio à administração de PTZ nos animais. Em cada animal foi implantada uma cânula guia no ventrículo cerebral lateral direito para injeção (i.c.v.) de AM251, conforme será detalhado na subseção de procedimento cirúrgico.

### 2.3.6. Procedimento Cirúrgico

Todos os animais foram anestesiados via intraperitoneal (i.p.) com uma combinação de Acepromazina (2,5 mg/kg), Cetamina (100 mg/kg) e Xilazina (8 mg/kg) e posicionados em um estereotáxico (*Stoelting-Standard*) para cirurgia. Após tricotomia e assepsia do topo da cabeça de cada animal com iodopovidona, foi fornecida anestesia local adicional com cloridrato de lidocaína, de acordo com as etapas apresentadas no protocolo cirúrgico contido no Apêndice A. Em seguida, com a superfície do crânio exposta, medidas estereotáxicas para posicionamento da cânula foram feitas com base na posição de bregma para ratos de aproximadamente 290 g, de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (Paxinos et al., 2007), 2007: -0,8 mm caudal, -1,6 mm lateral, -3,4 mm ventral. A cânula consiste de um fragmento de agulha hipodérmica de 10 mm (BD 0,70 x 25 mm 22G) preparada com auxílio de um paquímetro e micro retífica (Dremel Stylus) para garantir um tamanho uniforme das cânulas. Para avaliação de EEG, foram posicionados cinco eletrodos, cada um deles consistindo de um parafuso soldado com fio de cobre, nas coordenadas descritas na Tabela 1, com base em bregma (Paxinos et al., 2007):

*Tabela 1 - Coordenadas estereotáxicas para posicionamento de cânula e eletrodos, com base na posição de bregma para ratos de aproximadamente 290 g*

COORDENADAS:	DESCRIÇÃO DO POSICIONAMENTO DOS ELETRODOS:
+2 mm AP e +3 mm ML	Sobre o lobo frontal esquerdo, usado como eletrodo de referência e aterramento para os canais frontal e parietal
+2 mm AP e -3 mm ML	Sobre o lobo frontal direito (canal frontal)
-2 mm AP e +3 mm ML	Sobre o lobo parietal esquerdo (canal parietal)
-6 mm AP e +3 mm ML	Sobre o lobo occipital esquerdo
-6 mm AP e -3 mm ML	Sobre o lobo occipital direito

A montagem de EEG foi realizada cobrindo os lobos cerebrais frontal, parietal e occipital (Figura 4). Cânula e eletrodos foram fixados com acrilato dental, e, após a polimerização do cimento, a cânula foi selada com um fragmento de aço inoxidável para evitar sua obstrução.



*Figura 4. Animal, sob anestesia, durante protocolo cirúrgico para implante de eletrodos e cânulas. Note o esquema de posicionamento utilizado para os eletrodos (parafusos) e cânula (▼).*

Após cinco a sete dias de recuperação da cirurgia, os roedores foram conectados (Figura 5) a um sistema *wireless* com 3 canais de monitoramento por vídeo-EEG (Pinnacle Technologies, EUA, sistema 8200-K9-SE3) e foram submetidos ao protocolo experimental para teste de indução aguda de convulsões para monitoramento comportamental, coleta e comparação em tempo real com dados de EEG.



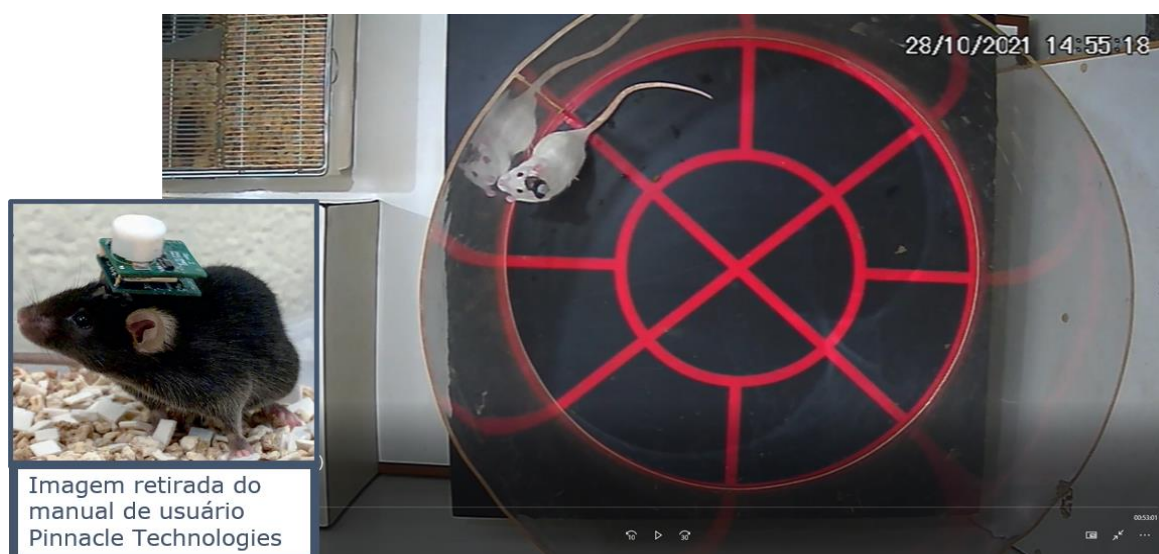
Figura 5. Animal conectado ao headstage do sistema *wireless* 8200-K9-SE3 da Pinnacle Technologies para captação de EEG.

### 2.3.7. Teste de Indução Aguda de Convulsões

Para o protocolo de indução aguda de convulsões (Apêndice B), o convulsivante Pentilenotetrazol (PTZ) foi administrado via intraperitoneal (i.p.) em seis animais e por via subcutânea (s.c.) nos outros três animais. A indução química de convulsões epileptiformes foi realizada com sucesso ao replicarmos o método de indução e classificação de convulsões com PTZ por injeção única, empregado por Jan Van Erum e colaboradores em 2019 (Van Erum et al., 2019).

Seguindo esse método, foi administrado, para cada animal dos grupos PTZ e PTZ + Jejum, 3  $\mu$ L de uma solução composta por 20% dimetil sulfoxido (DMSO) em solução salina via i.c.v. e, para os grupos PTZ + AM251 e PTZ + AM251 em jejum, 0,25  $\mu$ g de AM251 por animal, diluídos em 3  $\mu$ L da solução DMSO / salina em proporção 2:8. Trinta minutos após a administração i.c.v., cada animal recebeu uma dose de 70 mg/kg de PTZ, ou de solução salina (em dias de experimento controle), e foi colocado no ambiente experimental para ser filmado continuamente por uma hora. Este procedimento foi realizado com todos os animais em ambas condições (*Ad libitum* e jejum).

A atividade de EEG e os registros simultâneos de comportamento convulsivo foram gravados com os animais posicionados dentro de uma arena, cercada por um cilindro acrílico de Plexiglass (Figura 6). O delineamento dos ensaios de convulsões foi pensado para possibilitar o registro de EEG em dois dias consecutivos, já que grande parte do interesse de análise do registro de EEG estava concentrada no período de transição entre o sinal neuronal do animal resguardado de qualquer procedimento experimental e o sinal com estabelecimento das crises epileptiformes no EEG. Assim, foi registrado, para cada animal, tanto um período basal de 30 minutos quanto um período de registro experimental de 1 h, em ambos os dias de coleta (controle e ensaio de convulsão).



*Figura 6. Rato wistar posicionado em arena, cercada por um cilindro acrílico de Plexiglass, para registro de vídeo-EEG. Note que esse animal não possui restrição de movimento, o que contribui significativamente para uma análise comportamental mais acurada. À esquerda temos uma imagem ampliada a partir do manual de usuário do equipamento utilizado, demonstrando um camundongo com o mesmo equipamento de registro wireless.*

### 2.3.8. Aquisição do Sinal de EEG

O registro eletroencefalográfico foi realizado por meio de implante epidural craniano de cinco eletrodos (Figura 7a), conforme descrito na seção “Procedimento Cirúrgico”. Cada eletrodo foi constituído de um pequeno parafuso metálico soldado a um fragmento de fio de cobre, que, por sua vez, era soldado, durante o procedimento cirúrgico, a um dos seis pinos metálicos de um conector Mill-max (*Surface mount socket for 0,15”-0,20”, double row, 0,050” pitch #853-43-006-30-01000*) (Figura 7b). Assim, era possibilitada a condução elétrica entre o líquido cefalorraquidiano (LCR) do cérebro do animal, em contato com a ponta dos parafusos, e o sistema *wireless* de captação do sinal eletroencefalográfico (Figura 7c).

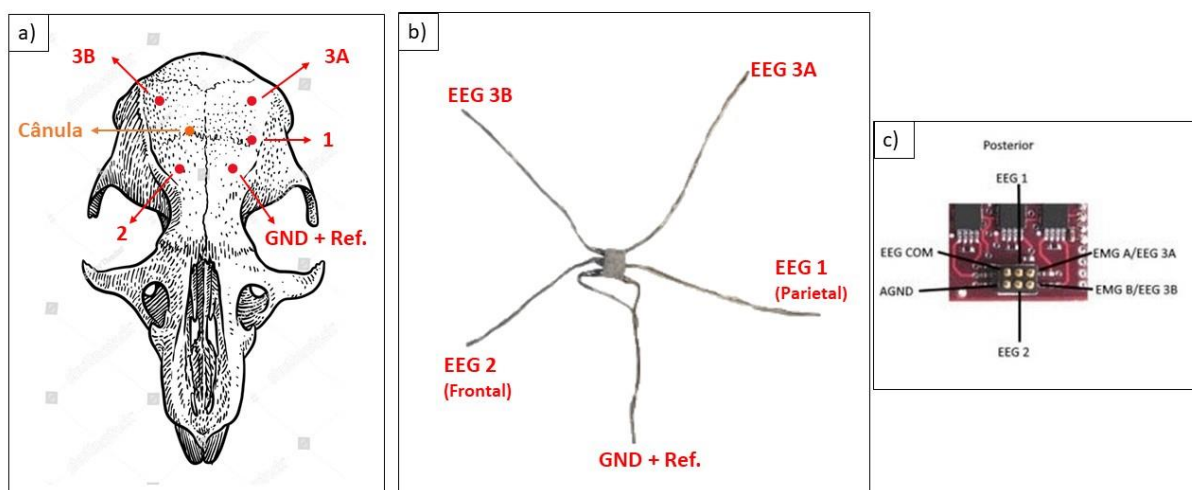


Figura 7. Esquema de montagem de eletrodos para coleta de EEG. A) Esquema figurativo da posição de implantação craniana de eletrodos e cânula. B) Exemplo de conector Millmax soldado a fios de cobre para permitir conexão com eletrodos implantados. C) sistema de captação wireless.

O referido sistema funciona de forma a mensurar a diferença de potencial elétrico entre pares de eletrodos, sendo EEG 1 e EEG 2 em relação a um eletrodo de referência sobre o córtex frontal, e EEG 3A em relação a EEG 3B, ambos sobre o córtex occipital. O sinal de EEG, é então filtrado, pré amplificado e digitalizado pelo sistema de captação, e enviado como sinal digital *wireless* para um Receptor de *Bluetooth* USB conectado ao computador de registro.

Para os registros realizados, o sinal de EEG foi amostrado a uma taxa fixa de 256 Hz ou 1024 Hz, com um ganho de pré amplificação definido em 100x, seguindo

as especificações do fabricante. O sistema *wireless* oferece a vantagem de realizar a amplificação do sinal ainda acima da cabeça do animal (Figura 8), reduzindo a presença de artefatos de movimento (ruídos) no sinal de EEG, o que é particularmente importante em modelos animais de convulsão. A taxa de amostragem utilizada foi aumentada durante o curso do projeto para evitar o efeito de *aliasing* nos picos de atividade convulsiva, que demonstraram exceder a amplitude máxima captada pelo equipamento de registro.

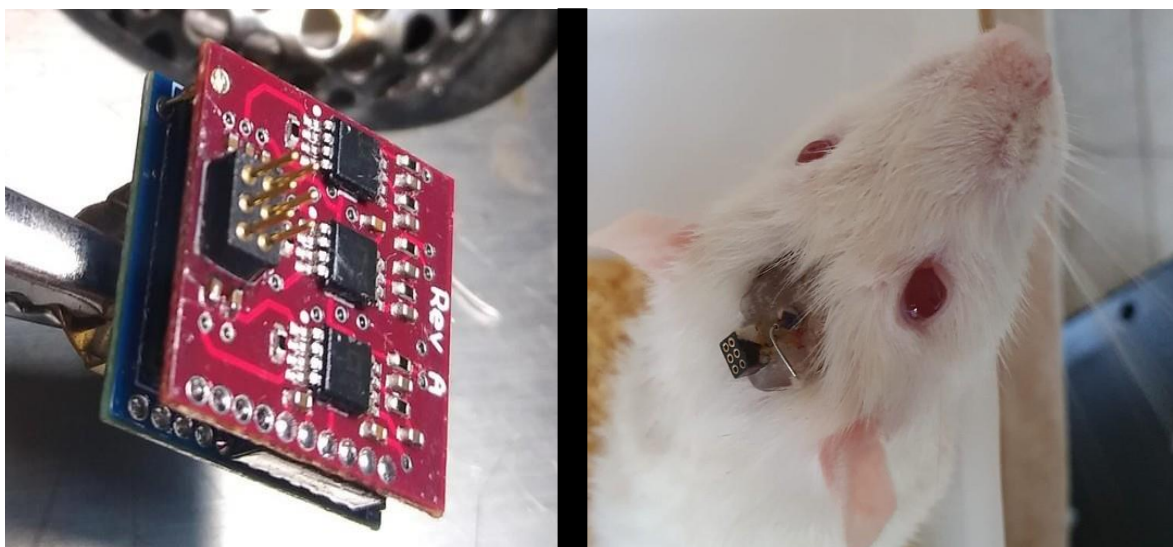


Figura 8. Sistema de captação do sinal de EEG. À esquerda podemos ver, em detalhe, a placa de recepção do sinal, e à direita temos a visão superior do conector Millmax, após este ser implantado no animal. Ao lado do conector é possível visualizar a entrada da cânula para injeção i.c.v., recoberta por um fragmento de aço inoxidável.

### 2.3.9. Eutanásia e Perfusão

Após finalizar o registro contínuo de EEG e a filmagem comportamental do teste de indução aguda de convulsões, cada animal foi administrado com uma injeção intraperitoneal de overdose anestésica. Para tanto, foi quadruplicada a dose de Cetamina e triplicada a dose de Xilazina utilizadas no protocolo cirúrgico, sendo o volume final da injeção letal calculado de acordo com o peso de cada animal, seguindo a fórmula:  $(\text{dose em mg/kg} * \text{peso do animal em kg}) / \text{concentração em mg/mL}$ .

Depois de conferida a ausência de reflexos motores nas patas do animal, assegurando assim um nível profundo de anestesia (do qual o rato não seria mais



capaz de se recuperar), cada animal foi perfundido de acordo com o protocolo apresentado no Apêndice C. As perfusões foram realizadas por meio de punção cardíaca via ventrículo esquerdo. Após eutanasiado e perfundido, o cérebro do animal era removido por craniotomia, de forma a manter o cérebro o mais intacto possível (Figura 9), e o mesmo era reservado em solução refrigerada de formaldeído a 4%, para posterior análise histológica e conferência do posicionamento da cânula.



*Figura 9. Cérebro retirado por craniotomia. Note o dano tecidual causado pela cirurgia de implantação de cânulas e eletrodos.*

### **2.3.10. Análise de Dados Comportamentais**

Todos os animais foram registrados em vídeo durante os testes de indução aguda de convulsões realizados pela autora, tanto em visão superior como em visão lateral (Figura 10), com os vídeos sendo temporalmente sincronizados. Os vídeos laterais foram registrados para viabilizar a avaliação de convulsões parciais, expressadas por tremor de vibrissas e movimentos orofaciais. No entanto, ainda assim não foi possível obter, por meio dos vídeos de visão lateral, a acuidade visual necessária para a análise de comportamentos motores finos associados às convulsões parciais. Sendo assim, apenas os vídeos de visão superior foram utilizados para as presentes análises.



Figura 10. Ratos durante bioensaios para indução de convulsões epileptiformes. A esquerda, frame de vídeo em visão lateral do animal. A direita, exemplo de frame de vídeo superior.

Os vídeos de visão superior foram anonimizados pela autora, para garantir uma avaliação cega, e a análise dos mesmos foi realizada pela colaboradora M.Sc. Maria Varela Torres Quintanilha, pesquisadora treinada na análise comportamental de roedores. Durante a análise, os comportamentos foram avaliados a cada *frame* (30 *frames* por segundo), em relação ao tempo do vídeo, que era coordenado ao registro de EEG na precisão de milissegundos. O registro por vídeo superior foi fundamental para a identificação de crises epileptiformes generalizadas, e caracterizou a técnica de vídeo-EEG utilizada nos presentes experimentos.

O registro do comportamento animal por vídeo consiste em ferramenta chave, sendo utilizado no mundo inteiro para a avaliação de crises epileptiformes em roedores. Uma das principais vantagens de se acompanhar o registro de EEG por vídeo permite identificar momentos de aparente atividade paroxística no EEG que são, na verdade, associados a comportamentos estereotipados dos animais (p.ex., ranger os dentes ou arranhar o chão).

Para avaliação dos comportamentos registrados em vídeo, foi utilizada a escala revisada de Racine para convulsões induzidas por PTZ (Van Erum et al., 2019). Essa escala (Figura 11) foi desenvolvida para reconhecimento dos padrões comportamentais típicos de convulsões induzidas por PTZ em camundongos.

