

Universidade de Brasília Faculdade de Medicina Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

Larissa Silva de Lima

Avaliação do peptídeo antiepiléptico Neurovespina nos processos neuroinflamatórios de um modelo animal de epilepsia do lobo temporal

> Brasília – DF 2025

Larissa Silva de Lima

Avaliação do peptídeo antiepiléptico Neurovespina nos processos neuroinflamatórios de um modelo animal de epilepsia do lobo temporal

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília como requisito para a obtenção do título de mestre em Patologia Molecular.

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Renata Mortari.

Larissa Silva de Lima

Avaliação do peptídeo antiepiléptico Neurovespina nos processos neuroinflamatórios de um modelo animal de epilepsia do lobo temporal

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília como requisito para a obtenção do título de mestre em Patologia Molecular.

Aprovado em 27/02/2025.

Banca Examinadora

Profa. Dra. Kelly Grace Magalhães - Universidade de Brasília

Prof. Dr. Mauro Schneider Oliveira – Universidade Federal de Santa Maria

Dra. Francisca Valéria Bezerra Sampaio Marques - Universidade de Aveiro

Dedicatória

Para a minha família. Para todas as pessoas com epilepsia.

Agradecimentos

A Deus, que me abençoa todos os dias com saúde, disposição e discernimento, que ilumina minha jornada, que guia minhas escolhas quando nem eu mesma sei qual caminho seguir, que elabora todos os momentos com perfeição, que me mostra sua presença diariamente.

À minha família, pelo apoio incondicional que recebi não apenas durante o mestrado, mas em toda a minha vida. Ao meu pai e à minha mãe, Fernando e Regiane, pela criação e educação inestimáveis, pelos dias em que me levavam na escola, pelos deveres de casa, pelas partidas de tênis, pelas risadas que trazem leveza à minha vida, pelas conversas difíceis e importantes, por todo o esforço que fizeram para que eu pudesse chegar até aqui, por me mostrarem sobre o que é a vida, por todo o amor. Ao meu irmão, Felipe, pela valiosa companhia diária, pelas piadas, por ouvir meus desabafos, pelas palavras de motivação, pela compreensão, por sempre estar comigo. Às minhas avós, Margarida e Cidinha *(in memoriam)*, que sempre me aconselharam sobre a vida e cuidaram de mim. Ao meu irmão, Rafael, pelas conversas e pelos ensinamentos tecnológicos. Ao meu noivo, Marcus, por me apoiar em todos os momentos, por não me deixar desistir, pelo amor, carinho e cuidado constantes, pelas alegrias cotidianas.

À minha orientadora, Profa. Dra. Márcia Mortari, pela atenção, dedicação, disponibilidade, paciência e orientação durante os quase seis anos em que tive a honra de fazer parte do Laboratório de Neurofarmacologia da Universidade de Brasília. Sou eternamente grata pelos ensinamentos, pelos artigos, pelos congressos, pelos encontros divertidos e, principalmente, por todas as oportunidades que eu nunca achei que teria. Muito obrigada!

A todos os integrantes do NeuropharmaLab, pelos bate-papos, pela ajuda e pelo companheirismo. Devo um agradecimento especial a Valéria, Danilo, Gabriel Avohay, Luana, Brenda, Rayanne, Letícia, Isabela Mota, Maria Clara, Gabriel Saraiva, Júlia, Isabela Tolentino e Adolfo, pelo auxílio na execução deste projeto. Agradeço também ao Prof. Dr. Fábio Caixeta, que me apresentou ao criostato e a algumas técnicas histológicas utilizadas no trabalho.

Aos funcionários do biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, pela manutenção dos animais e por todo o auxílio para a realização deste estudo.

Aos camundongos, com respeito e ética, pelas vidas que foram sacrificadas na execução desta pesquisa.

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem ler e avaliar o meu trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília, pela oportunidade de desenvolver um projeto de mestrado e pelo apoio financeiro.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Universidade de Brasília (UnB) pelo apoio financeiro.

Resumo

A epilepsia é uma doença neurológica crônica que afeta cerca de 50 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo caracterizada por uma maior suscetibilidade à ocorrência de crises epilépticas espontâneas e recorrentes. Nesse distúrbio, há uma diminuição no limiar epiléptico e, portanto, um desequilíbrio entre as neurotransmissões excitatórias e inibitórias. Também se estabelecem outras alterações fisiopatológicas, como degeneração neuronal, ativação de micróglias, astrogliose, prejuízos à integridade da barreira hematoencefálica e neuroinflamação. A porcentagem de pacientes com epilepsia que são refratários aos tratamentos farmacológicos atuais pode chegar até os 70% em alguns subtipos da doença, como a epilepsia do lobo temporal (ELT). Tendo isso em vista, pesquisadoras da Universidade de Brasília desenvolveram um peptídeo antiepiléptico e neuroprotetor, chamado de Neurovespina. O objetivo do presente projeto de pesquisa foi investigar a atividade do peptídeo Neurovespina nos processos neuroinflamatórios e neurodegenerativos da ELT. Para tanto, foi utilizado um modelo de ELT em roedores, além do emprego de técnicas de imunofluorescência. Camundongos Swiss machos foram submetidos à indução de status epilepticus por injeção de pilocarpina e tratados por sete dias com solução veículo, diazepam ou Neurovespina nas doses de 8, 4 ou 2,5 mg/kg. No nono dia de protocolo, os animais foram eutanasiados e iniciou-se o processamento histológico dos encéfalos, com etapas de fixação, crioproteção e congelamento para posterior seccionamento e marcação por imunofluorescência ou por coloração por Nissl fluorescente. Foram estudados diversos parâmetros associados à neuroinflamação no contexto da epilepsia refratária, como esclerose hipocampal, proliferação microglial, astrogliose reativa, expressão da citocina próinflamatória IL-1ß e expressão da proteína claudina-5. O presente estudo verificou que a Neurovespina exerce atividade neuroprotetora e anti-inflamatória, atenuando a morte de neurônios e processos neuroinflamatórios induzidos no modelo. Apesar de não ter demonstrado atividade na astrogliose reativa, o peptídeo reduziu a proliferação microglial a níveis observados em animais sadios, diminuiu consideravelmente a expressão de IL-1β e aumentou a expressão de claudina-5. Este estudo concluiu que a Neurovespina possui efeito neuroprotetor e anti-inflamatório, contribuindo para a compreensão de sua farmacologia e oferecendo perspectivas futuras para o estudo desse composto promissor para o tratamento da epilepsia.