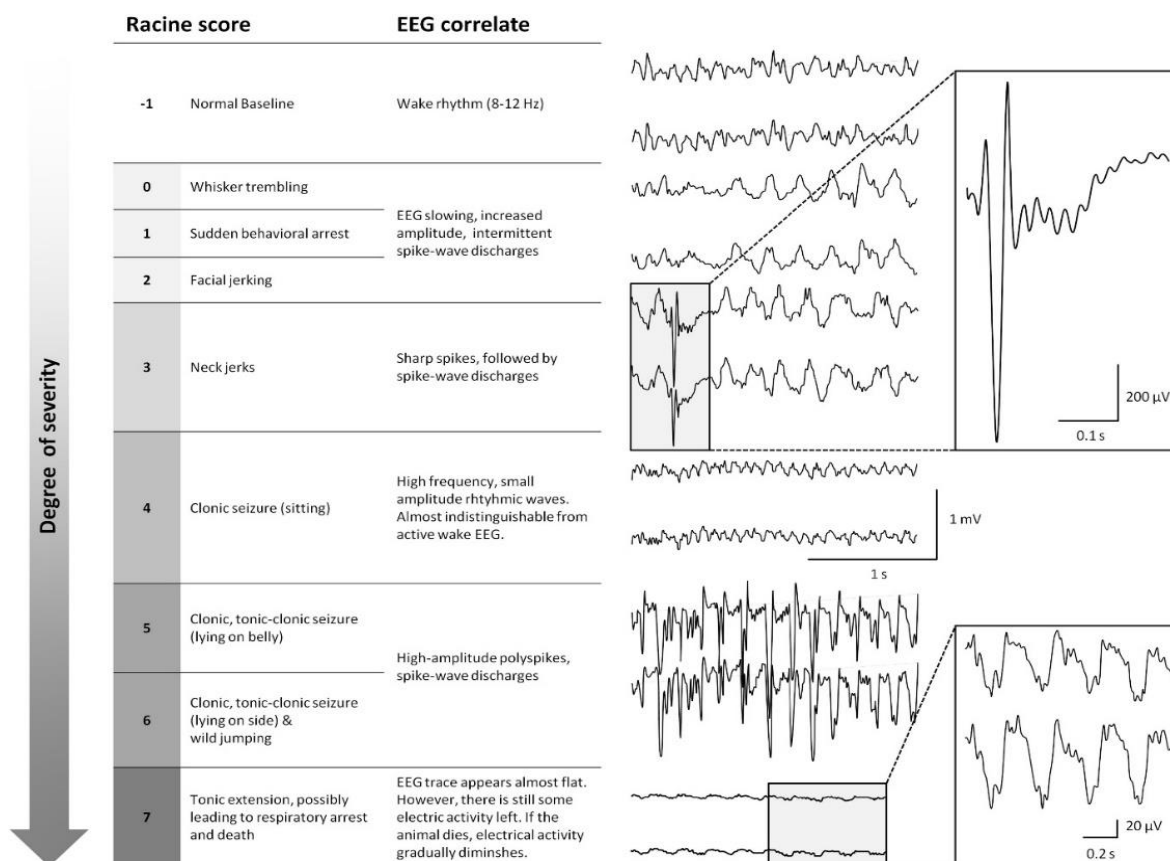


Figura 11. Reproduzida do artigo “PTZ-induced seizures in mice require a revised Racine scale” (Van Erum et al., 2019), sem modificações, sob a licença Creative Commons BY 4.0. A figura indica a Escala adaptada para convulsões induzidas por PTZ em 7 níveis, e os correlatos comportamentais e eletrofisiológicos encontrados pelos autores utilizando camundongos.

Apesar de desenvolvida para camundongos, a vantagem da utilização da escala de Van Erum e colaboradores para a análise de dados desse projeto está em um delineamento experimental de injeção única de PTZ e com o uso de eletrodos epidurais para o registro de EEG, assim como foi realizado no presente trabalho. Entretanto, vale ressaltar que essa escala, proposta em 2019 por Van Erum et. al., consiste em uma extensão da classificação dos padrões epileptiformes propostos para ratos em 2009 (Lüttjohann et al., 2009), e de forma alguma desconsidera o uso da mesma, que, até o momento de escrita deste trabalho, é considerada o padrão ouro para avaliação de crises epileptiformes em ratos. Assim, apesar da escala proposta em 2019 ter sido utilizada como referência para a inspeção de correlatos epileptiformes no EEG, ambas as escalas propostas para a indução de convulsões agudas por PTZ foram avaliadas e levadas em consideração durante a classificação comportamental dos modelos de convulsões aqui desenvolvidos (Tabela 2).

*Tabela 2 - Escala de Racine adaptada a partir de Van Erum et. al. (2019), para convulsões induzidas por PTZ*

Escore	Comportamentos
0	Sem observação comportamental / tremor de vibrissas
1	Parada súbita dos comportamentos
2	Movimentos orofaciais
3	Mioclonias de cabeça
4	Crise clônica na posição sentada
5	Crise clônica e/ou tônico-clônica deitado de barriga, e/ou crise tônica pura
6	Crise clônica e/ou tônico-clônica deitado de lado (perda de controle postural) e/ou saltos violentos e rolamentos
7	Extensão tônica seguida de parada cardiorrespiratória e possível morte

### 2.3.11. Análise Histológica e de Posicionamento da Cânula

Após realizado o protocolo de perfusão e eutanásia para extração e armazenamento do cérebro de cada animal, foi verificado o posicionamento da cânula guia utilizada para a injeção i.c.v de AM251. Para isso, o tecido cerebral foi seccionado manualmente de forma a expor a ablação realizada pela cânula guia. A cânula foi considerada em posição correta somente quando foi possível visualizar, em lupa, a completa ablação da região do córtex e do corpo caloso em que se inseriu a cânula, garantindo, assim, que houve acesso ao ventrículo lateral direito cerebral.

Ademais, para garantir a precisão das coordenadas escolhidas para inserção da cânula durante o protocolo cirúrgico, os cérebros dos três primeiros animais que não foram incluídos na análise histológica foram injetados, via cânula, com azul de metileno. Quando ambos os hemisférios foram corados em azul, se comprovou o correto acesso ao ventrículo lateral direito e a precisão do local de inserção da cânula durante a cirurgia.

Para além da análise de posicionamento das cânulas, foi realizada análise histológica para contagem de neurônios piramidais presentes nas camadas hipocâmpais CA1, CA3 e Giro Denteado. Para isso, após a secção manual para verificar o posicionamento da cânula, o tecido cerebral de cada animal foi adicionalmente seccionado em micrótomo, em cortes de 50 µm de espessura. As

secções foram realizadas entre -2,6 mm AP e -3,6 mm AP, com base na posição de bregma (Paxinos et al., 2007), e selecionadas em lupa por inspeção visual, seguindo os padrões morfológicos apresentados no atlas de Paxinos e Watson. A contagem de células foi realizada por meio da marcação dos corpos celulares por corante Cresil Violeta, aplicando a técnica de Nissl, com o objetivo de identificar mudança na taxa de morte celular interligada às alterações dos sintomas de convulsões epiléticas relacionados ao jejum.

Após coradas, as lâminas foram analisadas em microscópio óptico e foram capturadas três fotos, uma de cada região de interesse (CA1, CA3 e Giro Denteado), sempre na mesma posição anatômica. Para a contagem do número de células nas fotos, foi utilizado o *software* Fiji Is Just Image J (FIJI)®. Nesse *software*, foram delimitadas três regiões quadradas, sempre seguindo as mesmas coordenadas x e y aproximadas, de forma que cada região quadrada correspondesse a uma área fixa de 160 mm<sup>2</sup>. Foi, então, contabilizada a média do número de neurônios piramidais por milímetro quadrado em cada região de interesse.

## 2.4. RESULTADOS PARCIAIS

### 2.4.1. Efeito do Jejum e do Bloqueio de Receptores Endocanabinóides nas Convulsões Induzidas por PTZ

No presente trabalho foi avaliado o jejum como possível modulador de convulsões epileptiformes induzidas por PTZ em ratos. Com essa avaliação objetivamos replicar resultados animadores obtidos previamente em nosso grupo de pesquisa (Figura 12), que demonstraram a redução de latência para o estabelecimento de crise epileptiforme máxima em animais submetidos a jejum de 24 horas, assim como o aumento de duração e intensidade das convulsões induzidas por PTZ durante o jejum.

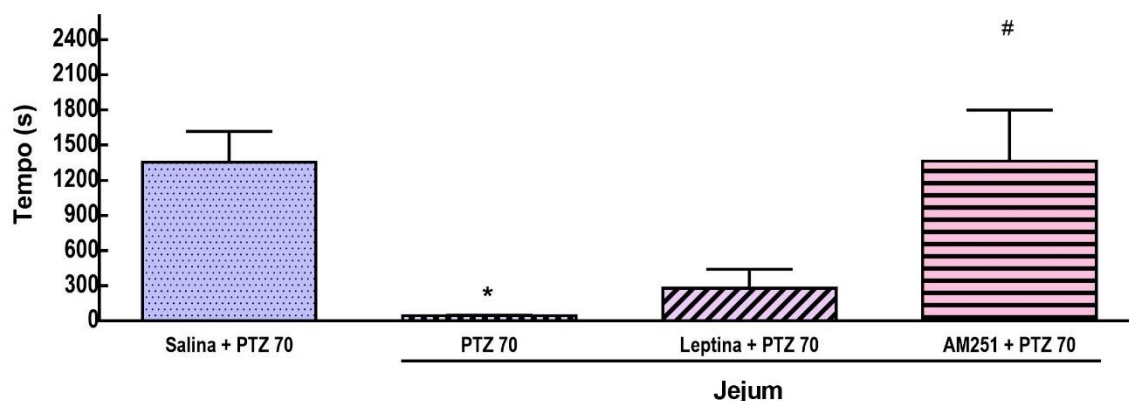


Figura 12. Gráfico reproduzido com autorização da pesquisadora Msc. Flavia Maria Medeiros Gomes e colaboradores (Relatório de Iniciação Científica 2010-2011), denotando resultados obtidos previamente quanto à latência para estabelecimento de crise máxima em animais submetidos a dosagem de 70 mg/kg de PTZ intraperitoneal. (\*) Indica diferença significativa entre os grupos PTZ 70 na condição ad libitum e quando submetidos ao jejum de 24 h. (#) Denota diferença significativa em relação ao grupo PTZ 70 no jejum

Entretanto, não foi possível observar, no presente estudo, alterações significativas entre animais com alimentação livre e aqueles submetidos ao jejum de 24 horas (Figura 13). Além de não ser possível verificar nenhum efeito do jejum sobre a latência para a crise máxima, também não foi possível replicar qualquer efeito de reversão do AM-251 sobre esse suposto efeito. Sendo assim, este trabalho não possui dados que permitam abordar os efeitos do jejum na modulação de convulsões epileptiformes induzidas por PTZ.

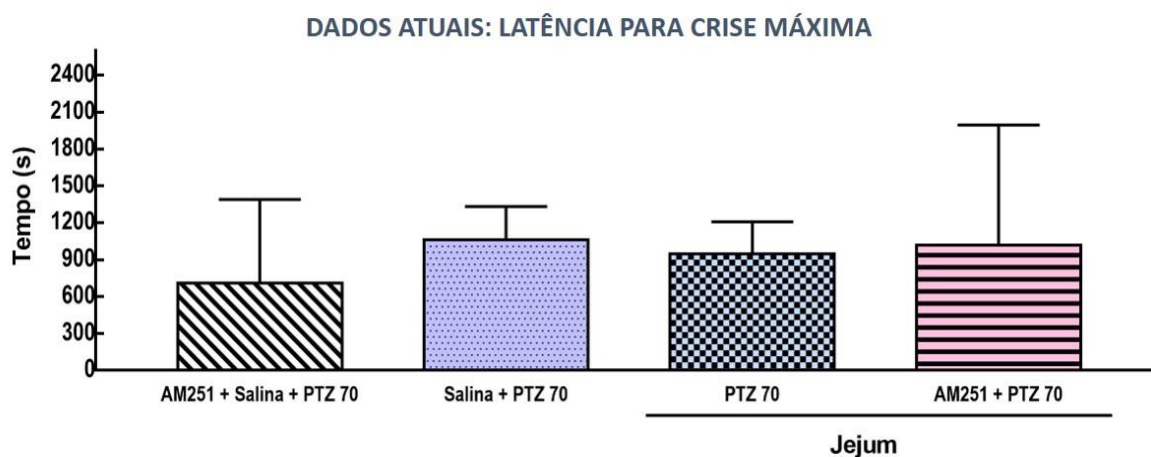


Figura 13. Latência para estabelecimento de crise máxima em animais submetidos a dosagem de 70 mg/kg de PTZ e sujeitos ou não ao jejum de 24h. Não houve diferença significativa entre os grupos em jejum e com alimentação livre (ad Libitum). PTZ (n = 5), PTZ + Jejum (n = 3), PTZ + AM251 em jejum (n = 2) e PTZ + AM251 (n = 2).

Existem algumas possíveis explicações para essa discordância entre os resultados comportamentais obtidos agora, em relação aos resultados obtidos em 2011, principalmente devido a alterações na rotina de cuidados dos animais durante o período de emergência sanitária imposto em razão da pandemia de Covid-19, que afetou sobremaneira o funcionamento de todos setores da Universidade.

Notadamente os animais empregados no estudo apresentaram um ganho de peso semanal muito abaixo do esperado. A autora deste projeto não mediu esforços em realizar o acompanhamento de peso dos animais, garantindo pleno acesso à ração e água e também testando variações na dieta dos animais, em busca de aumentar a propensão desses ao ganho de peso, no entanto, decorreram-se meses sem que fosse observado o aumento progressivo no peso dos animais em acompanhamento.

Portanto, devido aos limites de tempo para o desenvolvimento do projeto de pesquisa, optou-se por mudar o foco das análises para a inspeção de padrões eletroencefalográficos associados às convulsões epileptiformes observadas comportamentalmente, apresentados no capítulo dois dessa dissertação. Trabalhos futuros de nosso grupo de pesquisa irão retomar esses experimentos para a completa avaliação comportamental e eletrofisiológica dos efeitos do jejum e do bloqueio de receptores CB1 sobre as convulsões epiléticas induzidas por PTZ.

#### **2.4.2. Achados Histológicos**

A análise de posicionamento da cânula foi inicialmente realizada para determinar a inclusão de animais em grupos administrados com AM251. Como a análise por comparação de grupos experimentais foi impossibilitada pela ausência de achados a favor do efeito do jejum sobre convulsões epileptiformes, os preparados histológicos não serão utilizados para realizar a comparação entre o número de neurônios piramidais entre grupos experimentais. A análise de posicionamento da cânula para garantir a correta injeção de AM251 também não se aplica aos parâmetros analisados no presente estudo.

## 3 SEGUNDO CAPÍTULO

### 3.1. INTRODUÇÃO

#### 3.1.1. O Eletroencefalograma na Saúde e na Doença

A controversa ideia de que a atividade elétrica do cérebro poderia ser registrada por um eletrodo e amplificada de forma a ser possível plotar as mudanças de voltagem neuronal, captadas ao longo do tempo por meio de um eletroencefalograma (EEG), foi originalmente proposta por Hans Berger, em 1929. No entanto, a técnica foi aceita apenas seis anos depois, em 1935, com a confirmação das audaciosas proposições de Berger (1929) por Jasper e Carmichael, paralelamente pelo grupo de Gibbs, Davis e Lennox. Atualmente, o EEG é uma técnica consolidada tanto no meio científico como em suas diversas aplicações clínicas (Luck, 2014). O monitoramento por EEG permite a identificação clínica de profundidade anestésica, a pesquisa dos estágios e padrões do sono, a investigação de diversos processos cognitivos e, em especial, a identificação clínica de crises epiléticas, além da investigação de várias patologias neurológicas como epilepsias, tumores, lesões, derrames, doenças infecciosas, coma e morte cerebral (Nunez & Srinivasan, 2006).

O EEG é um método de alta resolução temporal que permite acompanhar a atividade dos neurônios do córtex cerebral ao medir flutuações de tensão elétrica entre pares de eletrodos condutores (Jackson & Bolger, 2014; Luck, 2014). A atividade neuronal é expressa por dois tipos de voltagens: Potenciais de Ação (P.A) e Potenciais Pós-Sinápticos (P.P.S). Os P.A são resultantes do rápido influxo e efluxo de íons, e são conduzidos através da membrana celular de um neurônio. Já os P.P.S são gerados no processo de liberação de neurotransmissores na fenda sináptica (liberação, esta, sinalizada por P.A), que, por sua vez, levam à abertura de canais voltagem-dependentes próximos ao terminal sináptico de um outro neurônio. A abertura de canais dependentes de voltagem no neurônio pós-sináptico gera um lento e gradual influxo e efluxo de cargas iônicas pela membrana celular, o P.P.S (Purves et al., 2012). Dentre os potenciais de membrana celular, somente os P.P.S são



somados temporalmente de forma a serem captados pelo registro superficial de EEG. Isso ocorre pois P.P.S são potenciais mais lentos e espacialmente localizados, características que permitem sua somação temporal (Luck, 2014; Purves et al., 2012).

Como o EEG mensura a corrente elétrica que se desloca de maneira fluida entre eletrodos, o sinal captado em cada um dos eletrodos é chamado de “voltagem”, e indica a pressão de deslocamento da corrente elétrica (Luck, 2014). Assim, o EEG permite acompanhar de forma simples a atividade rítmica de grupos de neurônios ao longo do tempo. Entretanto, isso somente é possível devido ao fenômeno de *condução de volume*, que permite a dissipação passiva dos potenciais elétricos neuronais (i.e., P.P.S) por meio do líquido cefalorraquidiano (LCR) até a superfície cortical (Figura 14), onde a energia resultante da soma dessas voltagens elétricas será captada por eletrodos superficiais (Jackson & Bolger, 2014; Luck, 2014; Nunez & Srinivasan, 2006).