Palavras-chave: epilepsia; neuroinflamação; Neurovespina; células da glia; barreira hematoencefálica; imunofluorescência.

Abstract

Epilepsy is a chronic neurological disorder that affects approximately 50 million people worldwide, being characterized by an increased susceptibility to spontaneous and recurrent epileptic seizures. In this condition, the epileptic threshold is reduced, which causes an imbalance between excitatory and inhibitory neurotransmissions. Other pathophysiological alterations are also established, such as neuronal degeneration, microglial activation, astrogliosis, blood-brain barrier impairment, and neuroinflammation. The percentage of epilepsy patients who are refractory to current pharmacological treatments can reach up to 70% in certain subtypes of the disease, such as temporal lobe epilepsy (TLE). In light of this, researchers at the University of Brasília developed an antiepileptic and neuroprotective peptide called Neurovespina. The objective of this research project was to investigate the effect of Neurovespina in neuroinflammatory and neurodegenerative processes of the pilocarpine model of TLE. Male Swiss mice were subjected to the induction of status epilepticus via pilocarpine injection and treated for seven days with vehicle solution, diazepam, or Neurovespin at doses of 8, 4, or 2,5 mg/kg. On day nine of the protocol, animals were euthanized, and the histological processing of the brains was initiated, including fixation, cryoprotection, and freezing steps for subsequent sectioning and labeling by immunofluorescence or fluorescent Nissl staining. Several parameters associated with neuroinflammation in the context of refractory epilepsy were studied, such as hippocampal sclerosis, microglial proliferation, reactive astrogliosis, expression of the pro-inflammatory cytokine IL-1 β , and expression of the claudin-5 protein. This study found that Neurovespina exhibits neuroprotective and anti-inflammatory activity, reversing neuron death induced in the model. Although it did not alter reactive astrogliosis, the peptide reduced microglial proliferation to levels observed in healthy animals, significantly decreased IL-1ß expression, and increased claudin-5 expression. This study verified that Neurovespina has neuroprotective and anti-inflammatory effects in the pilocarpine model of TLE, contributing to the understanding of its pharmacology and offering future perspectives for the study of this promising compound for epilepsy treatment.

Keywords: epilepsy; neuroinflammation; Neurovespin; glial cells; blood-brain barrier; immunofluorescence.

Lista de Figuras

| Figura I. Conectividade básica da formação hipocampal. No esquema, apresenta-se uma via |
|---|
| trissináptica que começa com a via perfurante, em que neurônios das camadas II e III do córtex |
| entorrinal se projetam para o giro denteado. Então, as fibras musgosas das células granulares |
| do giro denteado enviam projeções para as células piramidais de CA3 que, por sua vez, emitem |
| colaterais de Schaffer para CA1. Modificado de Neves; Cooke; Bliss (2008)26 |
| Figura 2. Fórmula estrutural do peptídeo Neurovespina |
| Figura 3. Representação esquemática dos nove dias de protocolo experimental, desde o insulto |
| inicial até a eutanásia dos animais. Figura elaborada no BioRender41 |
| Figura 4. Escala refinada de Racine. Modificado de Vigier e colaboradores (2021)42 |
| Figura 5. Representação esquemática das etapas de processamento histológico, desde a retirada |
| dos encéfalos até o armazenamento das secções encefálicas em solução anticongelante. Figura |
| elaborada no BioRender |
| Figura 6. Etapas da imunofluorescência indireta. Figura elaborada no BioRender46 |
| Figura 7. Espectro de fluorescência do Alexa Fluor™ 488 em conjunto com o filtro L5. Figura |
| elaborada na base de dados FPbase (Lambert, 2019)52 |
| |
| Figura 8. Espectro de fluorescencia do Neurotrace ^{1M} vermeino em conjunto com o filtro |
| Pigura 8. Espectro de fluorescencia do Neurotrace™ vermeino em conjunto com o filtroN2.1. Figura elaborada na base de dados FPbase (Lambert, 2019).52 |
| Figura 8. Espectro de fluorescencia do Neurotrace [™] vermeino em conjunto com o filtro 2.1. Figura elaborada na base de dados FPbase (Lambert, 2019) |
| Figura 8. Espectro de fluorescencia do Neurotrace [™] vermeino em conjunto com o filtro 2.1. Figura elaborada na base de dados FPbase (Lambert, 2019) |
| Figura 8. Espectro de fluorescencia do Neurotrace ^{1M} vermelho em conjunto com o filtro 2.1. Figura elaborada na base de dados FPbase (Lambert, 2019) |
| Figura 8. Espectro de fluorescencia do Neurotrace ^{IM} vermelho em conjunto com o filtro 2.1. Figura elaborada na base de dados FPbase (Lambert, 2019) |
| Figura 8. Espectro de fluorescencia do Neurotrace^{1M} vermelho em conjunto com o filtro 2.1. Figura elaborada na base de dados FPbase (Lambert, 2019) |
| Figura 8. Espectro de fluorescencia do Neurotrace ^{IM} vermelho em conjunto com o filtro 2.1. Figura elaborada na base de dados FPbase (Lambert, 2019) |
| Figura 8. Espectro de fluorescencia do Neurotrace^{1M} vermelho em conjunto com o filtro 2.1. Figura elaborada na base de dados FPbase (Lambert, 2019) |
| Figura 8. Espectro de fluorescencia do Neurotrace 1 M vermelho em conjunto com o filtro N 2.1. Figura elaborada na base de dados FPbase (Lambert, 2019). |
| Figura 8. Espectro de fluorescencia do Neurotrace IM vermeino em conjunto com o filtro N 2.1. Figura elaborada na base de dados FPbase (Lambert, 2019). |
| Figura 8. Espectro de fluorescencia do Neurotrace ^{1 M} vermelho em conjunto com o filtro N 2.1. Figura elaborada na base de dados FPbase (Lambert, 2019). |
| Figura 8. Espectro de fluorescencia do Neurotrace ^{1M} Vermeino em conjunto com o filtro — N 2.1. Figura elaborada na base de dados FPbase (Lambert, 2019) |
| Figura 8. Espectro de fluorescencia do Neurotrace ^{1,M} vermeino em conjunto com o filtro — N 2.1. Figura elaborada na base de dados FPbase (Lambert, 2019) |