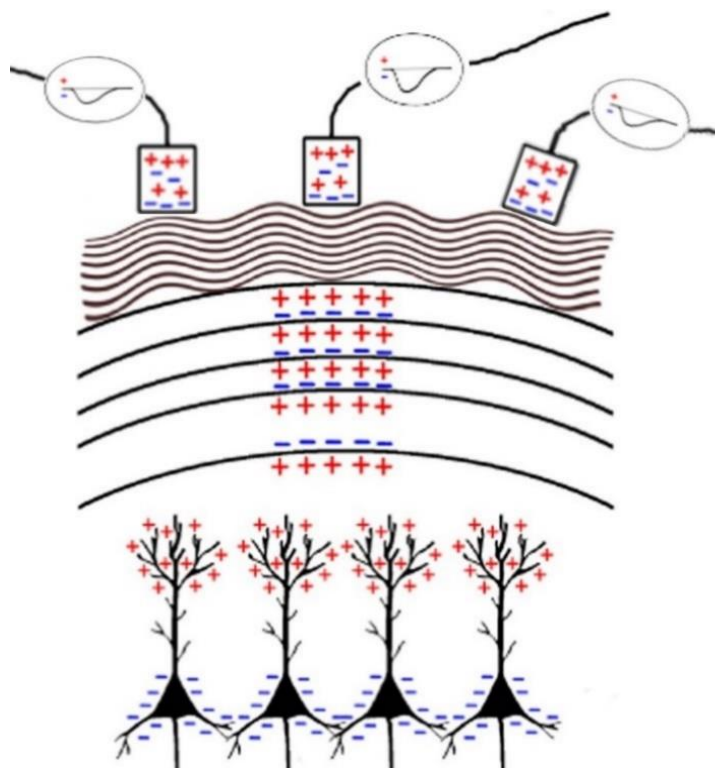


Figura 14. Esquema adaptado, com permissão de “John Wiley and Sons” (licença nº 5318800360556), a partir do artigo “The neurophysiological bases of EEG and EEG measurement: A review for the rest of us”. A figura ilustra a dissipação passiva de potenciais elétricos de neurônios corticais pós sinápticos através de tecidos das meninges, do crânio e músculos até a superfície cortical, onde ocorre sua captação por eletrodos de registro.

Da mesma forma que a atividade elétrica de uma única célula neuronal é mensurada tomando como referência a diferença de potencial (voltagens) através da membrana celular, para que seja possível mensurar inteiras populações de neurônios por meio de potenciais extracelulares, resultantes da somação da atividade conjunta de grupos de neurônios, é necessário estabelecer uma referência elétrica para esse sinal (Mitra & Bokil, 2008). Diferentes esquemas de referenciamento são utilizados em pesquisas eletroencefalográficas com roedores, influenciando diretamente o sinal obtido (Kadam et al., 2017).

Como toda técnica, o EEG possui suas limitações. A condução de volume reduz a precisão espacial do EEG, já que a soma de voltagens neuronais apenas será dissipada de forma a atingir a superfície cortical se possuir intensidade suficiente para tanto. O fenômeno de condução de volume também impossibilita a captação de PA's de neurônios unitários no EEG, pois as voltagens correspondentes a esses potenciais unitários serão somadas ou canceladas entre si, antes que atinjam a superfície cortical (Luck, 2014). Consequentemente, somente são registradas no EEG voltagens ocorrendo aproximadamente ao mesmo tempo em milhões de neurônios espacialmente alinhados, de forma a potencializar a magnitude das voltagens resultantes.

Outra limitação decorrente da baixa resolução espacial do EEG consiste na captação de sinal proveniente de qualquer fonte próxima, e não só a atividade elétrica do cérebro, o que leva a introjeção de ruído no sinal. Chama-se de ruído toda atividade elétrica inespecífica captada pelo EEG, o que corresponde a qualquer atividade elétrica não associada diretamente ao cérebro, ou até mesmo um sinal neuronal que não seja de interesse do pesquisador. Exemplos de ruído são: a atividade elétrica dos músculos da cabeça, dos olhos e do rosto, a eletricidade dissipada através de saídas elétricas na sala de registro e a interferência de outros aparelhos eletrônicos e fontes de alimentação próximas, como baterias. Portanto, uma medida importante para o registro de EEG é a Razão Sinal-Ruído (do inglês, SNR), cuja medida indica a qualidade do sinal neuronal de interesse em relação à quantidade de ruído captado (Jackson & Bolger, 2014).

Em resumo, o EEG é um método limitado à captação da atividade conjunta de centenas de milhares de pequenos neurônios corticais, com a utilização de eletrodos colocados sobre o couro cabeludo, ou até mesmo dentro do crânio, para melhorar a resolução espacial do sinal. Ainda, o sinal captado no EEG deverá ser filtrado e

amplificado, de forma a isolar a atividade neuronal, aumentando o valor de SNR. As células mais tradicionalmente registradas por meio de EEG são os neurônios piramidais corticais, que são espacialmente alinhados de forma perpendicular à superfície encefálica favorecendo sua captação (Jackson & Bolger, 2014; Luck, 2014).

A maior vantagem oferecida pelo EEG, por outro lado, consiste em sua alta precisão temporal. Isso ocorre porque os dados captados pelo EEG são interpretados computacionalmente em padrões cíclicos, o que permite a leitura das flutuações de tensão elétrica que ocorrem nos neurônios em razão do número de ciclos por segundo, que são medidos em Hertz. Assim, é possível visualizar a distribuição de voltagens extracelulares resultantes da troca iônica gerada pela atividade neuronal ao longo do tempo, a cada milissegundo. Em síntese, cada eletrodo de EEG age como um condutor elétrico, captando e registrando digitalmente a soma das voltagens neuronais próximas ao local de registro, a cada instante no tempo.

O EEG é um equipamento de baixo custo (relativo a equipamentos semelhantes), que possibilita a translação entre pesquisas pré-clínicas em roedores e tratamentos clínicos em humanos epiléticos. Portanto, as características dos equipamentos de eletroencefalografia tornam esta técnica extremamente vantajosa para o estudo da atividade neuronal na saúde e na doença (Kadam et al., 2017; Maheshwari, 2020). Inclusive, o advento do EEG possibilitou o primeiro acesso direto ao estudo da função cerebral (Patel & Moshé, 2020). Em particular, o EEG é extremamente adequado para o estudo dos correlatos da atividade cerebral com as manifestações comportamentais, a cada segundo, durante a ocorrência de crises epiléticas. A atividade epileptiforme observada no EEG durante a investigação diagnóstica de epilepsia é bastante similar entre humanos e outros mamíferos. Em especial, as características físicas do sinal elétrico neuronal como fase, frequência e amplitude do sinal, são comuns entre humanos e roedores (Kadam et al., 2017; Maheshwari, 2020).

Os padrões eletroencefalográficos mensurados pelo EEG constituem uma ferramenta chave para o correto diagnóstico, classificação e identificação precoce dos diferentes tipos de crises epiléticas, sendo introduzido como método de rotina para localização e remoção cirúrgica de focos epileptogênicos (Patel & Moshé, 2020). Entretanto, não existe, até o presente momento, um padrão consolidado na literatura para a detecção de correlatos eletroencefalográficos de crises epiléticas (Maheshwari, 2020). Novas ferramentas para detecção de crises epiléticas estão

sendo continuamente desenvolvidas por variados laboratórios, utilizando diversas metodologias tanto de forma manual, por meio de técnicas de processamento de sinais, quanto pelo desenvolvimento de métodos automatizados (Figura 15) com o uso de Inteligência Artificial (Acharya et al., 2013; Liu et al., 2021).

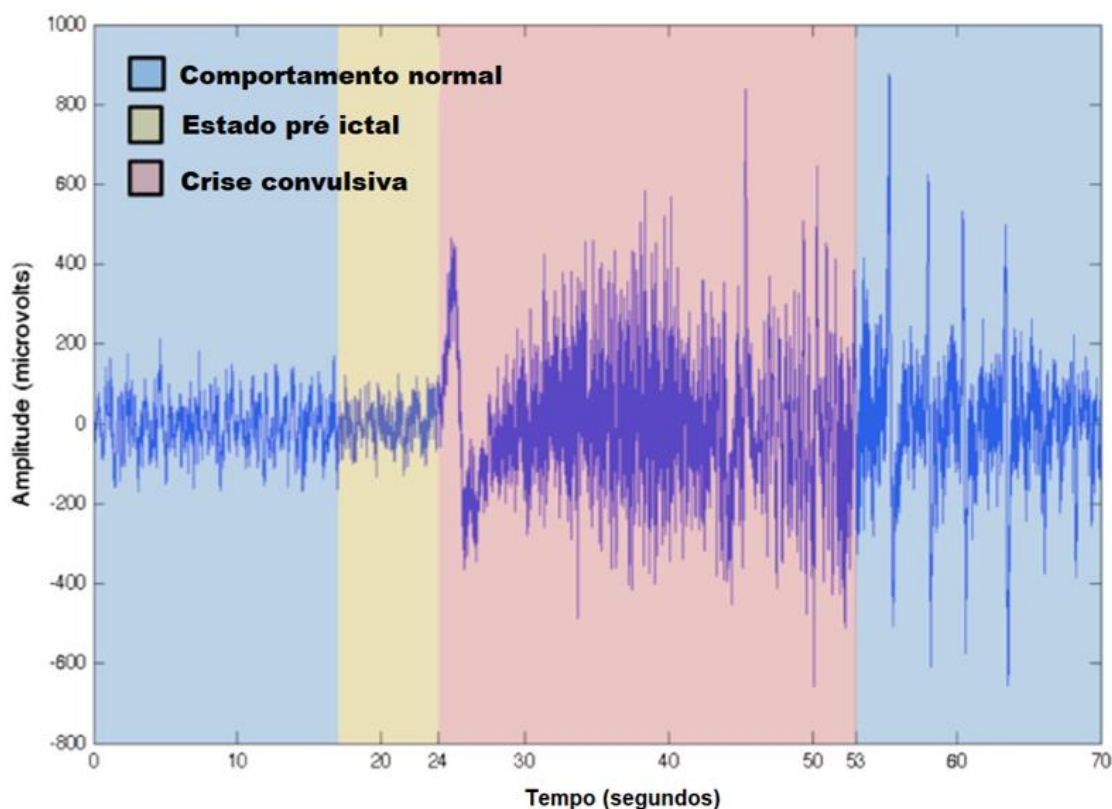


Figura 15. Imagem reproduzida do artigo “EEG seizure detection and prediction algorithms: a survey”, sob a licença Creative Commons BY 4.0. Figura denota exemplo de sinal de EEG contendo crise epiléptica. Períodos identificados por software automatizado, demonstrando o uso de tais ferramentas na área. Repare a identificação visual clara de períodos de crise, denotando a relevância do EEG na classificação e diagnóstico de crises epilépticas.

Em humanos, a epilepsia é diagnosticada a partir da recorrência periódica de convulsões espontâneas. Após uma primeira convulsão espontânea, a chance de recorrência é reduzida com o passar do tempo, com aproximadamente 50% das recorrências ocorrendo dentro de seis meses da primeira convulsão (Beghi, 2020). A caracterização da convulsão inicial por EEG, e a documentação do início do primeiro episódio convulsivo são os principais preditores da possibilidade de recorrência, assim possibilitando diagnóstico de epilepsia (Beghi, 2020). Apesar de técnicas de neuroimagem como a ressonância magnética funcional também serem uma importante ferramenta diagnóstica, principalmente na detecção de focos e lesões epileptogênicas, essas técnicas costumam apresentar restrições relativas ao alto

custo e baixa acessibilidade, e de forma alguma excluem a essencial importância diagnóstica do EEG (Ali, 2018).

### 3.1.2. EEG Aplicado A Modelos Animais Em Epilepsia

Um modelo animal de epilepsia faz referência a uma espécie animal que se torna propensa a desenvolver convulsões, seja de forma direta (induzida) ou de forma hereditária. Existem variados modelos animais que são utilizados na pesquisa em epilepsia, incluso gatos, cachorros, coelhos, porcos, aves, sapos *Xenopus* e até leões marinhos, já que essencialmente todos os animais com SNC são passíveis ao desenvolvimento de convulsões (Grone & Baraban, 2015). Os modelos animais mais comuns em epilepsia são conduzidos em roedores, possivelmente devido ao seu tamanho reduzido, facilidade de criação e rápida reprodução. No entanto, as espécies mais afetadas pela epilepsia são as espécies caninas, com uma prevalência entre 0.6% e 0.8% de cães epiléticos, o que torna essa doença também de interesse veterinário (García-Belenguer et al., 2021; Grone and Baraban, 2015; Löscher, 1999).

Os diversos modelos animais existentes podem ser classificados como modelos de crises epiléticas (que retratam o sintoma de convulsões, característico da epilepsia) e modelos de epilepsia idiopática, que retratam a condição crônica e espontânea. Modelos que simulam a condição patológica da epilepsia podem ser obtidos a partir de manipulações genéticas, de forma a gerar animais propensos a convulsões espontâneas recorrentes ou animais propensos a convulsões provocadas por estímulo externo (e.g. feixes de luz, estímulo sonoro alto, etc.) (Löscher, 2011).

Modelos animais do sintoma de crise epilética são incutidos em animais saudáveis, e podem ser induzidos de forma elétrica ou química. A indução pontual de convulsões é denominada de modelo agudo. A indução repetitiva de crises epileptiformes, de forma a gerar um estado de crise que se torna crônico, é chamado de “*kindling*”. A indução pontual desencadeando um estado crônico irreversível de crises (*Estatus Epilepticus*) constitui em um terceiro tipo de modelo animal, que, por sua vez, leva a ocorrência de crises epiléticas recorrentes e espontâneas posteriormente ao *Estatus Epilepticus* (Löscher, 2011).

O modelo de indução de crises epiléticas por PTZ pode ser estabelecido de forma aguda ou de forma crônica, em *kindling* (Löscher, 1999; Lüttjohann et al., 2009). O estabelecimento do estado de *kindling* ocorre porque, apesar do fármaco PTZ possuir uma meia vida de aproximadamente 2 h e 30 min (Esplin & Woodbury, 1956), a metabolização do mesmo gera alterações de longo prazo no SNC, que são conhecidas por reduzir o limiar de excitabilidade dos circuitos neuronais, tornando-os propensos a crises epileptiformes através, por exemplo, da facilitação da ligação de glutamato à membrana neuronal (Schröder et al., 1993), o que acarreta um estado crônico de crise. No presente trabalho, optou-se por utilizar o modelo agudo de convulsões epileptiformes generalizadas, quimicamente induzidas por PTZ, já que esse estudo revolveu em torno da avaliação pontual da influência do jejum, e da presumida ação canabinóides endógenos, sobre o sintoma de crise epileptiforme.

Assim como o PTZ, a maioria dos modelos animais em epilepsia são de crises epiléticas agudas induzidas em animais não epiléticos, apesar de se ter conhecimento de que modelos conduzidos em animais que desenvolvem a condição patológica crônica da epilepsia são mais proximamente relacionados à condição observada em humanos. (Löscher, 2011). Ainda prevalece, porém, a ampla utilização de modelos de indução aguda de crises epiléticas, pois estes modelos continuam a apresentar alto valor preditivo na clínica e são valorizados por apresentarem métodos simplificados de indução elétrica e química (Löscher, 1999).

A grande abrangência de possíveis modelos de estudo explica o histórico uso de animais nas pesquisas translacionais em epilepsia, especialmente para o estudo comparativo da anatomia e fisiologia do SNC (Grone & Baraban, 2015). Apesar de ocorrer historicamente, o uso de modelos animais em epilepsia é um assunto contemporâneo, já que não existe, atualmente, um método substitutivo ao emprego de animais para o estudo das alterações fisiológicas e comportamentais associadas à epilepsia, sejam elas permanentes ou transitórias (Kandratavicius et al., 2014).

Assim, a relevância do uso de animais para indução de convulsões agudas ou crônicas se dá pela inigualável capacidade de induzir e simular, nesses animais, a gama sintomatológica que caracteriza o desenvolvimento de epilepsias, incluindo as mais variadas modificações comportamentais e neuronais que desencadeiam crises epiléticas. Ademais, modelos animais de convulsões e epilepsia possuem fundamental aplicabilidade na investigação dos mecanismos responsáveis por desencadear crises epiléticas (ictogênese) ou epilepsias (epileptogênese), assim

como na busca por meios de supressão dos sintomas de crises epiléticas. Então, modelos de convulsões e epilepsia em animais são indispensáveis tanto na pesquisa de base dos mecanismos subjacentes à doença, quanto na descoberta e no desenvolvimento pré-clínico de novos compostos de ação anticonvulsivante e antiepilética.

Algumas etapas do desenvolvimento pré-clínico de fármacos que dependem do uso de animais são: a avaliação de eficácia anticonvulsivante, a avaliação de resistência ao fármaco, comparação de efeitos adversos, avaliação da duração de eficácia durante tratamentos crônicos, o cálculo de dosagem para concentração plasmática efetiva e a caracterização dos mecanismos de ação subjacentes ao desenvolvimento de convulsões e epilepsia - demonstrando, assim, a importância de tais animais na pesquisa em epilepsia (Löscher, 2011, 1999).