Figura 15. Curva de sobrevivência dos camundongos submetidos ao modelo de epilepsia do lobo temporal induzido por pilocarpina neste projeto. Ressalta-se que o experimento foi finalizado no dia 9 do protocolo. O gráfico foi obtido através do método de Kaplan-Meier...61

Figura 18. Diferenças no número de células microgliais marcadas por imunofluorescência para Iba-1 entre os diferentes grupos de tratamento em toda a formação hipocampal (A), no giro denteado (B), em CA3 (C), em CA1 (D) e na camada molecular (E) (n = 4-7). Para todos os conjuntos de dados, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn, considerando-se significância estatística para p < 0,05. Os valores estão representados em mediana \pm IC 95%. #: diferença em relação ao grupo sadio; *: diferença em relação ao grupo epiléptico; @: diferença em relação ao grupo diazepam; &: diferença em relação ao grupo Neurovespina (2,5 mg/kg); %: diferença em relação ao grupo Neurovespina (4 mg/kg).......67

Figura 25. Imagens representativas de seções coronais hipocampais na região CA3 (CA3 3). Micróglias foram marcadas com imunofluorescência para Iba-1 (verde) e núcleos celulares

| foram marcados com DAPI (azul). As fotomicrografias foram obtidas com aumento total de |
|---|
| 400x e a linha de escala representa 10 µm74 |
| Figura 26. Imagens representativas de seções coronais hipocampais na região CA1 (CA1 1). |
| Micróglias foram marcadas com imunofluorescência para Iba-1 (verde) e núcleos celulares |
| foram marcados com DAPI (azul). As fotomicrografias foram obtidas com aumento total de |
| 400x e a linha de escala representa 10 µm75 |
| Figura 27. Imagens representativas de seções coronais hipocampais na região CA1 (CA1 2). |
| Micróglias foram marcadas com imunofluorescência para Iba-1 (verde) e núcleos celulares |
| foram marcados com DAPI (azul). As fotomicrografias foram obtidas com aumento total de |
| 400x e a linha de escala representa 10 µm76 |
| Figura 28. Imagens representativas de seções coronais hipocampais na região CA1 (CA1 3). |
| Micróglias foram marcadas com imunofluorescência para Iba-1 (verde) e núcleos celulares |
| foram marcados com DAPI (azul). As fotomicrografias foram obtidas com aumento total de |
| 400x e a linha de escala representa 10 µm77 |
| Figura 29. Imagens representativas de seções coronais hipocampais na região da camada |
| molecular (mol 1). Micróglias foram marcadas com imunofluorescência para Iba-1 (verde) e |
| núcleos celulares foram marcados com DAPI (azul). As fotomicrografias foram obtidas com |
| aumento total de 400x e a linha de escala representa 10 µm78 |
| Figura 30. Imagens representativas de seções coronais hipocampais na região da camada |
| molecular (mol 2). Micróglias foram marcadas com imunofluorescência para Iba-1 (verde) e |
| núcleos celulares foram marcados com DAPI (azul). As fotomicrografias foram obtidas com |
| aumento total de 400x e a linha de escala representa 10 µm79 |
| Figura 31. Diferenças de densidade óptica para imunofluorescência para GFAP entre os |
| diferentes grupos de tratamento em toda a formação hipocampal (A), no giro denteado (B), em |
| CA3 (C) e em CA1 (D) (n = 4-5). Para os gráficos A, B e D, foi realizado o teste de Kruskal- |
| Wallis, seguido do pós-teste de Dunn, considerando-se significância estatística para p < 0.05 . |
| Os valores estão representados em mediana \pm IC 95%. Para o gráfico C, foi realizada ANOVA |
| de uma via com pós-teste de Tukey, sendo também considerado p < 0,05. Os valores estão |
| representados em média ± erro padrão da média. *: diferença em relação ao grupo epiléptico; |
| @: diferença em relação ao grupo diazepam81 |
| |

Figura 32. Imagens representativas de seções coronais hipocampais na região do giro denteado. Astrócitos foram marcados com imunofluorescência para GFAP (verde), neurônios foram

Lista de Tabelas e Quadros

| Tabela 1. Grupos experimentais, intervenções e tratamentos realizados no projeto44 |
|---|
| Quadro 1. Diferenças entre protocolos de imunofluorescência para as marcações de Iba-1, |
| GFAP, IL-1β e claudina-547 |
| Tabela 2. Número de encéfalos obtidos em diferentes grupos experimentais e marcações |
| realizadas no projeto |
| Quadro 2. Número de óbitos nos diferentes dias de protocolo nas cinco rodadas experimentais |
| (R1, R2, R3, R4 e R5), excluindo-se mortes por eutanásia no dia 9 de cada experimento61 |
| Quadro 3. Número de ocorrências das diferentes pontuações dos escores de letargia e |
| agressividade63 |
| |

Sumário

| 1 Introdução | 16 |
|--|----|
| 1.1 Epilepsia | 16 |
| 1.2 Epilepsia do Lobo Temporal e Formação Hipocampal | 22 |
| 1.3 Neuroinflamação na Epilepsia do Lobo Temporal | 27 |
| 1.4 Peçonhas Animais como Fontes de Compostos Terapêuticos | |
| 1.5 Peptídeo Neurovespina | 34 |
| 2 Objetivos | |
| 2.1 Objetivo Geral | |
| 2.2 Objetivos Específicos | |
| 3 Metodologia | 40 |
| 3.1 Aspectos Éticos | 40 |
| 3.2 Animais Experimentais | 40 |
| 3.3 Modelo Animal de Epilepsia do Lobo Temporal Induzido por Pilocarpina | 40 |
| 3.4 Processamento Histológico dos Encéfalos | 45 |
| 3.5 Imunofluorescência | 46 |
| 3.5.1 Iba-1 | 47 |
| 3.5.2 GFAP e Coloração de Nissl | 49 |
| 3.5.3 IL-1β | 50 |
| 3.5.4 Claudina-5 | 50 |
| 3.6 Análises Microscópicas e Coleta de Dados | 51 |
| 3.6.1 Iba-1 | 53 |
| 3.6.2 GFAP e Coloração de Nissl | 54 |
| 3.6.3 IL-1β | 56 |
| 3.6.4 Claudina-5 | 57 |
| 3.7 Análises Estatísticas | 58 |