Apesar da grande relevância e das diversas aplicações de modelos animais de epilepsia demonstrada anteriormente, é importante ressaltar o fato de que esses modelos animais constituem uma representação simples de sistemas mais complexos, de forma que não existe um único modelo animal capaz de reproduzir a condição epilética humana em sua totalidade. Assim, se torna essencial a seleção dos aspectos específicos da condição a ser avaliada, e a seleção do tipo de modelo animal que será capaz de simular tal aspecto (Grone & Baraban, 2015; Löscher, 2017). Somente desta forma é possível assegurar a relevância do uso de animais como modelo no importante estudo da fisiopatologia de doenças como a epilepsia.

A seleção de um modelo animal pode ser validada por atender um ou mais dos seguintes critérios: 1) quando o modelo animal apresenta Validade Aparente (do inglês, "*Face Validity*"), ou seja, é capaz de reproduzir as características fenotípicas de uma doença (por exemplo, reproduzir sintomas de convulsões); 2) quando o modelo se demonstra responsivo aos tratamentos clínicos empregados em humanos, apresentando assim Validade Preditiva; e 3) quando o modelo apresenta Validade de Construto, atingindo o critério ideal de reproduzir os mecanismos fisiológicos subjacentes à doença estudada (Grone & Baraban, 2015; Kandravicius et al., 2014).

Além da seleção do modelo animal a se utilizar, é importante selecionar a técnica mais adequada ao modelo animal e ao estudo sendo conduzido. Na busca pela elucidação dos mecanismos neurobiológicos associados a epilepsia, a técnica de vídeo-EEG se consolidou como protocolo base (Kadam et al., 2017). A avaliação por EEG possibilita o acompanhamento de diferentes padrões de atividade elétrica

cerebral, incluso padrões neuronais correspondentes às mais diversas causas, sintomas e expressões fisiológicas da epilepsia. Além disso, o EEG possui especial importância no diagnóstico, no tratamento e na prevenção dessa doença complexa e multifatorial (Kadam et al., 2017). Ao sincronizar a técnica de EEG a registros de vídeo, é possível acompanhar e caracterizar crises epiléticas - que são o principal sintoma da epilepsia - facilitando, assim, a avaliação clínica da doença, e auxiliando a obtenção de diagnóstico mais preciso (Ali, 2018).

Apesar do uso de EEG em modelos animais de epilepsia possibilitar a investigação de diferentes tipos e características da doença, este também introduz um desafio de replicabilidade na pesquisa com modelos animais. A metodologia para uso de EEG pode variar quanto ao tipo dos eletrodos utilizados, quanto ao grau de invasividade na implantação de eletrodos (que pode ser superficial, epidural ou em estruturas profundas cerebrais), quanto às especificações de captação do sinal de EEG (especificações de amostragem, filtragem e amplificação) e quanto aos critérios de análise, sem mencionar as alterações no sinal de EEG que já são esperadas devido à necessidade por uma intervenção cirúrgica, o que implica possível trauma tecidual no cérebro (Kadam et al., 2017).

Uma grande contribuição para o aumento de replicabilidade em pesquisas aplicando o EEG a modelos animais de convulsões e epilepsia, é a adaptação das frequentemente utilizadas escalas desenvolvidas para a quantificação dos estágios comportamentais de crises epiléticas, que permitem a associação de padrões eletroencefalográficos (mensurados no EEG) a comportamentos convulsivos em roedores, os quais são estereotipados (Van Erum et al., 2019; Grone & Baraban, 2015; Lüttjohann et al., 2009; Racine, 1972). A primeira dessas escalas para categorização de convulsões epileptiformes, com base em sintomas motores, foi proposta por Ronald J. Racine em 1972 (Racine, 1972). Essa escala original foi desenvolvida para uso em um modelo crônico de convulsões límbicas amigdalares secundariamente generalizadas em ratos, e, portanto, deve ser adaptada para que possa ser utilizada na avaliação de convulsões induzidas pelo convulsivante químico Pentilenotrazol (Sigma-Aldrich®, EUA), um bloqueador de receptores GABA A. Em 2009, foi proposta uma adaptação dessa escala para modelos de convulsões epileptiformes induzidas por PTZ com EEG intra cortical em ratos (Lüttjohann et al., 2009). Posteriormente, foi proposta uma terceira escala (Van Erum et al., 2019), aplicando as observações de



Lüttjohann e colaboradores para um modelo de PTZ com EEG subdural em camundongos.

Tendo em vista os argumentos explicitados em favor da relevância, da necessidade e do impacto positivo do uso de modelos animais em epilepsia, no presente trabalho, buscamos dar continuidade a um projeto ainda não publicado do Laboratório de Neurofarmacologia da Universidade de Brasília (UnB), em que foi realizada a avaliação dos efeitos do jejum sob crises epiléticas induzidas por PTZ em ratos. Complementando o referido projeto, iniciado em 2011, estabelecemos uma metodologia para a coleta e análise de EEG *wireless* em roedores no Laboratório de Neurociência e Comportamento da UnB, almejando contribuir para os esforços de replicabilidade de pesquisas envolvendo modelos animais de convulsões e epilepsia.

## 3.2. OBJETIVOS

### 3.2.1. Objetivo Geral

Implementar, na UnB, uma metodologia para coleta e análise de dados eletrofisiológicos em roedores, por meio de sistema de Vídeo-EEG *wireless*, para estabelecimento de correlatos eletrofisiológicos para crises convulsivas em roedores.

### 3.2.2. Objetivos Específicos

- Replicar as observações de padrões eletrofisiológicos nos diferentes estágios de convulsões da escala adaptada de Racine, proposta em 2019;
- Adaptar o protocolo cirúrgico do Laboratório de Neurofarmacologia da UnB para implante crônico de eletrodos epidurais e de cânula intracerebroventricular;
- Implementar o protocolo de coleta de Vídeo-EEG por meio do equipamento *wireless* durante o modelo agudo de convulsões;

- Estabelecer rotinas de análise do sinal eletrofisiológico no ambiente de programação MATLAB;
- Coletar e analisar a atividade elétrica dos córtices frontal, parietal e occipital de ratos Wistar submetidos à indução química de convulsões agudas;
- Correlacionar as alterações comportamentais associadas à indução química de convulsões agudas e a eletrofisiologia associada;

### 3.3. METODOLOGIA

As subseções de “aspectos éticos”, “colaboradores”, “animais”, “procedimento cirúrgico”, “teste de indução aguda de convulsões”, “aquisição do sinal de EEG” e “eutanásia e perfusão” são comuns ao primeiro capítulo dessa dissertação, e podem ser conferidas, respectivamente, nas páginas 30, 31, 33, 35, 36 e 38.

#### 3.3.1. Definição do Grupo Experimental

A ausência de achados a favor do efeito do jejum sobre convulsões epileptiformes impossibilitou a comparação entre grupos experimentais submetidos ao jejum e com alimentação livre. Assim, para as análises realizadas nessa segunda parte do trabalho, os nove animais incluídos anteriormente foram realocados em um único grupo experimental, sendo comparados entre si, em um delineamento pareado. A comparação foi realizada entre o dia controle, resguardada a aplicação de PTZ para indução de convulsão, e dia experimental. Foi possível obter, portanto, um grupo experimental de  $N = 9$  para a inspeção de correlatos eletrofisiológicos de crises epileptiformes. Desses, seis os animais receberam uma injeção intraperitoneal (i.p.), e os outros três animais receberam uma injeção subcutânea (s.c.), na dosagem de 70 mg/kg, do convulsivante PTZ para induzir o modelo de convulsão aguda.

### 3.3.2. Análise de Dados Eletrofisiológicos

Para a realização de análises eletroencefalográficas, foi utilizado o *software* MATLAB (MathWorks) para que novas rotinas computacionais fossem programadas e semiautomatizadas. Por meio dessas rotinas, os métodos de análise foram comparados para a seleção de correlatos eletrofisiológicos ao comportamento epileptiforme. Os registros de EEG que proporcionaram a aquisição desses dados foram acompanhados por vídeo durante as sessões de coleta, caracterizando a técnica de vídeo-EEG. Assim, os dados comportamentais foram registrados em vídeo e sincronizados para serem associados aos perfis de gravação do EEG. Os perfis eletroencefalográficos foram obtidos através do SireniaAquisition® *Software* (Pinnacle Technologies) e foram exportados para o MATLAB® no formato EDF, onde cada arquivo foi analisado utilizando-se de inspeção ocular e dos parâmetros definidos pelas rotinas de codificação recém-criadas.

### 3.3.3. Aprovação Ética

Os dados comportamentais e de EEG para o presente estudo foram coletados em experimentos com roedores, aprovados pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) da UnB (UnBDoc nº 44987/2011) – (Anexo A). Durante cada etapa deste trabalho, foram encorajados e aplicados todos os esforços para minimizar o sofrimento potencial dos animais experimentais.

### 3.4. RESULTADOS

#### 3.4.1. Correlatos Eletrofisiológicos das Convulsões Induzidas por PTZ

Para permitir inspeção dos padrões eletroencefalográficos, foi validada a utilização da escala desenvolvida por Van Erum e colaboradores (Van Erum et al., 2019), que se assemelha em diversos aspectos àquela desenvolvida em 2009 para ratos, mas empregando uma única injeção de PTZ a 70 mg/kg para cada animal e utilizando eletrodos intracerebrais epidurais, reproduzindo mais fidedignamente o protocolo experimental utilizado neste trabalho.

O sinal eletrofisiológico aqui coletado foi registrado ao longo de uma hora para cada animal, sendo registrada a atividade elétrica de três eletrodos: parietal, frontal e occipital. Um registro típico do sinal é apresentado na Figura 16. Nessa e nas próximas figuras o tempo está indicado no eixo das abscissas (X), na escala de segundos ou minutos, e a amplitude do sinal fisiológico no eixo das ordenadas (Y), na escala de microvolts.

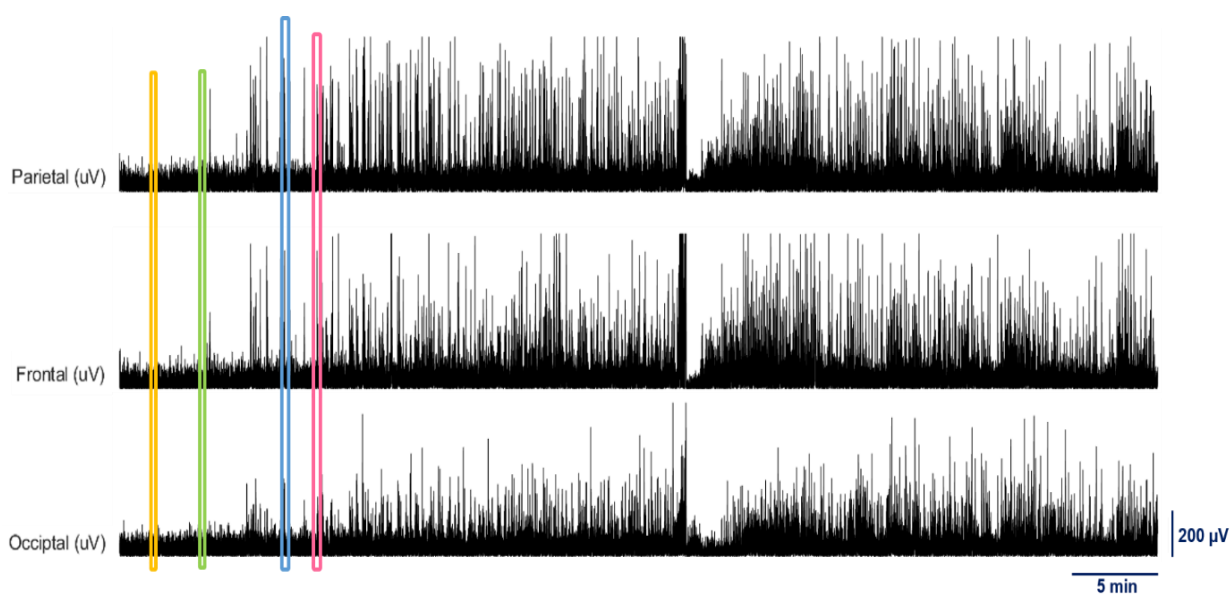


Figura 16. Exemplo de sinal bruto de EEG. As cores demonstram períodos correspondentes a convulsões epileptiformes de diferentes graus de intensidade, de acordo com a escala proposta por Van Erum e colaboradores. Amarelo = período basal; verde = grau convulsivo 0 a 2; azul = grau 4; rosa = grau 5 a 6.

Um correlato de EEG, observado tanto neste trabalho quanto na literatura mais atual, consistiu na abrupta transição de amplitude entre os padrões de atividade epileptiforme no EEG associadas a crises parciais e aqueles associados a crises generalizadas, como pode ser observado na Figura 16 pela diferença entre o sinal abaixo dos traçados verde e amarelo em relação ao sinal abaixo do traçado azul e rosa.

Neste estudo, as seguintes categorias de comportamento epileptiforme foram observadas em todos os animais avaliados: 1) mioclonias dos músculos da cabeça e pescoço, 2) convulsões clônicas em que o animal assume a posição sentada, 3) convulsões clônicas ou tônico-clônicas com o animal deitado de barriga, ou convulsões tônicas puras sem apresentar a perda de controle postural e 4) convulsões clônicas e/ou tônico-clônicas caracterizadas pela perda de controle postural, com o animal apresentando queda e/ou saltos descontrolados.

Cada uma dessas categorias comportamentais foi associada a seu correlato temporal no EEG, e foi verificada a correspondência (Figura 16) ao padrão previsto pela escala validada, apresentada na Tabela 2. A replicação dos dados de EEG apresentados por Van Erum e colaboradores em 2019 é facilmente observada ao se comparar os exemplos de registros de EEG obtidos por Van Erum et. al., reproduzidos na Figura 11 desta dissertação, e os exemplos de registros obtidos pela autora, que serão apresentados a seguir, um a um, comparativamente ao padrão descrito na literatura.

Nas presentes observações comportamentais, apenas as convulsões generalizadas (grau de intensidade de 3 a 7) descritas na escala validada foram observadas nas análises comportamentais. Portanto, para possibilitar a avaliação adicional de convulsões epileptiformes parciais (graus de intensidade de 0 a 2) descritos na Tabela 2, foi realizada a inspeção visual para identificação, nos dados de EEG, dos padrões eletroencefalográficos previstos pela escala validada.

Foram observados em nossos dados de EEG um padrão basal, nos segundos após a administração de PTZ, consistindo de oscilações caracterizadas por uma frequência de 7 a 10 Hz interposta por componentes de alta frequência (Figura 17), gerando um sinal de baixa amplitude ( $\pm 100 \mu\text{V}$ ) correspondente ao grau -1 (ritmo base normal) da escala para classificação de convulsões epileptiformes.

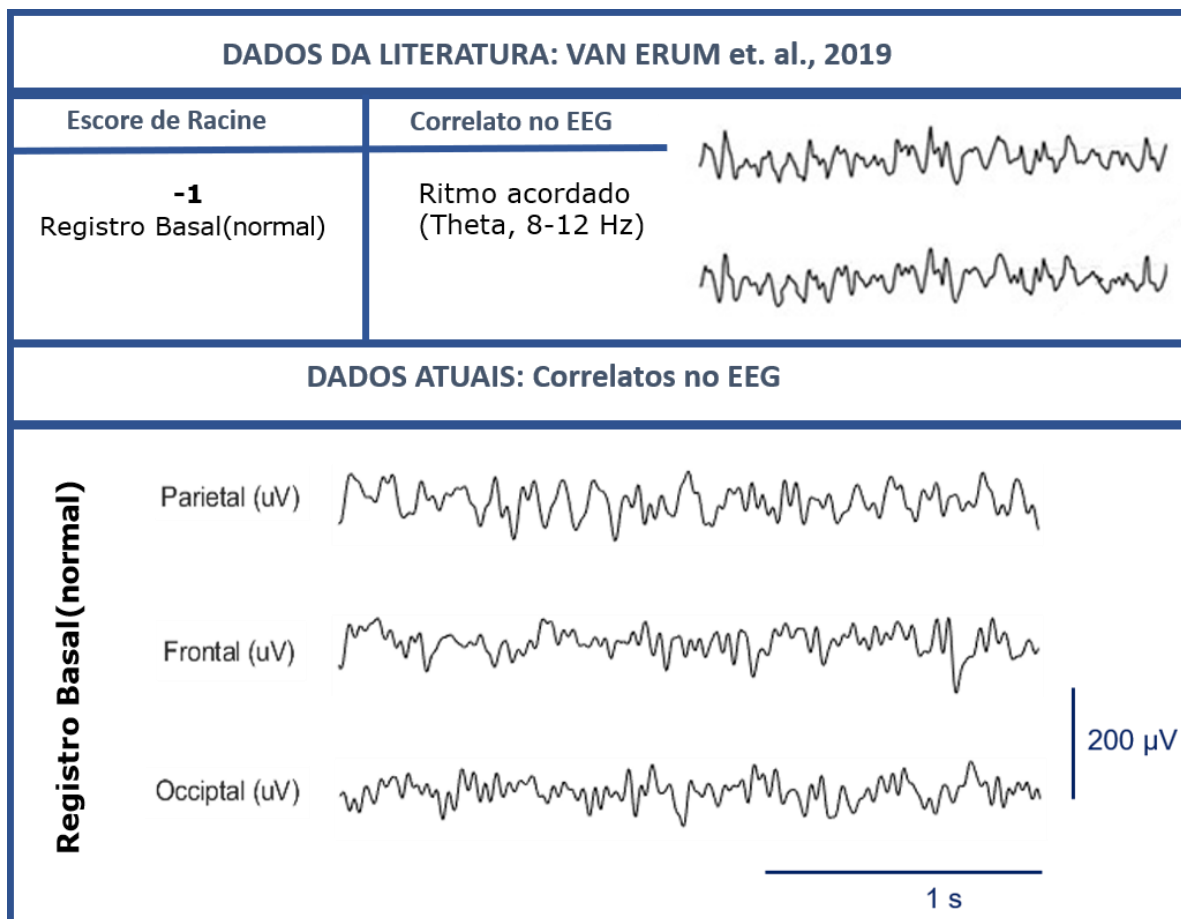


Figura 17. Comparação com a literatura de um exemplo de ritmo basal obtido no EEG, alguns segundos após a administração de PTZ. Repare na frequência de 7 a 10 oscilações por segundo em cada canal, sendo este o ritmo Theta comumente observado durante o comportamento de exploração em ratos. Na figura, o sinal de 7-10 Hz aparece mais intenso no eletrodo parietal, pois é o único eletrodo mais próximo ao hipocampo, que é o principal foco de origem desta atividade oscilatória, e também para as convulsões induzidas por PTZ

Como convulsões epileptiformes são resultantes de hiperexcitação neuronal sincronizada (Scharfman, 2007), os dados de EEG coletados nesse trabalho foram inspecionados em busca de padrões de descargas elétricas com expressivo aumento tanto em amplitude como em frequência e sincronizados em fase ou anti-fase no sinal dos três canais de registro (Frontal, Parietal e Occipital), como os evidenciados na Figura 16. Esses padrões indicam grandes diferenças de potencial elétrico entre populações neuronais disparando de forma síncrona, ou seja, são indicativos de padrões epileptiformes. Com a identificação desses padrões foi possível encontrar correlatos entre os dados de EEG coletados e os padrões descritos na escala de classificação de convulsões induzidas por PTZ, citada acima.