| 4 Resultados |
|---|
| 4.1 Modelo Animal de Epilepsia do Lobo Temporal Induzido por Pilocarpina60 |
| 4.2 Efeito da Neurovespina na proteção contra a morte de neurônios piramidais na formação |
| hipocampal64 |
| 4.3 Efeito da Neurovespina na proliferação microglial na formação hipocampal66 |
| 4.4 Efeito da Neurovespina na astrogliose reativa na formação hipocampal80 |
| 4.5 Efeito da Neurovespina na expressão da citocina IL-1β na formação hipocampal85 |
| 4.6 Efeito da Neurovespina na expressão da proteína claudina-5 na formação hipocampal 90 |
| 5 Discussão |
| 6 Conclusões106 |
| 7 Referências Bibliográficas107 |
| ANEXO A – Certificado da Comissão de Ética no Uso Animal133 |
| ANEXO B – Cadastro do Peptídeo Neurovespina no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio |
| Genético e do Conhecimento Tradicional Associado134 |

1 Introdução

1.1 Epilepsia

A epilepsia é uma doença neurológica crônica caracterizada por uma alta suscetibilidade à ocorrência de crises epilépticas espontâneas e recorrentes, as quais consistem em interrupções da função cerebral por atividade neuronal atípica, excessiva e simultânea (Organização Mundial da Saúde, 2019; Fisher *et al.*, 2014). Considera-se que a era contemporânea da medicina em epilepsia tenha começado com os estudos do neurologista britânico John Hughlings Jackson e seu grupo. O pai da epileptologia moderna definiu crises epilépticas como descargas ocasionais, excessivas e desordenadas do tecido nervoso sobre os músculos, capazes de alterar a consciência, as sensações e o comportamento (Jackson, 1970). Ele também atribuiu a causa da epilepsia a descargas locais súbitas, rápidas e excessivas na substância cinzenta do cérebro (Jackson, 1890).

No entanto, essa condição já era investigada há muito mais tempo. A epilepsia acompanha os humanos desde os primórdios de sua existência, tendo sido descrita pela primeira vez em um texto acadiano da região mesopotâmica (Temkin, 1945). No registro do ano 2.000 a.C., sintomas compatíveis com a doença foram diagnosticados como "a mão do pecado" (do acádio *antasubbû*), uma espécie de punição realizada pelo deus da lua em resposta à violação de leis religiosas e sociais (Labat, 1951). A epilepsia também foi retratada em vários outros textos antigos – egípcios, babilônicos, indianos e gregos – que geralmente atribuíam a doença a maus espíritos, possessões divinas ou punições (Magiorkinis *et al.*, 2010). Alguns textos gregos, por exemplo, se referiam à doença como *seliniasmos*, por ser uma condenação àqueles que ofendiam Selene, a deusa da lua. Outros escritos já colocavam a epilepsia como uma doença sagrada (Magiorkinis *et al.*, 2010).

2010), a pesquisa sobre essa doença veio evoluindo cada vez mais, trazendo a elucidação de mecanismos fisiopatológicos e o desenvolvimento de tratamentos direcionados.

Mesmo com todos os avanços, a epilepsia ainda se estabelece como um preocupante problema de saúde pública na atualidade. Cerca de 50 milhões de pessoas de diferentes sexos, idades e classes sociais são afetadas pela epilepsia em todo o mundo, estimando-se que, todo ano, sejam feitos 5 milhões de novos diagnósticos (Organização Mundial da Saúde, 2024; Thijs *et al.*, 2019). Estudos epidemiológicos sobre a população brasileira são escassos, desatualizados e específicos para determinadas regiões, dada a vastidão do território nacional. Entretanto, estima-se que, no Brasil, a prevalência da epilepsia seja de 380 a 430 casos a cada 100.000 habitantes (GBD 2016 Epilepsy Collaborators, 2019).

Além de enfrentar todas as adversidades neurobiológicas impostas pela doença, esses indivíduos também são impactados por um severo fardo psicológico, emocional e social. Em geral, eles enfrentam a propagação de concepções errôneas sobre a natureza da epilepsia, a utilização de terminologias inadequadas e o estabelecimento de tabus relacionados a esses pacientes (Kwon *et al.*, 2022). Pessoas com epilepsia sofrem *bullying*, experienciam exclusão social, perdem seus empregos e até mesmo sofrem ameaças por conta da condição (Kwon *et al.*, 2022). Até 1970, por exemplo, ainda estavam em vigência leis que proibiam o casamento para pessoas com epilepsia no Reino Unido (de Boer, 2010). Isso prejudica significativamente a qualidade de vida dessas pessoas e a percepção sobre si mesmas, contribuindo para sentimentos de baixa autoestima, vergonha e inferioridade ou até mesmo para um maior risco de comorbidades psiquiátricas, como depressão e ansiedade (Hopker *et al.*, 2017; Kwon *et al.*, 2022).

No contexto clínico, a epilepsia se estabelece quando pelo menos duas crises não provocadas ocorrem em um intervalo maior que 24 horas, quando se sucede uma crise não provocada com risco de recorrência maior que 60% nos próximos 10 anos ou quando há o diagnóstico de uma síndrome epiléptica (Fisher *et al.*, 2014). Antes dessa avaliação, contudo, é preciso que seja verificado se determinado evento paroxístico realmente se trata de uma crise epiléptica (Fisher *et al.*, 2017; Scheffer *et al.*, 2017). Diversas condições – como síncopes, ataques emocionais com hiperventilação e crises não epilépticas psicogênicas – podem mimetizar e ser confundidas com crises epilépticas (Brodtkorb, 2013).