O primeiro grau de convulsões aqui classificado se deu pela substituição do padrão basal no EEG, após a injeção de PTZ e seu tempo de ação, por um padrão de

oscilações caracterizadas por maiores amplitudes (aproximadamente 170  $\mu\text{V}$ ) e desaceleração (definida por frequências de 6 a 7 Hz) do ritmo de disparos captados no EEG, evidenciando a clara redução dos componentes de alta frequência do sinal e a presença de picos de até 200  $\mu\text{V}$  de amplitude em todos os três canais de registro. Pelas características desse ritmo, o associamos aos graus de convulsões parciais de zero a dois da referida escala de classificação de convulsões (Figura 18).

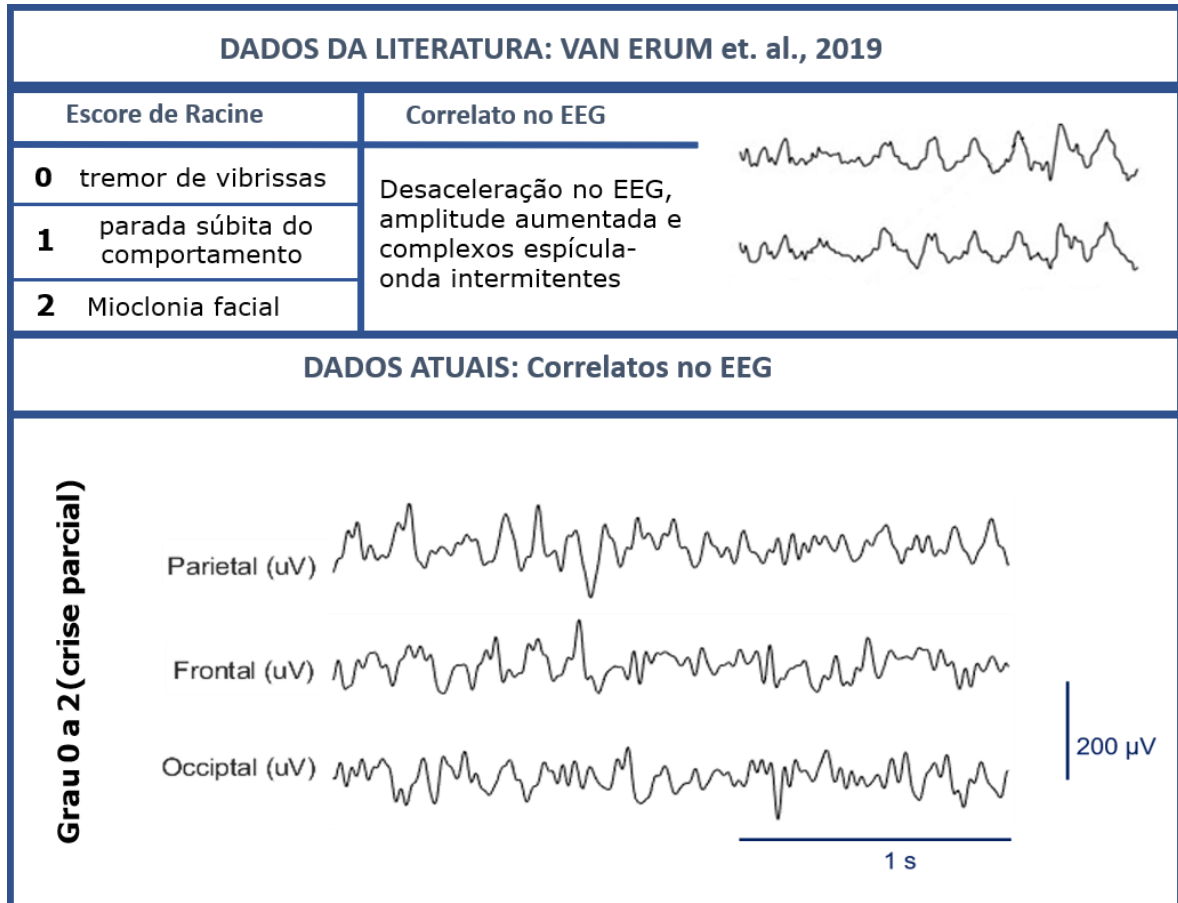


Figura 18. Comparação com a literatura de um registro exemplar obtido no EEG demonstrando o primeiro padrão elétrico associado a convulsões parciais (0 a 2). A extinção de componentes de alta frequência do sinal é evidenciada pela redução da quantidade de micro oscilações no sinal. Denota-se também a presença de picos espaçados de forma intermitente e com amplitude elevada.

As primeiras convulsões epileptiformes generalizadas foram indicadas por picos de expressivo aumento de amplitude no EEG, detectados por inspeção visual do sinal em janelas de tempo nas iminências anteriores aos períodos de convulsões máximas. Esses picos isolados, de morfologia aguda e estreita e com amplitudes entre 100 e 150  $\mu\text{V}$ , são acompanhados por sinal de baixa amplitude (50  $\mu\text{V}$ ) e maior frequência (de 10 a 12 Hz), associado à recidiva dos componentes de alta frequência do sinal (Figura 19). A esse tipo de disparo elétrico súbito e temporalmente localizado,

correlacionamos o grau três da escala de convulsões, que é associado a mioclonias generalizadas dos músculos da cabeça e pescoço.

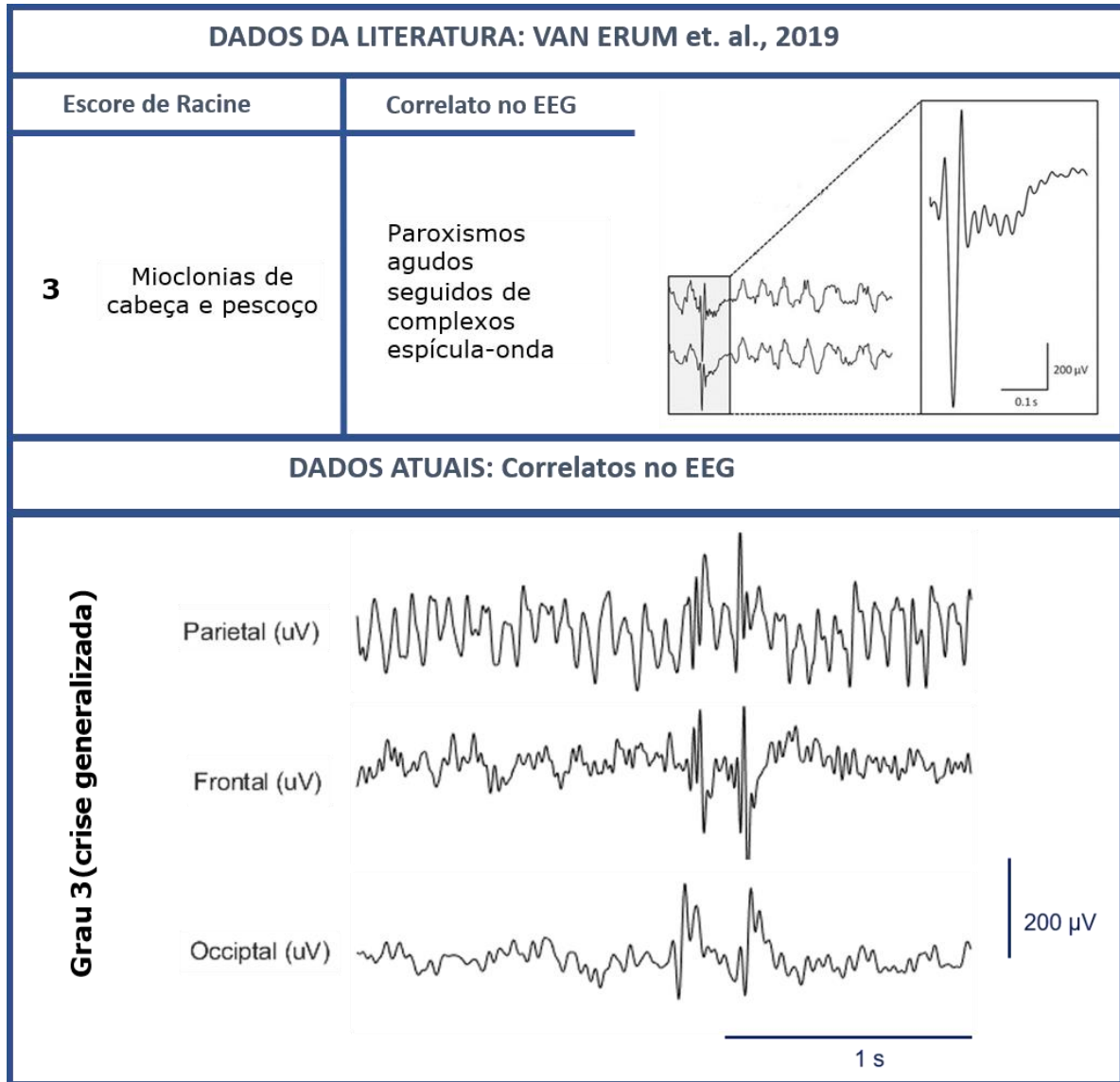


Figura 19. Comparação com a literatura de um exemplo de padrão elétrico de convulsões generalizadas do tipo mioclonias de cabeça (grau 3), demonstrando os picos de atividade elétrica correlacionados aos eventos de mioclonia.

As convulsões clônicas na posição sentada (grau 4), consistem em repetitivos e estereotipados movimentos musculares, que são expressos no EEG como oscilações de alta frequência e baixa amplitude, quase indistinguíveis do ritmo basal de exploração definido como grau -1 da escala de convulsões utilizada. Para esse padrão de atividade, foi observada a mesma frequência (ritmo Theta de 7 a 10 Hz) e amplitude ( $\pm 100 \mu\text{V}$ ) do ritmo basal. A inspeção mais detalhada desse tipo de sinal indica uma presença mais acentuada de frequências mais lentas, próximas a 7 Hz, e



a consequente redução de ritmos *Theta* (7 a 10 Hz) mais acelerados, que são possíveis de se observar no sinal basal associado ao ritmo de exploração normal do animal (Figura 17).

A identificação mais clara de um padrão epileptiforme generalizado no EEG é associado aos graus 5 e 6 da escala de convulsões. Isso ocorre, porque esse tipo de sinal é marcado por disparos de atividade elétrica de muito alta amplitude ( $\pm 500 \mu\text{V}$ ) e frequência (de 10 a 17 Hz), indicando a máxima diferença de potencial captado no EEG, decorrente das grandes descargas iônicas associadas a hiperexcitação neuronal paroxística, com consequente dissipação significativa de energia através do cérebro (Figura 20).

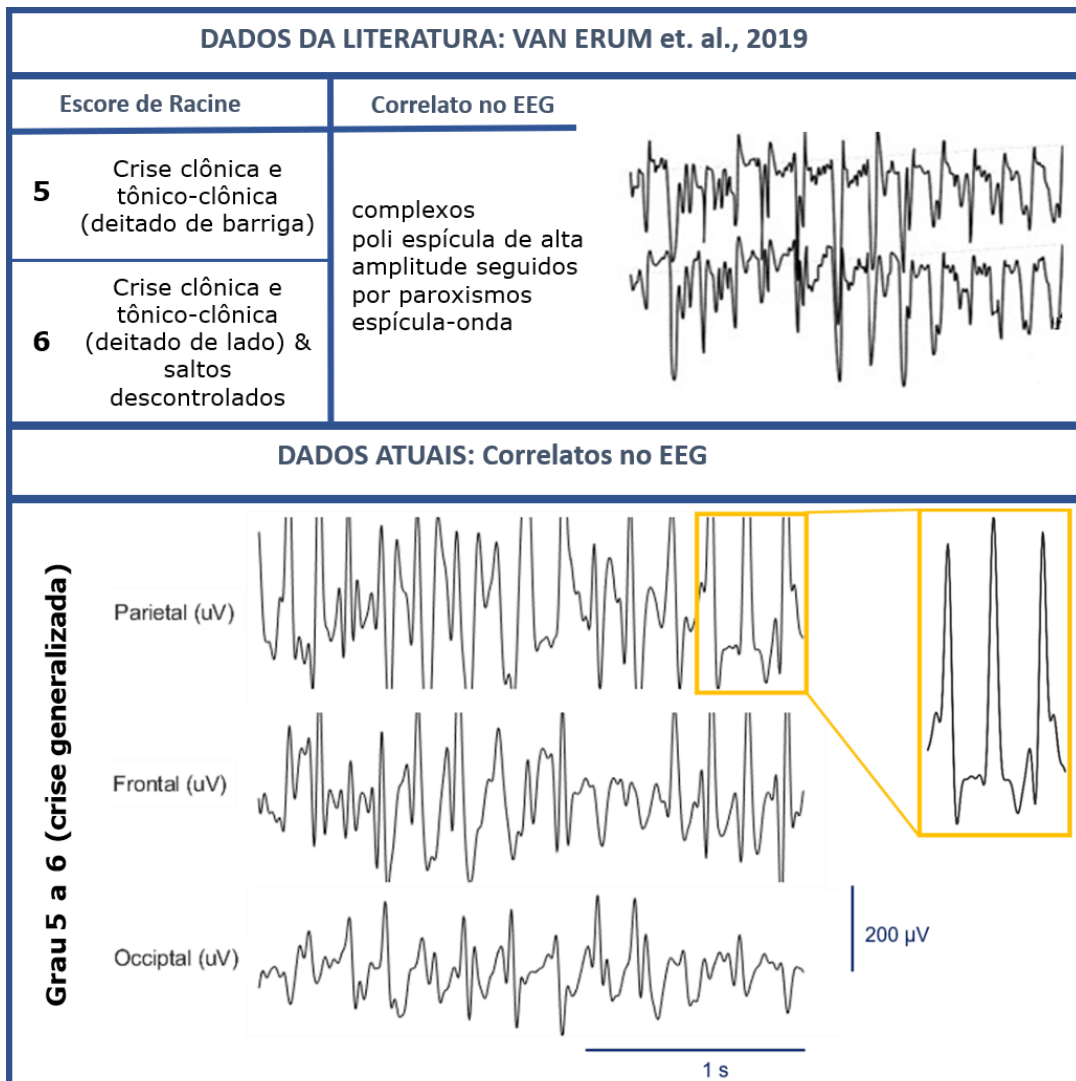


Figura 20. Comparação com a literatura de um registro de EEG exemplificando o padrão máximo de convulsões generalizadas observadas, associadas a convulsões tônico-clônicas, e consequente perda de controle postural do animal.

O último grau convulsivo relatado na escala utilizada (grau 7) foi observado apenas em um animal experimental, e foi marcado pela ocorrência de parada cardiorrespiratória com a aparente suspensão do sinal de EEG (Figura 21). Nesse padrão de sinal elétrico, ainda há alguma atividade elétrica, que gradualmente diminui caso o animal permaneça em parada cardiorrespiratória. Essa atividade é marcada por baixa frequência (4 a 5 Hz) e muito baixa amplitude ( $\pm 20 \mu\text{V}$ ). Curiosamente, nesse último padrão de atividade foi observada uma maior amplificação do sinal no eletrodo parietal, o que indica origem posterior da atividade elétrica remanescente, ao contrário do observado para os outros padrões de convulsões epileptiformes, mais amplificadas pelo eletrodo parietal.