O diagnóstico de tipos específicos de epilepsias é complexo e se baseia em uma classificação multinível, que categoriza (I) tipos de crises epilépticas, (II) tipos de epilepsias e

(III) tipos de síndromes epilépticas (Scheffer *et al.*, 2017). Sempre que possível, os três diferentes níveis de diagnóstico devem ser elucidados, em conjunto com a etiologia da epilepsia de um indivíduo (Scheffer *et al.*, 2017).

Crises epilépticas podem ser classificadas como de início focal, de início generalizado, focal para bilateral tônico-clônica, de início desconhecido ou não classificadas (Fisher et al., 2017). As crises focais se originam em redes neuronais limitadas a apenas um dos hemisférios, podendo se iniciar com ou sem prejuízo da consciência e com manifestações motoras ou não motoras (Berg et al., 2010; Fisher et al., 2017). Crises generalizadas se iniciam em redes neuronais distribuídas nos dois hemisférios, apresentando-se como motoras ou não motoras (Berg et al., 2010; Fisher et al., 2017). Uma crise focal para bilateral tônico-clônica corresponde àquela que possui um padrão de propagação bilateral, sendo uma classificação atualizada para as antigas crises focais com generalização secundária (Fisher et al., 2017). Crises de início desconhecido são um agrupamento temporário para eventos cujo início não foi observado ou não foi claro, mas podem ser posteriormente categorizadas de forma apropriada assim que houver um alto grau de confiança na precisão da classificação (Fisher et al., 2017). Caso seja impossível o diagnóstico, seja por falta de informações ou por aspectos não usuais, considerase a crise como não classificada (Fisher et al., 2017). Esse último critério é uma exceção e só deve ser utilizado quando houver certeza que um evento paroxístico é uma crise epiléptica, mas não possa ser categorizada (Fisher et al., 2017).

O segundo nível de diagnóstico consiste no tipo de epilepsia, identificado de forma clínica com suporte de exames de eletroencefalografia (Scheffer *et al.*, 2017). As epilepsias podem ser focais, com crises epilépticas de início focal; generalizadas, com crises epilépticas de início generalizado; generalizada e focal combinadas, quando há manifestações focais e generalizadas; ou desconhecidas, quando não há informação suficiente para a classificação (Scheffer *et al.*, 2017). Convém ressaltar que indivíduos com um tipo de epilepsia podem apresentar diversos tipos de crises epilépticas (Scheffer *et al.*, 2017).

A identificação de uma síndrome epiléptica é o último nível do diagnóstico. Em alguns casos, pacientes podem apresentar características clínicas que tendem a ocorrer em conjunto, como tipos de crises epilépticas e achados de eletroencefalografia e neuroimagem (Scheffer *et al.*, 2017). Mesmo que a *International League Against Epilepsy* (ILAE) nunca tenha elaborado uma classificação de síndromes epilépticas, alguns exemplos conhecidos são a síndrome de Dravet e a síndrome de Lennox-Gastaut – encefalopatias epilépticas intratáveis que geralmente se iniciam na infância (Scheffer *et al.*, 2017). Ressalta-se que a ILAE é a principal associação mundial de profissionais de saúde e cientistas que se dedicam ao estudo da epilepsia (International League Against Epilepsy, 2024). A missão dessa organização é disseminar recursos que favoreçam o entendimento, o diagnóstico e o tratamento da epilepsia – e a visão da ILAE é um mundo em que a vida de nenhuma pessoa seja limitada pela epilepsia (International League Against Epilepsy, 2024).

Além das diferentes classificações supracitadas, a ILAE ainda destaca a relevância de se identificar a etiologia da epilepsia de um paciente. Os seis grupos de possíveis causas relacionadas à epilepsia - estrutural, genética, infecciosa, metabólica, imune e desconhecida denotam o caráter multifatorial da doença e fornecem direcionamentos importantes para o tratamento (Scheffer et al., 2017). Epilepsias com etiologia estrutural estão associadas a anormalidades em exames de neuroimagem que indicam alterações na organização cerebral, sendo exemplos acidentes vasculares encefálicos, traumas, infecções e malformações (Scheffer et al., 2017). Causas genéticas relacionam-se a mutações, podendo estar associadas a condições hereditárias, mutações de novo ou variantes genéticas patogênicas (Scheffer et al., 2017). A etiologia infecciosa, por sua vez, se estabelece como a mais comum e resulta de alguma infecção, como neurocisticercose, tuberculose e toxoplasmose cerebral, por exemplo (Scheffer et al., 2017). Epilepsias com causas metabólicas envolvem distúrbios no metabolismo, como aminoacidopatias ou deficiência cerebral de folato (Scheffer et al., 2017). A etiologia imune compreende epilepsias com aspecto neuroinflamatório mediado por reações autoimunes, à exemplo da encefalite anti-receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) (Scheffer et al., 2017). Por fim, ainda há epilepsias com etiologia desconhecida, quando não se sabe ao certo as causas subjacentes à doença (Scheffer et al., 2017).

Independentemente da causa, o surgimento da epilepsia é desencadeado pela epileptogênese, um processo neurobiológico pelo qual redes encefálicas se tornam funcionalmente alteradas e mais suscetíveis a gerar crises epilépticas espontâneas e recorrentes (Pitkänen *et al.*, 2015). Classicamente, a epileptogênese é dividida em três diferentes momentos: insulto inicial, período latente e período crônico (Löscher; Hirsch; Schmidt, 2015). O insulto inicial se refere a um evento que gera diversas alterações celulares, moleculares e fisiológicas no ambiente cerebral (Patel *et al.*, 2019). O período latente compreende o intervalo entre o insulto epileptogênico e a ocorrência da primeira crise epiléptica (Patel *et al.*, 2019; Pitkänen *et al.*, 2015). Então, o período crônico se estabelece com crises espontâneas,

recorrentes e não provocadas que continuamente danificam o encéfalo (Patel *et al.*, 2019). Entretanto, esse paradigma vem mudando nos últimos anos.