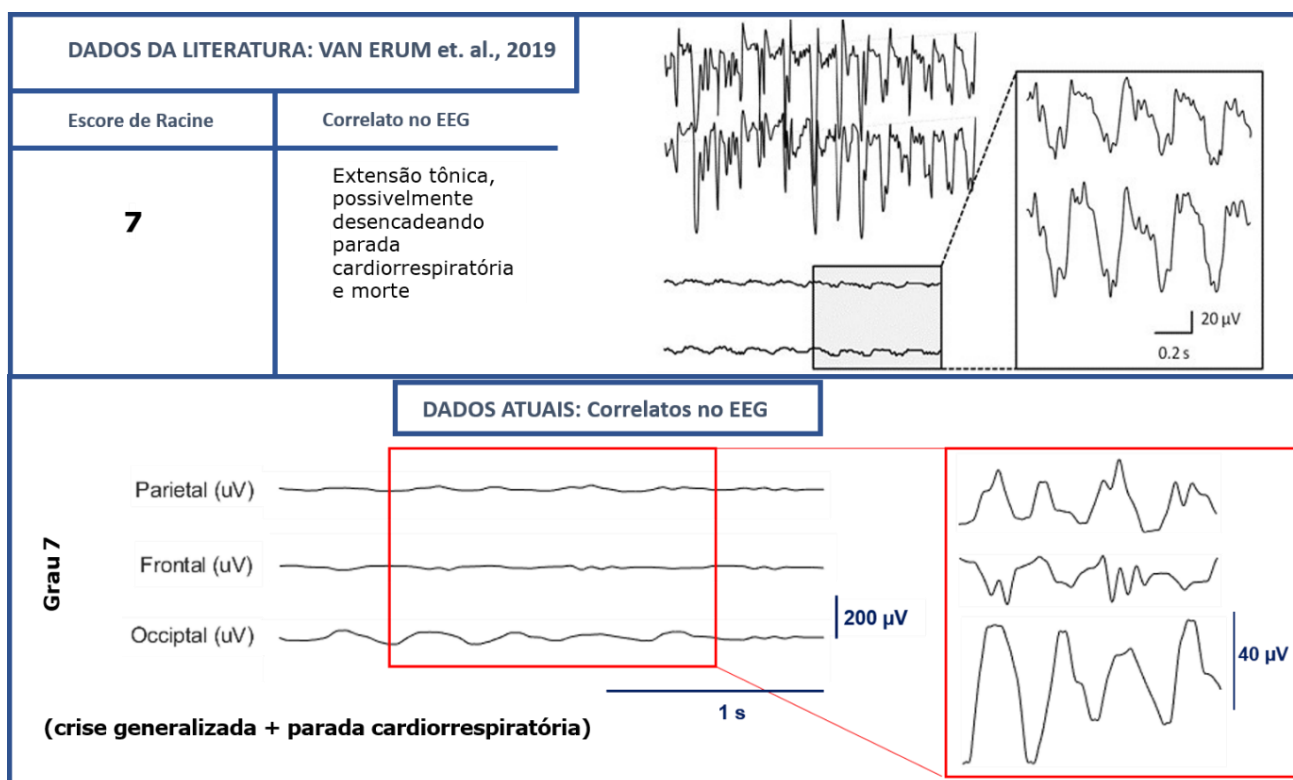


Figura 21. Comparação com a literatura mais atual, denotando o achado de um registro de EEG exemplar do correlato de parada cardiorrespiratória e extensão muscular tônica (grau 7 de crise epileptiforme), anteriormente apenas identificado em camundongos.

## 4 DISCUSSÃO

No presente trabalho, foi proposta e implementada, com sucesso, a metodologia para cirurgia, coleta e análise de dados de EEG que irá nortear as próximas pesquisas com modelos animais de epilepsia em roedores, a serem conduzidas no Laboratório de Neurociências e Comportamento da UnB. O desenvolvimento metodológico deste trabalho revolveu em torno da pergunta experimental dos efeitos eletroencefalográficos e comportamentais do jejum sobre crises epileptiformes induzidas por PTZ.

Apesar de não ter sido possível atribuir diferenças factíveis entre animais com alimentação livre e animais submetidos ao jejum nesse trabalho, esta dissertação apresenta toda a implementação de um *setup* experimental para padronizar a análise de dados de EEG em roedores na UnB, contando com a explícita replicação de resultados eletroencefalográficos relatados na literatura internacional.

As dificuldades apresentadas neste trabalho, quanto a replicação dos efeitos previamente observados do jejum sobre crises epileptiformes são consistentes com os problemas de replicabilidade relatados (p. ex., variações tanto nos modelos de indução de convulsões utilizados quanto na dosagem, tempo, rota e frequência de administração de fármacos) para estudos de modelos pré-clínicos de convulsões e epilepsia (Rosenberg et al., 2017).

Este trabalho apresenta um esforço de replicação e propostas para a obtenção de resultados mais consistentes do efeito do jejum sobre convulsões induzidas em um modelo de PTZ. A metodologia cirúrgica implementada nesse trabalho foi adaptada com sucesso a partir de estudos anteriores, conduzidos pelo Laboratório de Neurofarmacologia da UnB (de Castro e Silva et al., 2020; Lopes et al., 2021), para avaliação de peptídeos anticonvulsivantes.

Modificações realizadas para a metodologia cirúrgica deste trabalho incluíram a adoção de Acepromazina para potenciação do efeito analgésico (como relatado na seção de aspectos éticos desta dissertação), a solda dos fios de eletrodos durante a cirurgia, objetivando melhorar a condução elétrica do sinal neuronal, e a adição de algumas etapas metodológicas para aumentar a fixação do acrilato utilizado para selar

a incisão cirúrgica. Tais modificações foram importantes para a análise de dados de EEG que fomentou esse trabalho, e serão discutidas mais adiante.

A metodologia de aquisição de dados foi desenvolvida durante esse projeto para o uso do novo equipamento de EEG sem fio. Todos os testes recomendados pelo fabricante foram realizados pela autora, que foi responsável pela introdução da nova tecnologia no laboratório. O delineamento experimental da coleta de dados neuronais foi desenvolvido pensando na implementação da tecnologia *wireless*, e objetivando a comparação direta da atividade neuronal de um animal saudável após recuperação cirúrgica, com a atividade epileptiforme desse mesmo animal após a indução por PTZ, como realizado em estudo similar (Erdogan et al., 2019).

A necessidade pelo desenvolvimento de uma metodologia de aquisição de dados se apresentou em 2019, quando a metodologia *wireless* se tornou disponível na UnB, o que possibilitou um grande avanço em pesquisas com vídeo-EEG. Anteriormente, os conectores para EEG eram manualmente fabricados a partir de cabos telefônicos, levando a uma significativa introjeção de ruído nos dados de EEG. Além disso, era comum o relato de intercorrências devido ao rompimento de cabos e a conexão elétrica instável, com perda transitória do sinal registrado. A utilização de equipamento sem fio possibilita obter dados eletroencefalográficos de alta qualidade, com uma boa relação Sinal/Ruído (Maheshwari, 2020).

O uso da tecnologia *wireless* possibilitou replicar, fidedignamente, a literatura mais atual para dados de EEG obtidos em modelos de convulsões induzidas por PTZ em roedores (Van Erum et al., 2019). Dentre as principais similaridades desse trabalho com a literatura replicada (Van Erum et al., 2019), está a presença de um correlato de EEG para extensão muscular tônica. Este correlato no EEG é ausente na escala desenvolvida anteriormente para ratos (Lüttjohann et al., 2009), e foi tida como um padrão eletroencefalográfico exclusivamente visto em camundongos por Van Erum e colaboradores. Os dados experimentais aqui apresentados contrapõem essa ideia.

Interessantemente, os dados de EEG apresentados por Van Erum e colaboradores foram coletados em camundongos (espécie *Mus musculus*), enquanto os dados deste trabalho foram obtidos de ratos Wistar (linhagem albina da espécie *Rattus norvegicus*). Apesar de obtidos a partir de espécies distintas, os dados de EEG se mostraram surpreendentemente similares, o que leva a inferir que o posicionamento dos eletrodos de registro e o protocolo de indução de convulsões podem exercer um papel ainda mais relevante na classificação de crises

epileptiformes do que a própria espécie de roedor utilizada para o modelo animal, contrariando as expectativas iniciais para este projeto.

Algumas divergências dos resultados desse trabalho em relação a escala proposta para modelos de PTZ em ratos (Lüttjohann et al., 2009), podem ser explicadas pelo fato dessa escala ter sido delineada a partir de um paradigma experimental que contou com o aumento gradativo de dosagem de PTZ e com registro de EEG intra-cortical, já que a profundidade de implantação do eletrodo influencia diretamente as características eletrofisiológicas do sinal registrado (Nunez & Srinivasan, 2006), dificultando a identificação de correlatos eletrofisiológicos entre diferentes sinais registrados por metodologias distintas.

A vasta e crescente literatura no uso deste modelo animal de indução por PTZ, e os esforços para classificação e replicação de estudos com vídeo-EEG (Kadam et al., 2017), como o proposto por meio desta dissertação de mestrado, fazem com que o modelo de indução de convulsões por PTZ esteja tão bem caracterizado e descrito a ponto de viabilizar a investigação de fatores que modulam esse modelo, como, por exemplo, os efeitos do jejum sobre as convulsões induzidas (de Carvalho et al., 2016; Shafaroodi et al., 2004; Vilela et al., 2017, 2013).

De fato, dentre os modelos de convulsão aguda, o modelo de indução aguda por PTZ é um dos mais comumente utilizados. Esses modelos acarretam crises clônicas e convulsões tônico-clônicas generalizadas (Grone & Baraban, 2015; Löscher, 2017, 2011), e apresentam como vantagem o conhecimento prévio do mecanismo de ictogênese, apesar desse conhecimento, sozinho, não bastar para a inferência dos mecanismos subjacentes a crises epiléticas (Löscher, 1999). Em pequenas doses, o PTZ induz um modelo de crises de ausência, e em doses maiores, como a utilizada nesse trabalho, induz convulsões clônicas ou tônico-clônicas (Lüttjohann et al., 2009).

O registro de vídeo-EEG contou com duas câmeras, uma superior e uma lateral, objetivando viabilizar a análise dos padrões comportamentais de crises parciais. Como relatado na Seção de resultados desta dissertação, a câmera lateral não detectou crises de grau 0, 1 e 2 da escala de classificação de convulsões. Como o registro de EEG sugere fortemente atividade epileptiforme anterior aos comportamentos observados durante a análise comportamental deste trabalho, pode-se assumir que as crises epileptiformes parciais não foram observadas devido à baixa

resolução do registro de vídeo comportamental, que não captou as crises mais leves indicadas no EEG do animal.

Uma análise de vídeo mais acurada pode ser obtida tanto com o uso de uma câmera lateral com maior resolução, e que seja posicionada mais próximo ao animal (Lüttjohann et al., 2009), quanto com o uso de um microscópio óptico acoplado a uma câmera (Lazzarotto et al., 2021), permitindo a observação de seus movimentos orofaciais e de suas vibrissas. Além disso, é interessante viabilizar o treinamento de pesquisadores para análise comportamental de crises parciais, pois estas exigem um grau de detalhamento que não é requerido para a triagem de fármacos anticonvulsivantes. O vídeo oferecido como parte dos materiais suplementares do artigo de Van Erum e colaboradores é uma ferramenta relevante para o treinamento no reconhecimento dessas crises epileptiformes parciais (Van Erum et al., 2019).

A caracterização dos efeitos do jejum sobre convulsões, proposta neste trabalho, delimita uma via metabólica de interesse, guiando o estudo de possíveis receptores e circuitos neuronais associados à modulação de convulsões e outras crises epileptiformes. Entretanto, estudos recentes descritos na literatura apontam que receptores CB1 estão apenas parcialmente envolvidos na modulação de convulsões, o que impulsiona a caracterização de outros receptores possivelmente envolvidos nesse efeito. De fato, receptores CB1 e CB2 parecem interagir com diversas vias metabólicas no controle de convulsões, o que leva a resultados variáveis (Rosenberg et al., 2017).

Devido ao interesse desse estudo ser voltado a uma via de regulação metabólica específica para modulação de convulsões, foi importante priorizar o uso de animais com pouca variabilidade de peso corporal para evitar diferenças de regulação metabólica entre os ratos (Castonguay, 1991), prevenindo associações espúrias durante a avaliação dos efeitos do estresse fisiológico imposto pelo jejum nesses animais. Como a avaliação do possível mecanismo de modulação de convulsões pelo jejum dependeu do implante de cânulas para injeção i.c.v., e as coordenadas de implantação de cânulas descritas no Atlas de Paxinos e Watson (Paxinos et al., 2007) foram calculadas para ratos de  $290 \pm 20$  gramas, foram utilizados no presente estudo apenas animais com variação de peso entre 270 e 310 gramas.

A limitação imposta da faixa de peso dos animais ocasionou grande atraso na coleta de dados experimentais para este trabalho. Os animais apresentaram

inexplicável dificuldade para o alcance do peso mínimo para realização dos experimentos, considerando a taxa normal de ganho de peso para o regime alimentar sem restrições a que estavam submetidos (Whishaw and Kolb, 2005).

Uma possível explicação para o ocorrido pode ser atribuída a redução das atividades do Biotério do Instituto de Biologia (IB) da UnB durante o período de emergência sanitária implicado pela pandemia do vírus SARS-CoV-2. Outra explicação seria a ocorrência de uma possível alteração metabólica de origem genética (Whishaw and Kolb, 2005), desencadeada pelo repetido processo de reprodução consanguínea entre ratos para a obtenção e distribuição de animais da linhagem Wistar para o Biotério do IB-UnB.

A impossibilidade de realizar cirurgias por vários meses devido aos animais se encontrarem abaixo da linha de peso desejável levou a um N amostral inadequado para a comparação entre grupos amostrais em jejum e com alimentação livre. O tempo de jejum, estabelecido em 24h para esse trabalho, também pode ter influenciado na dificuldade em avaliar os efeitos do jejum sobre convulsões, já que o tempo de restrição alimentar pode ter sido insuficiente para estabelecimento de um estado de cetose em ratos, que parece ser melhor estabelecido após 48h (Hawkins et al., 1986).

O prolongado tempo em que os animais foram mantidos no biotério devido à dificuldade no ganho de peso levou à observação do aumento expressivo de longevidade dos implantes crônicos de cânula e eletrodos, resultantes da adição de duas etapas para aumentar a aderência do acrilato que fixa os implantes ao crânio do animal durante as cirurgias (ver apêndice A, tópicos 14 e 15). Em consequência dessa adaptação, nenhum dos animais utilizados nesta pesquisa sofreu a perda de seus implantes, mesmo em animais mantidos no biotério por mais de dois meses.

Implantes duradouros de eletrodos e cânula são importantes para o sucesso dos experimentos (Kadam et al., 2017), pois permitem a manipulação e uso seguro dos animais. Além disso, a longevidade dos implantes garante maior conforto do animal, pois estes ficam restritos à região óssea do crânio, sem que o acrilato atinja tecidos moles, como, por exemplo, a expressiva musculatura presente ao redor do crânio de roedores, o que pode ocasionar lesões teciduais e dor durante a movimentação orofacial dos animais mesmo após completa recuperação cirúrgica.

Outra importante modificação do protocolo cirúrgico consistiu na inclusão de analgesia pós-cirúrgica por meio da administração de Meloxicam, um Antiinflamatório Não Esteroidal (AINE) nos três primeiros dias de recuperação cirúrgica. AINEs

comumente utilizados em protocolos de analgesia pós cirúrgica em animais possuem ação inibitória sobre a sensstização central e periférica de neurônios (Lopez-Garcia & Laird, 1998; Purves et al., 2012). A redução da sensibilidade à dor por meio do bloqueio central de prostaglandinas inflamatórias denominadas ciclo-oxigenases (COX) mediado por AINEs também modula a atividade de endocanabinóides no cérebro, aumentando o efeito de antinocicepção e de supressão de GABA por canabinóides (Ahn et al., 2007; Kim & Alger, 2004).

Entretanto, optou-se pelo uso de AINEs neste estudo pois os modelos aqui realizados são de convulsões agudas, o que implica que o desenvolvimento de crises epileptiformes não está relacionado a processo inflamatório crônico neuronal ou à modulação prévia da excitabilidade neuronal, como ocorre em modelos crônicos de animais com crises epiléticas (Scharfman, 2007).

A inibição de mecanismos inflamatórios no pós-cirúrgico pode ser inclusive caracterizada, neste estudo, como uma forma de prevenção contra a indução de crises epiléticas por lesão ou aquecimento tecidual acidental durante a interferência cirúrgica (Kadam et al., 2017).

Ademais, o Meloxicam, apesar de possuir grande seletividade a COX-2, o que explica sua longa duração de efeito analgésico, também possui efeito transitório. Este AINE leva aproximadamente 20 h para sua metabolização e eliminação (Lopez-Garcia and Laird, 1998). Como a administração de Meloxicam é restrita aos três primeiros dias após interferência cirúrgica, sua metabolização seguramente antecede a realização de nossos bioensaios de convulsão.

Outro efeito metabólico considerado durante o delineamento do presente estudo foi a associação do jejum, em mamíferos, aos variados mecanismos de regulação hormonal e adrenal citados na Seção de “Curso e Repercussões da Epilepsia”. Essa associação faz ser passível de consideração a influência da variação hormonal do ciclo estral de animais fêmeas sobre os efeitos fisiológicos associados ao jejum. De fato, Morimoto e colaboradores demonstraram a influência dos hormônios sexuais Estradiol e Progesterona sobre o metabolismo da glicose e a produção de insulina, (que afetam diretamente a resposta metabólica ao jejum) em diferentes fases do ciclo estral de ratos Wistar fêmeas (Morimoto et al., 2001). O controle da atividade do eixo HPA por endocanabinóides também sofre influência do ciclo estral, como foi elucidado por Atkinson et al. utilizando o antagonista AM251



(Atkinson et al., 2010). Tais evidências justificam a priorização, no presente estudo, por ratos Wistar machos.

Uma consideração que não foi devidamente apreciada durante o delineamento deste estudo foi o impacto do posicionamento de eletrodos de registro e referência sobre as coletas de sinal de EEG. O esquema de referenciamento misto (unipolar e bipolar) aqui utilizado para a implantação dos eletrodos epidurais cranianos seguiu as recomendações do fabricante.

No entanto, o uso desse tipo de referenciamento torna os canais occipitais independentes do registro frontal e parietal, dificultando a visualização, no EEG, da sincronização temporal entre eventos de crise epileptiforme (Kadam et al., 2017). A proximidade da referência com o eletrodo de registro frontal também explica a redução da amplitude e da riqueza dos dados de potenciais advindos de origem parietooccipital no sinal apresentado na seção de resultados desse trabalho (Kadam et al., 2017).

Comparando com a literatura mais recente, o esquema utilizado para referenciamento e posicionamento de eletrodos desse trabalho difere da montagem tripolar com eletrodos de aterramento e de referência posicionados acima do cerebelo utilizada por Lüttjohann e colaboradores, em que os eletrodos de registro foram posicionados, em uma montagem concêntrica, dentro dos córtices frontal e occipital, no tálamo e no hipocampo dorsal (Lüttjohann et al., 2009).

Há ainda, uma divergência das duas montagens mencionadas para com o esquema de referenciamento e posicionamento de eletrodos adotado por Van Erum e colaboradores, em que foram utilizados eletrodos epidurais posicionados acima dos córtices frontal e parietal, e eletrodos de aterramento e de referência posicionados acima do cerebelo (Van Erum et al., 2019). A utilização de um eletrodo de referência unipolar para registro do córtex occipital do hemisfério oposto ao hemisfério de posicionamento do eletrodo de registro parietal, além de adoção do posicionamento do eletrodo de referência acima do cerebelo, poderia otimizar a comparação dos dados de EEG coletados com os correlatos apresentados na literatura (Van Erum et al., 2019; Lüttjohann et al., 2009).

Outras intercorrências não previstas durante a fase de delineamento desse estudo foram a dificuldade na administração de injeções intraperitoneais durante os ensaios de convulsão realizados, e os dois eventos de quebra dos pinos conectores que fazem parte do emissor *wireless* de EEG. Durante os ensaios de convulsões realizados, os animais se apresentavam excessivamente estressados, recusando o

manejo à qual haviam sido previamente habituados, apesar de aceitarem ser manejados em todas as etapas experimentais anteriores, viabilizando a correta administração, por via intraperitoneal, de anestésicos e analgésicos antes e depois de cada cirurgia.

Eventualmente, foi possível esclarecer que, somente durante os ensaios de convulsão os animais eram submetidos ao peso adicional imposto pelo emissor de EEG sobre o local sensibilizado pela incisão cirúrgica, o que levava os animais a sentir desconforto e experimentar altos níveis de estresse durante os ensaios. Assim, seguindo uma extensa bibliografia sobre modelos subcutâneos de indução de convulsões por PTZ, foi possível modificar de forma confiável o tipo de injeção usada nos experimentos aqui descritos (Löscher, 2017; Vilela et al., 2017; White et al., 1995).

A quebra de pinos do emissor *wireless* também exigiu adaptações durante os ensaios de convulsão. Os ratos, por serem animais mais robustos, se provaram capazes de remover o transmissor *wireless* com as patas traseiras, durante os eventos de *grooming*, e também de forçar a expulsão desse transmissor utilizando o próprio peso corporal como alavanca enquanto eram manipulados (Whishaw and Kolb, 2005).

A remoção forçada do transmissor, por duas vezes, levou à deformação de seus pinos conectores, desencadeando na última vez a quebra de dois pinos, o que exigiu o envio do transmissor para reparo, e a interrupção dos experimentos por dois meses. Após o ocorrido, foi necessário modificar, por tentativa e erro, a forma de manipulação dos animais. Talvez por situações similares, a utilização de camundongos seja, atualmente, mais comum em alguns paradigmas experimentais de EEG (Rensing et al., 2018), levando a inferência de que o uso de camundongos pode evitar futuras intercorrências com o transmissor *wireless*.

## 5 CONCLUSÃO

Este trabalho estabeleceu e apresentou a implementação da metodologia de cirurgia, coleta e análise de dados de EEG em roedores para novos experimentos da linha de pesquisa “Efeitos do jejum e de canabinóides endógenos sobre convulsões epileptiformes induzidas por PTZ” do Laboratório de Neurociências e Comportamento da UnB. Baseados nos achados eletroencefalográficos apresentados neste trabalho, consideramos que a metodologia apresentada é adequada para a avaliação de EEG dos efeitos de modulação de convulsões induzidas em roedores.

Para estudos similares a serem realizados no presente grupo de pesquisa, recomenda-se o uso de camundongos (*Mus musculus*) machos para a obtenção de modelos de indução aguda de convulsões, por administração única de uma dose de 70 mg/kg de PTZ por via subcutânea, durante as sessões de coleta de dados.

Como recomendação, é importante que se busque inicialmente replicar os efeitos do jejum sobre convulsões, e a reversão desses efeitos pelo bloqueio de receptores CB1, como observado em 2011, antes que se prossiga para a realização de novas análises eletroencefalográficas.

A exploração de novos parâmetros a partir do EEG registrado durante as duas etapas de registro basal do protocolo de ensaios de convulsão (Apêndice B) poderá ser realizada em oportunidades futuras, por meio dos dados já coletados. O registro desses períodos adicionais no presente trabalho apenas influenciou na duração da bateria de alimentação do sistema *wireless* para captação de EEG, que, a uma taxa de amostragem de 1024 Hz, apresentava uma duração média de 4 horas, necessitando ser trocada no início de cada dia de ensaio.

Outras análises exploratórias que podem ser realizadas a partir do sinal de EEG coletado, e que já foram iniciadas pela autora por meio de rotinas de programação no MATLAB, consistem na implementação de análises: 1) baseadas no estabelecimento de um limiar de amplitude para eventos epileptiformes por meio do método de estimação da raiz quadrática média do sinal (do inglês, *Root Mean Square* ou RMS); 2) janelamento do sinal e estimativa de envelopes de amplitude para diferentes regiões de interesse e 3) análise espectral do sinal utilizando o método de estimativa de densidade espectral de potência de Welch, focalizando em frequências Gama (25 – 140 Hz), associadas na literatura a modelos de epilepsia em roedores.

Para além do EEG, pode-se expandir o estudo da reversão dos efeitos do jejum por bloqueadores de CB1 para que se explore a relação de diferentes agonistas e antagonistas de receptores CB1 e CB2 nesses efeitos, investigando o balanço entre as vias glutamatérgicas e GABAérgicas de regulação da atividade neuronal na indução de convulsões em modelos agudos.

Por fim, a partir dos aprendizados obtidos com esse trabalho, deixamos essa dissertação com essa série de recomendações voltadas para pesquisas futuras, com a finalidade de contribuir para os esforços de replicação em pesquisas de modelos animais de convulsões e epilepsia. Embora não tenha sido observado efeito significativo do jejum em nenhuma das análises feitas e apresentadas nessa dissertação, os dados experimentais apresentados nesse trabalho explicitamente replicam a literatura mais atual na classificação de convulsões em um modelo de indução aguda por PTZ.

## REFERÊNCIAS

Acharya UR, Vinitha Sree S, Swapna G, Martis RJ, Suri JS. Automated EEG analysis of epilepsy: A review. *Knowledge-Based Syst* 2013;45:147–65. <https://doi.org/10.1016/j.knosys.2013.02.014>.

Ahima RS. Leptin and the Neuroendocrinology of Fasting. *Front Horm Res* 1999;26:42–56. <https://doi.org/10.1159/000061014>.

Ahn DK, Choi HS, Yeo SP, Woo YW, Lee MK, Yang GY, et al. Blockade of central cyclooxygenase (COX) pathways enhances the cannabinoid-induced antinociceptive effects on inflammatory temporomandibular joint (TMJ) nociception. *Pain* 2007;132:23–32. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2007.01.015>.

Ali A. Global Health: Epilepsy. *Semin Neurol* 2018;38:191–9. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1646947>.

Arras M, Autenried P, Rettich A, Spaeni D, Rüllicke T. Optimization of Intraperitoneal Injection Anesthesia in Mice: Drugs, Dosages, Adverse Effects, and Anesthesia Depth. *Comp Med* 2001;51:443–56.

Atkinson HC, Leggett JD, Wood SA, Castrique ES, Kershaw YM, Lightman SL. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis circadian rhythm by endocannabinoids is sexually diergic. *Endocrinology* 2010;151:3720–7. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0101>.

Bailey EE, Pfeifer HH, Thiele EA. The use of diet in the treatment of epilepsy. *Epilepsy Behav* 2005;6:4–8. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2004.10.006>.

Basavarajappa BS, Shivakumar M, Joshi V, Subbanna S. Endocannabinoid system in neurodegenerative disorders. *J Neurochem* 2017;142:624–48. <https://doi.org/10.1111/JNC.14098>.

Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. *Neurociências: Desvendando o Sistema Nervoso*. 4th ed. 2017.

Beghi E. The Epidemiology of Epilepsy. *Neuroepidemiology* 2020;54:185–91. <https://doi.org/10.1159/000503831>.

de Carvalho CR, Hoeller AA, Franco PLC, Martini APS, Soares FMS, Lin K, et al. The cannabinoid CB2 receptor-specific agonist AM1241 increases pentylentetrazole-induced seizure severity in Wistar rats. *Epilepsy Res* 2016;127:160–7. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2016.08.011>.

Castonguay TW. Glucocorticoids as modulators in the control of feeding. *Brain Res Bull* 1991;27:423–8. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(91\)90136-8](https://doi.org/10.1016/0361-9230(91)90136-8).

de Castro e Silva J, Lopes do Couto L, de Oliveira Amaral H, Maria Medeiros Gomes F, Avohay Alves Campos G, Paulino Silva L, et al. Neuropolybin: A new antiseizure peptide obtained from wasp venom. *Biochem Pharmacol* 2020;114:119. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114119>.

Cristino L, Bisogno T, Di Marzo V. Cannabinoids and the expanded endocannabinoid system in neurological disorders. *Nat Rev Neurol* 2019 16:161–169. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0284-z>.

Erdogan MA, Yusuf D, Erdogan A, Erbas O. Levodropropizine suppresses seizure activity in rats with pentylenetetrazol-induced epilepsy. *Epilepsy Res* 2019;150:32–7. <https://doi.org/10.1016/J.EPLEPSYRES.2018.12.011>.

Van Erum J, Van Dam D, De Deyn PP. PTZ-induced seizures in mice require a revised Racine scale. *Epilepsy Behav* 2019;95:51–5. <https://doi.org/10.1016/J.YEBEH.2019.02.029>.

Esplin DW, Woodbury DM. The fate and excretion of C14-labeled pentylenetetrazol in the rat, with comments on analytical methods for pentylenetetrazol. *J Pharmacol Exp Ther* 1956;118:129–38.

Fantezia Andraus C, Alves Borges M. Urban prevalence of epilepsy: a study of the population of São José do Rio Preto- Brazil. *Arq Neuropsiquiatr* 2002;60:1048–1048. <https://doi.org/10.1590/S0004-282X2002000600032>.

Fernandes PT, Noronha ALA, Sander JW, Li ML; NATIONAL EPILEPSY MOVEMENT IN BRAZIL. *Arq Neuropsiquiatr* 2007;65:55–7.

Fiest KM, Sauro KM, Wiebe S, Patten SB, Kwon CS, Dykeman J, et al. Prevalence and incidence of epilepsy: A systematic review and meta-analysis of international studies. *Neurology* 2017;88:296–303. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000003509>.

Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, et al. ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* 2014;55:475–82. <https://doi.org/10.1111/epi.12550>.

Fisher RS, Cross JH, French JA, Higurashi N, Hirsch E, Jansen FE, et al. Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia* 2017;58:522–30. <https://doi.org/10.1111/epi.13670>.

García-Belenguer S, Grasa L, Valero O, Palacio J, Luño I, Rosado B. Gut Microbiota in Canine Idiopathic Epilepsy: Effects of Disease and Treatment. *Anim an Open Access J from MDPI* 2021;11:3121. <https://doi.org/10.3390/ANI11113121>.

Grone BP, Baraban SC. Animal models in epilepsy research: legacies and new directions. *Nat Neurosci* 2015;18:339–43. <https://doi.org/10.1038/nn.3934>.

Guilhoto LM, Mosini AC, Susemihl MA, Figueira Pinto L. COVID-19 and epilepsy: How are people with epilepsy in Brazil? *Epilepsy Behav* 2021;122:108115.

Hajighahramani S, And Vesal N. EVALUATION OF SEVERAL DRUG COMBINATIONS FOR INTRAPERITONEAL ANAESTHESIA IN ADULT MALE RATS. *Iran J Vet Res* 2007;8:106–15. <https://doi.org/10.22099/ijvr.2007.1771>.

Hawkins RA, Mans AM, Davis DW. Regional ketone body utilization by rat brain in starvation and diabetes. <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.1986.250.2.E169>.

Jackson AF, Bolger DJ. The neurophysiological bases of EEG and EEG measurement: A review for the rest of us. *Psychophysiology* 2014:1061–1071. <https://doi.org/10.1111/psyp.12283>.

Kadam SD, D'Ambrosio R, Duveau V, Roucard C, Garcia-Cairasco N, Ikeda A, et al. Methodological standards and interpretation of video-electroencephalography in adult control rodents. A TASK1-WG1 report of the AES/ILAE Translational Task Force of the ILAE. *Epilepsia* 2017;58 Suppl 4:10–27. <https://doi.org/10.1111/EPI.13903>.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ. *Princípios de Neurociências*. 5. ed. Porto Alegre - RS: AMGH Ltda.; 2014.

Kandratavicius L, Alves Balista P, Lopes-Aguiar C, Ruggiero RN, Umeoka EH, Garcia-Cairasco N, et al. Animal models of epilepsy: Use and limitations. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2014;10:1693–705. <https://doi.org/10.2147/NDT.S50371>.

Kim J, Alger BE. Inhibition of cyclooxygenase-2 potentiates retrograde endocannabinoid effects in hippocampus. *Nat Neurosci* 2004;7:697–8. <https://doi.org/10.1038/nn1262>.

Landgrave-Gómez J, Mercado-Gómez OF, Vázquez-García M, Rodríguez-Molina V, Córdova-Dávalos L, Arriaga-Ávila V, et al. Anticonvulsant effect of time-restricted feeding in a pilocarpine-induced seizure model: Metabolic and epigenetic implications. *Front Cell Neurosci* 2016;10. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2016.00007/PDF>.

Lazzarotto G, Klippel Zanona Q, Cagliari Zenki K, Calcagnotto ME. Effect of

Memantine on Pentylentetrazol-induced Seizures and EEG Profile in Animal Model of Cortical Malformation. *Neuroscience* 2021;457:114–24. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2020.12.039>.

Li LM, Fernandes PT, De Boer HM, Prilipko L, Sander JW. Demonstration project on epilepsy in Brazil - WHO/ILAE/IBE global campaign against epilepsy: a foreword. *Arq Neuropsiquiatr* 2007;65:1–4. <https://doi.org/10.1590/S0004-282X2007001000001>.

Liu G, Xiao R, Xu L, Cai J. Minireview of Epilepsy Detection Techniques Based on Electroencephalogram Signals. *Front Syst Neurosci* 2021;15:44. <https://doi.org/10.3389/FNSYS.2021.685387/BIBTEX>.

Lopes KS, Quintanilha MVT, de Souza ACB, Zamudio-Zuñiga F, Possani LD, Mortari MR. Antiseizure potential of peptides from the venom of social wasp *Chartergellus communis* against chemically-induced seizures. *Toxicon* 2021;194:23–36. <https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2021.02.009>.

Lopez-Garcia JA, Laird JMA. Central antinociceptive effects of meloxicam on rat spinal cord in vitro. *Neuroreport* 1998;9:647–51. <https://doi.org/10.1097/00001756-199803090-00016>.

Löscher W. Animal Models of Seizures and Epilepsy: Past, Present, and Future Role for the Discovery of Antiseizure Drugs. *Neurochem Res* 2017;42:1873–88. <https://doi.org/10.1007/s11064-017-2222-z>.

Löscher W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure* 2011;20:359–68. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2011.01.003>.

Löscher W. Animal Models of Epilepsy and Epileptic Seizures 1999:19–62. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-60072-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-642-60072-2_2).

Lu HC, Mackie K. Review of the Endocannabinoid System. *Biol Psychiatry Cogn Neurosci Neuroimaging* 2021;6:607–15. <https://doi.org/10.1016/J.BPSC.2020.07.016>.

Luck SJ. An introduction to the event-related potential technique. 2nd editio. MIT Press; 2014.

Lüttjohann A, Fabene PF, van Luijtelaaar G. A revised Racine's scale for PTZ-induced seizures in rats. *Physiol Behav* 2009;98:579–86. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.09.005>.

Maheshwari A. Rodent EEG: Expanding the Spectrum of Analysis: <https://doi.org/10.1177/1535759720921377> 2020;20:149–53.



<https://doi.org/10.1177/1535759720921377>.

Malcher-Lopes R. Endocannabinoid-mediated, hormonal control of neuroendocrine axis. 1st ed. LAP Lambert Academic Publishing; 2010.

Malcher-Lopes R, Di S, Marcheselli VS, Weng FJ, Stuart CT, Bazan NG, et al. Opposing crosstalk between leptin and glucocorticoids rapidly modulates synaptic excitation via endocannabinoid release. *J Neurosci* 2006;26:6643–50. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5126-05.2006>.

Meyer AC, Dua T, Ma J, Saxena S, Birbeck G. Global disparities in the epilepsy treatment gap: a systematic review. *Bull World Health Organ* 2010;88:260–6. <https://doi.org/10.2471/BLT.09.064147>.