Atualmente, entende-se que a epileptogênese é implicada não apenas nas etapas iniciais do desenvolvimento da doença, mas também como um evento contínuo e prolongado que contribui para a progressão do quadro de epilepsia (Dudek; Staley, 2012; Löscher; Hirsch; Schmidt, 2015). Além disso, estudiosos da epileptologia passaram a questionar o conceito de período latente, observando que nem sempre esse intervalo livre de crises é um requisito ou um precursor para o desenvolvimento da epilepsia crônica (Löscher; Hirsch; Schmidt, 2015). Com isso, é pensado que a epileptogênese possa se iniciar logo depois do insulto inicial, sem um período latente livre de crises epilépticas, e também se estender para depois do diagnóstico de epilepsia, haja vista que a frequência e a severidade das crises podem se agravar mesmo depois da primeira crise espontânea não provocada (Löscher; Hirsch; Schmidt, 2015; Pitkänen *et al.*, 2015).

Com ou sem a presença de um período latente, a epileptogênese é marcada por complexas alterações no ambiente cerebral. Mudanças na excitabilidade neuronal, brotamento axonal aberrante, neurodegeneração, gliose, prejuízos à barreira hematoencefálica, processos neuroinflamatórios e reorganização da matriz extracelular são alguns exemplos de eventos que ocorrem durante a epileptogênese (Patel *et al.*, 2019; Pitkänen; Lukasiuk, 2011). Todas essas transformações contribuem para a geração de um desequilíbrio entre excitação e inibição, estabelecendo-se uma diminuição patológica no limiar convulsivo por meio de um estado de hiperexcitabilidade (Avoli *et al.*, 2002; Avoli *et al.*, 2016).

Existem dois principais mecanismos hipotéticos aparentemente relevantes para a epileptogênese adquirida, levantados com base em dados eletrofisiológicos e histopatológicos. O primeiro é a perda seletiva de interneurônios que liberam o neurotransmissor ácido gamaaminobutírico (GABA) depois do *status epilepticus*, o que acaba reduzindo a inibição GABAérgica nos circuitos hipocampais (Dudek; Staley, 2012). O outro mecanismo é o brotamento axonal aberrante que leva à formação de novos circuitos excitatórios recorrentes, fenômeno que parece estar relacionado à atividade epiléptica e à perda de neurônios pela excitotoxicidade glutamatérgica (Dudek; Staley, 2012). Ressalta-se que o processo de excitotoxicidade é gerado pela hiperativação de diferentes subtipos de receptores glutamatérgicos, o que gera um influxo excessivo de cálcio e, portanto, morte neuronal por apoptose ou necrose (Nicotera; Leist; Manzo, 1999). Ainda assim, vários outros processos que parecem estar envolvidos no aparecimento de crises epilépticas, como anormalidades na função e expressão de canais de sódio, de potássio e de cálcio dependentes de voltagem, essenciais para o bom funcionamento da sinalização elétrica no ambiente neuronal (Mantegazza; Catterall, 2012; Cooper, 2012; Cain; Snutch, 2012).

Os medicamentos antiepilépticos disponíveis atualmente não são capazes de prevenir a progressão da doença, mas promovem alívio sintomático das crises epilépticas ao interagir com diversos alvos celulares relacionados aos eventos fisiopatológicos citados acima. Há quatro principais grupos de fármacos antiepilépticos, de acordo com o mecanismo de ação: (I) moduladores de canais iônicos dependentes de voltagem, como a carbamazepina; (II) potencializadores da inibição mediada por GABA, como o diazepam; (III) modulação direta da liberação sináptica, como o levetiracetam; e (IV) antagonistas de receptores glutamatérgicos, como o topiramato (Löscher *et al.*, 2020).

Convém ressaltar que um determinado antiepiléptico para o tratamento farmacológico deve ser escolhido de maneira individualizada, levando em conta o mecanismo de ação mais adequado e eficaz sobre os processos de geração e propagação das crises do paciente (Ministério da Saúde, 2019). Outros fatores como risco de recorrência de crises, consequências da continuação das crises para o paciente, eficácia e efeitos adversos também são considerados na decisão do início de um tratamento antiepiléptico (Ministério da Saúde, 2019). De acordo com a Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (Ministério da Saúde, 2022), os seguintes fármacos antiepilépticos estão disponíveis no Sistema Único de Saúde: ácido valproico, carbamazepina, clobazam, clonazepam, etossuximida, fenitoína, fenobarbital, gabapentina, lamotrigina, levetiracetam, primidona, topiramato e vigabatrina.

Segundo protocolos clínicos do Ministério da Saúde (2019), o tratamento farmacológico para a epilepsia tem como objetivo oferecer a melhor qualidade de vida possível para o paciente. Idealmente, busca-se a remissão total das crises com efeitos adversos mínimos, mas, por vezes, não se torna possível nem mesmo alcançar o controle adequado das crises epilépticas. Nesse caso, define-se a epilepsia farmacorresistente, ou epilepsia refratária, em que os pacientes não ficam livres das crises, mesmo após serem tratados com dois fármacos antiepilépticos tolerados e apropriados, seja em monoterapia ou na forma combinada (Kwan *et al.*, 2010; Ministério da Saúde, 2019). Aproximadamente 30% de todos os pacientes com epilepsia são resistentes ao tratamento e já é sabido que a ocorrência de crises não controladas é o maior fator de risco associado à morte súbita inesperada na epilepsia (Devinsky, 2011).

1.2 Epilepsia do Lobo Temporal e Formação Hipocampal

Em alguns subtipos de epilepsia, a porcentagem de pacientes farmacorresistentes é ainda maior, podendo chegar aos 70%. Esse é exatamente o caso da epilepsia do lobo temporal (ELT), um dos subtipos mais comuns de epilepsia em adultos, com elevadas taxas de refratariedade (Van Vliet; Aronica; Gorter, 2014). A impossibilidade de controle farmacológico adequado das crises na maioria dos casos de ELT faz com que esses pacientes sejam os mais indicados para ressecções cirúrgicas, que são uma alternativa comum de tratamento não farmacológico (Téllez-Zenteno; Hernandez-Ronquillo, 2012). Engel (2001) sugere que o alto índice de refratariedade nesse subtipo de epilepsia seja devido ao processo de *screening* de novos compostos antiepilépticos, que são identificados em modelos animais de crises generalizadas tônico-clônicas e crises de ausência.