Mitra P, Bokil H. Observed brain dynamics. Illustrate. New York, New York: Oxford University Press; 2008.

Morimoto S, Cerbón MA, Alvarez-Alvarez A, Romero-Navarro G, Díaz-Sánchez V. Insulin gene expression pattern in rat pancreas during the estrous cycle. *Life Sci* 2001;68:2979–85. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(01\)01100-6](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(01)01100-6).

Noronha ALA, Borges MA, Marques LHN, Zanetta DMT, Fernandes PT, De Boer H, et al. Prevalence and Pattern of Epilepsy Treatment in Different Socioeconomic Classes in Brazil. *Epilepsia* 2007;48:880–5. <https://doi.org/10.1111/J.1528-1167.2006.00974.X>.

Nunez PL, Srinivasan R. Electric Fields of the Brain. 2nd ed. New York (NY): Oxford University Press, Inc.; 2006.

Patel P, Moshé SL. The evolution of the concepts of seizures and epilepsy: What's in a name? *Epilepsia Open* 2020;5:22. <https://doi.org/10.1002/EPI4.12375>.

Paxinos G, Watson C, Halliday G, Koutcherov Y, Hongquin W. Atlas of the Developing Mouse Brain. 2007.

Perucca E. Cannabinoids in the Treatment of Epilepsy: Hard Evidence at Last? *J Epilepsy Res* 2017;7:61–76. <https://doi.org/10.14581/JER.17012>.

Phillips MCL. Fasting as a therapy in neurological disease. *Nutrients* 2019;11. <https://doi.org/10.3390/NU11102501>.

Purves D, Augustine G, Fitzpatrick D, Hall W, LaMantia A, White L. Neuroscience. 5th ed. Sunderland - MA: Sinauer Associates, Inc; 2012.

Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1972;32:281–94. [https://doi.org/10.1016/0013-4694\(72\)90177-0](https://doi.org/10.1016/0013-4694(72)90177-0).

Rang HP, Ritter JM, Flower RG, Henderson G. Rang and Dale's Pharmacology. 8th ed. London - UK: Elsevier Ltd; 2016.

Reddy DS. The Utility of Cannabidiol in the Treatment of Refractory Epilepsy. *Clin Pharmacol Ther* 2017;101:182–4. <https://doi.org/10.1002/cpt.441>.

Rensing N, Moy B, Friedman JL, Galindo R, Wong M. Longitudinal analysis of developmental changes in electroencephalography patterns and sleep-wake states of the neonatal mouse. *PLoS One* 2018;13:e0207031. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0207031>.

Rosenberg EC, Patra PH, Whalley BJ. Therapeutic effects of cannabinoids in animal models of seizures, epilepsy, epileptogenesis, and epilepsy-related neuroprotection. *Epilepsy Behav* 2017;70:319. <https://doi.org/10.1016/J.YEBEH.2016.11.006>.

Scharfman HE. The neurobiology of epilepsy. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2007;7:348–54. <https://doi.org/10.1007/s11910-007-0053-z>.

Scheffer IE, Berkovic S, Capovilla G, Connolly MB, French J, Guilhoto L, et al. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia* 2017;58:512–21. <https://doi.org/10.1111/epi.13709>.

Schröder H, Becker A, Lössner B. Glutamate Binding to Brain Membranes Is Increased in Pentylentetrazole-Kindled Rats. *J Neurochem* 1993;60:1007–11. <https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.1993.TB03248.X>.

Shafaroodi H, Samini M, Moezi L, Homayoun H, Sadeghipour H, Tavakoli S, et al. The interaction of cannabinoids and opioids on pentylentetrazole-induced seizure threshold in mice. *Neuropharmacology* 2004;47:390–400. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2004.04.011>.

Da Silva LF, Pereira P, Elisabetsky E. A neuropharmacological analysis of PTZ-induced kindling in mice. *Gen Pharmacol* 1998;31:47–50. [https://doi.org/10.1016/S0306-3623\(97\)00423-0](https://doi.org/10.1016/S0306-3623(97)00423-0).

Thijs RD, Surges R, O'Brien TJ, Sander JW. Epilepsy in adults. *Lancet* 2019;393:689–701. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32596-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32596-0).

Verrotti A, Iapadre G, Di Francesco L, Zagaroli L, Farello G. Diet in the Treatment of Epilepsy: What We Know So Far. *Nutrients* 2020;12:1–19. <https://doi.org/10.3390/NU12092645>.

Vilela LR, Lima I V., Kunsch ÉB, Pinto HPP, de Miranda AS, Vieira ÉLM, et al.

Anticonvulsant effect of cannabidiol in the pentylenetetrazole model: Pharmacological mechanisms, electroencephalographic profile, and brain cytokine levels. *Epilepsy Behav* 2017;75:29–35. <https://doi.org/10.1016/J.YEBEH.2017.07.014>.

Vilela LR, Medeiros DC, Rezende GHS, de Oliveira ACP, Moraes MFD, Moreira FA. Effects of cannabinoids and endocannabinoid hydrolysis inhibition on pentylenetetrazole-induced seizure and electroencephalographic activity in rats. *Epilepsy Res* 2013;104:195–202. <https://doi.org/10.1016/J.EPLEPSYRES.2012.11.006>.

Whishaw IQ, Kolb B. *The behavior of the laboratory rat: a handbook with tests*. 1st ed. New York, NY: Oxford University Press; 2005.

White HS, Johnson M, Wolf HH, Kupferberg HJ. The early identification of anticonvulsant activity: role of the maximal electroshock and subcutaneous pentylenetetrazol seizure models. *Ital J Neurol Sci* 1995 161 1995;16:73–7. <https://doi.org/10.1007/BF02229077>.

Yacubian, Elza Márcia Targas. Kochen S. *Crises epiléticas*. São Paulo: Leitura Médica Ltda; 2014.

Younus I, Reddy DS. A resurging boom in new drugs for epilepsy and brain disorders. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2018;11:27–45. <https://doi.org/10.1080/17512433.2018.1386553>.

## APÊNDICE A – PROTOCOLO CIRÚRGICO

### 1. Procedimentos pré-cirúrgicos:

- a. Confeccionar 2 cânulas de 10mm, a partir de agulhas, para implantação;
- b. Soldar os pinos do conector de EEG a fios de prata curtos, já polidos com palha de aço para facilitar a solda dos fios durante a cirurgia;
- c. Polir os fios dos parafusos (eletrodos) utilizando uma palha de aço;
- d. Esterilizar os instrumentos cirúrgicos (Alicate, 2 pinças (bico-de-rato e de relojoeiro), 2 tesouras, bisturi, lâmina, 2 cânulas, 2 pontas para a furadeira, mandril e parafusos cirúrgicos);
  - Preparar os equipamentos auxiliares: furadeira, chave de fenda, lupa, multímetro, água oxigenada, iodopovidona, ácido fosfórico, ferro de solda, fio de estanho, lubrificante ocular, agulha da lidocaína, palitos e cotonetes;
- e. Aquecer a bolsa térmica no banho-maria;
- f. Borrifar mesa cirúrgica, cadeira, bancada, lupa e aparelho estereotáxico com álcool 70% e limpar com papel absorvente;
- g. Pesar o animal e preparar as doses de anestesia injetável (sistêmica).

### 2. Procedimento de anestesia sistêmica:

- a. Injetar Cloridrato de Cetamina i.p. na dose de 100 mg/kg + Cloridrato de Xilazina i.p. na dose de 8,0 mg/kg (pipetar a mistura em eppendorf);
- b. Injetar Acepromazina i.p. na dose de 2.5 mg/kg;
- c. Doses adicionais de Cloridrato de Cetamina de 50 mg/kg serão administradas a cada duas horas, ou caso o animal apresente sinais de superficialização da anestesia.

3. Posicionar o animal no aparelho estereotáxico (barras auriculares a +- 1.5cm).
4. Tricotomizar o animal, removendo os pelos soltos.
5. Realizar assepsia do animal, esfregando um cotonete embebido em Polvidine na cabeça, pescoço e orelhas do animal.
6. Aplicar gel lubrificante à base de água nos olhos do animal para proteção contra ressecamento.

7. Realizar assepsia pessoal, lavando bem as mãos com sabonete líquido antisséptico.
8. Paramentar-se para a cirurgia com um jaleco limpo, luvas de procedimento, e máscara.
12. Aplicar a injeção de Lidocaína (anestésico local), aproximadamente 1 mL para formação de edema.
13. Trocar a tesoura e, com auxílio de pinça, realizar a incisão no local do edema, removendo o tecido muscular, conjuntivo e meninge.
14. Utilizar a lâmina estéril do bisturi para raspar todo o material subcutâneo que recobre o topo do crânio.
15. Limpar a região exposta com cotonetes embebidos de peróxido de hidrogênio (repetir essa etapa o quanto for necessário para limpeza do topo do crânio).
16. Verificar e porventura corrigir posicionamento horizontal da cabeça através dos valores da ordenada dorsoventral entre bregma e Lambda (diferença máxima de 0,2 mm).
17. Posicionar a cânula no estereotáxico.
18. Marcar coordenadas estereotáxicas para os pontos de introdução da cânula e eletrodos no crânio utilizando uma caneta com ponta de 1 mm.
19. Conferir se os braços do estereotáxico estão firmes e se o animal está seguro.
20. Obturar o local de inserção para a cânula.
21. Trocar a ponta da furadeira por uma de diâmetro ligeiramente menor que o diâmetro dos parafusos para uma melhor fixação.
22. Obturar locais de inserção para os parafusos.
23. Posicionar uma nova cânula, estéril, no estereotáxico. Conferir, antes, se há oclusão da abertura da cânula com o mandril.
24. Posicionar a cânula, sem inserir, no topo do osso parietal e marcar a coordenada de referência dorsoventral. Descer até a coordenada de posicionamento do Ventrículo Lateral direito, devagar para evitar lesão intracerebral.
25. Cobrir a base da cânula com polímero de acrilato, evitando as obturações realizadas para os eletrodos. Esperar secar.
26. Utilizando uma pinça, enrolar os fios de prata dos eletrodos ao redor de seus respectivos parafusos, com delicadeza, pois o processo deve ser facilmente reversível.

27. Soltar a cânula do estereotáxico. Cobrir a abertura da cânula com o mandril para proteção do local.
28. Apertar todos os parafusos usando chave de fenda esterilizada, inserir os parafusos até  $\frac{3}{4}$  de seu comprimento, para garantir o contato desses com o líquido.
29. Cobrir a base dos parafusos com uma camada inicial de polímero de acrilato. Evitar todos os tecidos laterais, manter apenas sobre o osso do crânio.
30. Desenrolar o fio de prata de cada parafuso e uni-lo ao respectivo fio do conector. Utilizar um palito para polir os fios com ácido fosfórico e aplicar um leve pingo de solda para manter os fios unidos, evitando que o calor advindo do processo atinja o cérebro. Cortar o excedente com alicate.
31. Ajustar a posição dos fios e do conector para que seja possível recobri-los com o acrilato e para que seu posicionamento gere o mínimo de desconforto ao animal.
32. Garantir que os fios de diferentes eletrodos não estejam em contato elétrico utilizando um multímetro.
33. Recobrir todo o crânio exposto, os parafusos e todos os fios utilizando acrílico auto-polimerizante. Manter a superfície do acrilato lisa e redonda para evitar lesões ao animal. Deixar exposta a superfície da cânula e do conector.
34. Com o acrilato do capacete já polimerizado, prender levemente o mandril com mais um pingo de acrilato, para fácil remoção posterior.
35. Limpar toda a área ao redor do capacete utilizando solução salina, Polvidine e Sulfato de Neomicina.
36. Esperar o animal despertar e devolvê-lo ao biotério.
37. Acompanhar a recuperação e o ganho de peso do animal ao longo de toda a semana após o procedimento cirúrgico.

## APÊNDICE B – PROTOCOLO DE ENSAIOS PARA INDUÇÃO AGUDA DE CONVULSÕES

### Procedimentos pré-ensaio:

1. Verificar se há 3 cânulas de 10.2 mm (agulha gengival) na caixa cirúrgica. Se não, confeccionar novas.
2. Lavar o fio de “ouro” com água mili-Q
  - a. Utilizar becker de vidro e seringa de 1 mL para água mili-Q
  - b. Cobrir a mesa com papel toalha e testar o fluxo de água pelo fio
3. Preparar a sala de ensaios. Checar a bateria do equipamento, cobri-la com a capa de proteção e conferir a conexão do EEG
4. Diluir o PTZ e o AM251 (em caso de ensaio do grupo experimental)
  - a. Fazer a regra de proporcionalidade de acordo com o peso do animal (70mg/1.000g)
  - b. Utilizar uma balança de precisão → *Desligar o ar e fechar a porta*
  - c. Fazer regra de proporcionalidade para determinar a quantidade de salina a ser adicionada no tubo Falcon
  - d. Utilizar o vórtex para solubilizar bem o PTZ na salina
  - e. Utilizar a pipeta e transferir o PTZ solubilizado para um eppendorf
  - f. Reservar na geladeira até o momento de utilizar
5. Pesar o animal no biotério e trazê-lo à sala de ensaios para aclimatização ao ambiente.

### Procedimento de registro basal:

6. Segurar o animal como habituado e gentilmente acoplar o conector ao capacete
  - a. Sempre manter um dedo segurando o capacete no lugar
7. Colocar o animal na arena
8. Iniciar novo experimento no Sirenia, com nome “basal” e filmar por 30min
9. Durante a filmagem:
10. Completar o fio de “ouro” com água mili-Q. Segurando a ponta, encaixar na agulha Hamilton
  - a. Puxar 1µl de ar + 3 µl de salina / AM251 diluído na salina

11. Terminar o experimento basal, buscar o animal na arena e gentilmente retirar o conector, segurando o capacete

Procedimento de injeção intracerebroventricular:

12. Trazer o animal para injeção i.c.v.
13. Verificar se a cânula implantada no animal está obstruída (se necessário, utilizar a cânula de agulha gengival reserva)
14. Inserir a cânula gengival na implantada e iniciar a injeção i.c.v.
15. Aguardar 30min para efeito do AM251, nesse tempo preparar a injeção de PTZ e, se der tempo, guardar os aparatos da injeção i.c.v.

Procedimento de registro experimental:

16. Remover o conector do animal segurando o capacete no lugar (por segurança) e aplicar a injeção i.p. de PTZ
17. No momento da injeção de PTZ sinalizar, durante o registro de vídeo, o momento exato de injeção. Garantir que a sinalização permita sincronização temporal entre todos os registros de vídeo.
18. Colocar o conector novamente, e devolver o animal para a arena de filmagem assim que possível
19. Iniciar novo experimento no Sirenia com o nome "experimental" e gravar continuamente por 1h
  - a. Acompanhar em tempo real e registrar períodos de crise em papel
20. Preparar a injeção letal de Cetamina + Xilazina (3x a dose anestésica usada na cirurgia) → total +- 4 mL
21. Nunca deixar um animal em crise sozinho. Pedir para alguém ajudar com o preparo da injeção letal
22. Sempre anotar horários de início e fim das gravações.
23. Após o fim da gravação, imobilizar o animal ainda em crise e gentilmente retirar o conector, segurando o capacete no lugar.
24. Aplicar a injeção letal e colocar o animal em sua caixa
25. Proceder para a eutanásia
26. Realizar o backup dos dados registrados.



## APÊNDICE C – PROTOCOLO DE PERFUSÃO E EUTANÁSIA

1. Preparação para a eutanásia e perfusão:
  - a. Diluir formaldeído em solução salina tamponada (PBS), a uma concentração de 4%. Manter refrigerado até o momento da perfusão;
  - b. Aquecer 40 mL de PBS até temperatura fisiológica (aprox. 37°C);
  - c. Forrar a bancada a ser utilizada com papel limpo, posicionar a bandeja para perfusão e preparar todos os materiais a serem utilizados;
  - d. Realizar o cálculo de overdose anestésica, misturar o volume final em um eppendorf e preparar a injeção utilizando uma seringa de 1,5 mL;
2. Realizar a injeção de overdose anestésica com Cetamina + Xilazina por via intraperitoneal;
3. Conferir a ausência de reflexos motores nas patas do animal;
4. Fixar o animal;
5. Expor o coração do animal e, utilizando uma pinça homeostática, pinçar a artéria aorta e a veia cava, de forma a interromper o fluxo de sangue para os membros inferiores;
6. realizar uma pequena secção no átrio direito cardíaco;
7. Utilizando um scalp borboleta, perfundir de 20 mL a 40 mL de PBS através do ventrículo cardíaco esquerdo do animal. Manter a agulha no mesmo local durante o procedimento;
8. Repetir o passo anterior utilizando entre 20 mL e 40mL de formaldeído a 4%;
9. Remover a cabeça do corpo do animal eutanasiado e realizar a craniotomia para extração do cérebro;
10. Armazenar o cérebro na geladeira dentro de tubo Falcon identificado, cobrindo-o com formaldeído a 4%, por pelo menos 48h.

## ANEXO A - DOCUMENTO DE APROVAÇÃO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO ANIMAL (CEUA)



**Universidade de Brasília**  
Instituto de Ciências Biológicas  
Comitê de Ética no Uso Animal

Brasília, 07 de novembro de 2011.



**DECLARAÇÃO**

Declaramos que o projeto intitulado **"INFLUÊNCIA DE CANABINÓIDES ENDÓGENOS PRODUZIDOS DURANTE O JEJUM NA GÊNESE DE CONVULSÕES"**, UnBDOC n.º 44987/2011, sob responsabilidade da Profa. Márcia Renata Mortari, foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.



*Aline Pic-Taylor*  
Profa. Aline Pic-Taylor  
Coordenadora do CEUA