As crises de ELT são amplamente estereotipadas entre os pacientes e costumam ser começar com uma aura, que é um fenômeno ictal subjetivo que dura vários segundos e pode preceder uma crise epiléptica observável (Engel, 2001; Blume *et al.*, 2001; Abarrategui *et al.*, 2021). A sensação mais comum é um movimento ou elevação na região epigástrica, mas também podem ocorrer outros sinais autonômicos ou psíquicos, além de sensações olfatórias ou gustatórias (Engel, 2001; Abarrategui *et al.*, 2021). As crises com prejuízo da consciência geralmente fazem com o que o paciente interrompa subitamente os movimentos e passe a olhar fixamente para o vazio (Engel, 2001; Abarrategui *et al.*, 2021). Durante a crise, que em geral dura de um a dois minutos, o indivíduo ainda pode apresentar automatismos oroalimentares e gestuais, movimentos do braço contralateral à descarga ictal e outras alterações motoras (Engel, 2001; Abarrategui *et al.*, 2021). A fase pós-ictal, depois da crise epiléptica, pode durar vários minutos e causa desorientação, confusão mental, perda de memória recente, amnésia e disfasia (Engel, 2001; Abarrategui *et al.*, 2021).

O diagnóstico da ELT é complexo e envolve anamnese, exames neurológicos e monitoramento por eletroencefalografia (EEG) ou vídeo-EEG e ressonância magnética. Pacientes com ELT geralmente apresentam histórico de crises epilépticas febris ou outras lesões nos anos iniciais de vida, como traumas cranianos ou infecções cerebrais (Engel, 2001). Além disso, é comum ter um histórico de epilepsia na família e observar o desenvolvimento da refratariedade. Exames neurológicos costumam estar normais, mas podem apontar um déficit de memória (Engel, 2001). O diagnóstico é confirmado com a detecção de atividade epileptiforme em uma ou mais regiões temporais por meio de EEG ou vídeo-EEG, com picos de amplitude máxima nos traçados eletroencefalográficos (Engel, 2001; Devinsky, 2004).

O lobo temporal é uma das regiões encefálicas mais epileptogênicas em humanos, sendo que as crises se originam majoritariamente na formação hipocampal e no complexo amigdaloide (Löscher, 1997; Tatum, 2012). Nessas áreas, pacientes com ELT apresentam esclerose hipocampal, astrogliose e formação de cicatrizes com tecido fibroso (Coras; Blümcke, 2015), aspectos ainda mais agravados pela impossibilidade de tratamento e controle das crises epilépticas refratárias.

A formação hipocampal é um conjunto de estruturas temporais que compreende o giro denteado, o hipocampo propriamente dito e o complexo subicular (Cappaert; Van Strien; Witter, 2015). Alguns autores também consideram o córtex entorrinal como parte da formação hipocampal (Schultz; Engelhardt, 2014). Em humanos, essa região possui uma extensão rostrocaudal de cinco centímetros, sendo mais larga em sua extremidade anterior e fazendo uma curva em direção à superfície medial do cérebro (Schultz; Engelhardt, 2014).

A formação hipocampal forma conexões principalmente unidirecionais e está arranjada majoritariamente como um alocórtex, apresentando organização cortical em três camadas: camada molecular, camada celular e camada polimórfica (Amaral; Scharfman; Lavenex, 2007; Boccara *et al.*, 2015). Adiante, será discutida a anatomia e a citoarquitetura de cada uma das estruturas que compõem a formação hipocampal e, posteriormente, será apresentada a conectividade estabelecida entre essas diferentes estruturas, bem como as alterações fisiopatológicas hipocampais encontradas na ELT.

O giro denteado é formado por três camadas: camada molecular, camada celular e camada polimórfica (Amaral; Scharfman; Lavenex, 2007). A camada molecular possui relativamente poucas células e é composta principalmente por dendritos das células granulares presentes na camada celular, além de fibras oriundas do córtex entorrinal e interneurônios (Amaral; Scharfman; Lavenex, 2007; Schultz; Engelhardt, 2014; Cappaert; Van Strien; Witter, 2015). A camada celular é formada por neurônios chamados de células granulares, que possuem corpo celular elíptico e ficam densamente empacotados sem a presença de células gliais (Amaral; Scharfman; Lavenex, 2007; Cappaert; Van Strien; Witter, 2015). As células granulares apresentam uma árvore dendrítica em forma de cone, com ramificações direcionadas à porção superficial da camada molecular (Cappaert; Van Strien; Witter, 2015). Esses neurônios glutamatérgicos possuem axônios não mielinizados que são chamados de fibras musgosas e se projetam para neurônios piramidais da área CA3 do hipocampo (Amaral; Scharfman; Lavenex, 2007). Por fim, a camada polimórfica, também chamada de hilo, é uma camada com diversos

tipos celulares, como interneurônios inibitórios e células musgosas, sendo essas também inervadas pelas fibras musgosas (Amaral; Scharfman; Lavenex, 2007).

O hipocampo propriamente dito é dividido em campos: CA3, CA2 e CA1 – CA significa Cornu Ammonis, nome dado a essas áreas em homenagem a um antigo deus egípcio (Schultz; Engelhardt, 2014). Existia certa discussão na literatura sobre a existência do campo CA4, entretanto, vários autores já deixaram de utilizar essa nomenclatura, defendendo que essa camada se confunde com o hilo (Schultz; Engelhardt, 2014; Cappaert; Van Strien; Witter, 2015; Insausti; Amaral, 2004). O hipocampo também é dividido em camada molecular, camada celular e camada polimórfica, mas existem algumas subdivisões dentro de cada camada. A camada molecular é formada pelo alveus, a superfície limitante com o lúmen ventricular que contém axônios das células piramidais, e pelo stratum oriens, que apresenta os dendritos basais das células piramidais e alguns interneurônios (Schultz; Engelhardt, 2014; Cappaert; Van Strien; Witter, 2015). A camada celular é chamada de stratum pyramidale e é formada por neurônios chamados de células piramidais (Schultz; Engelhardt, 2014; Cappaert; Van Strien; Witter, 2015). Por fim, a camada polimórfica contém os dendritos apicais das células piramidais e interneurônios (Schultz; Engelhardt, 2014; Cappaert; Van Strien; Witter, 2015). Essa camada é dividida em stratum lucidum, uma zona acelular presente apenas em CA3 que é ocupada pelas fibras musgosas; stratum radiatum, formada pelos dendritos apicais das células piramidais e conexões CA3-CA1; e stratum lacunosum-moleculare, a porção mais superficial adjacente à fissura hipocampal, onde se encontram as ramificações terminais dos dendritos das células piramidais e onde terminam as fibras oriundas do córtex entorrinal (Schultz; Engelhardt, 2014; Cappaert; Van Strien; Witter, 2015).

Mesmo com estrutura similar, os campos hipocampais possuem algumas particularidades. O campo CA3 apresenta células piramidais grandes inervadas por fibras musgosas, que são os axônios das células granulares do giro denteado (Schultz; Engelhardt, 2014; Cappaert; Van Strien; Witter, 2015). As células mais próximas do giro denteado apresentam um maior *input* de fibras musgosas e, por isso, apresentam clusters de espinhas dendríticas chamadas de excrescências espinhosas (Cappaert; Van Strien; Witter, 2015). O campo CA2 também apresenta células grandes, mas que já não são inervadas pelas fibras musgosas (Cappaert; Van Strien; Witter, 2015). As árvores dendríticas desses neurônios são menores e é difícil identificar as fronteiras entre CA3 e CA2 (Cappaert; Van Strien; Witter, 2015). Por fim, o campo CA1 apresenta células menores e mais homogêneas, contando com

uma circuitaria local de interneurônios principalmente GABAérgicos (Cappaert; Van Strien; Witter, 2015).

O complexo subicular, ou simplesmente subículo, é uma zona com duas principais camadas: *stratum pyramidale*, que possui células piramidais mais alargadas em relação a CA1, e *stratum moleculare* (Cappaert; Van Strien; Witter, 2015). É a principal fonte das eferências hipocampais, enviando fibras para outros locais do cérebro por meio do fórnix (Cappaert; Van Strien; Witter, 2015).

Associada à formação hipocampal, está a região parahipocampal, formada por présubículo, para-subículo, córtex entorrinal, córtex perirrinal e córtex pós-rinal (Cappaert; Van Strien; Witter, 2015). O pré-subículo e o para-subículo são uma região de perialocórtex, que é uma zona de transição entre o alocórtex de três camadas para o neocórtex tradicionais de seis camadas (Cappaert; Van Strien; Witter, 2015; Insausti *et al.*, 2017). O córtex entorrinal também é considerado perialocórtex, com camadas I a VI (Insausti *et al.*, 2017). Ressalta-se que a camada II do córtex entorrinal é a principal fonte de fibras para a via perfurante, que se projeta para o giro denteado e CA3 (Schultz; Engelhardt, 2014).

A via perfurante é a principal fonte de aferência cortical para a formação hipocampal, formando uma via trissináptica principalmente glutamatérgica (Schultz; Engelhardt, 2014; Neves; Cooke; Bliss, 2008). Primeiramente, neurônios da camada II e III do córtex entorrinal se projetam para a camada molecular do giro denteado e para o stratum lacunosum-moleculare de CA3 (Schultz; Engelhardt, 2014; Neves; Cooke; Bliss, 2008). Então, as células granulares do giro denteado são excitadas e projetam seus axônios, as fibras musgosas, para os dendritos dos neurônios piramidais proximais de CA3 (Schultz; Engelhardt, 2014; Neves; Cooke; Bliss, 2008). Por fim, axônios de todas as porções de CA3 se projetam para neurônios ipsilaterais CA1, formando os colaterais de Schaffer (Schultz; Engelhardt, 2014; Neves; Cooke; Bliss, 2008). Neurônios de CA3 também se projetam para as células piramidais contralaterais em CA3 e CA1, por meio de fibras comissurais (Schultz; Engelhardt, 2014; Neves; Cooke; Bliss, 2008). Convém ressaltar que interneurônios da camada polimórfica de CA1 enviam projeções inibitórias para CA3 e para o hilo do giro denteado, fornecendo um incomum feedback inibitório (Cappaert; Van Strien; Witter, 2015). Por fim, CA1 envia fibras axonais para o subículo e para as camadas V e VI do córtex entorrinal, que, por sua vez, se comunicam com neurônios da camada III do córtex entorrinal, formando uma espécie de loop polissináptico importante para a formação de memória (Schultz; Engelhardt, 2014; Neves; Cooke; Bliss, 2008). Toda essa circuitaria hipocampal está representada na figura 1.



Figura 1. Conectividade básica da formação hipocampal. No esquema, apresenta-se uma via trissináptica que começa com a via perfurante, em que neurônios das camadas II e III do córtex entorrinal se projetam para o giro denteado. Então, as fibras musgosas das células granulares do giro denteado enviam projeções para as células piramidais de CA3 que, por sua vez, emitem colaterais de Schaffer para CA1. Modificado de Neves; Cooke; Bliss (2008).

Por ser uma região com alta excitabilidade, a formação hipocampal sofre danos particulares ocasionados pela ELT. Um exemplo disso é a esclerose hipocampal, o achado histopatológico mais comum em adultos diagnosticados com ELT refratária (Blümcke *et al.*, 2013). Esse fenômeno é caracterizado por uma perda de neurônios piramidais em qualquer área do hipocampo associado a gliose, mas a área CA1 parece ser especialmente sensível à morte neuronal por excitotoxicidade (Blümcke *et al.*, 2013; Dudek; Staley, 2012). Outra característica encontrada é o brotamento aberrante de fibras musgosas, que passam a invadir as camadas moleculares do tecido hipocampal e formar sinapses anormais que geram novos circuitos excitatórios recorrentes (You *et al.*, 2022). A perda de interneurônios GABAérgicos, comentada anteriormente, também acaba por facilitar ainda mais a ocorrência de crises epilépticas, principalmente no giro denteado e em CA1 (Dudek; Staley, 2012).

Convém ressaltar mais um aspecto fisiopatológico relevante na ELT, a neuroinflamação. Também chamado de inflamação central, esse processo corresponde a um conjunto de respostas imunes inatas e adaptativas que ocorrem no encéfalo. Uma variedade de fatores pode desencadear a ativação inflamatória no tecido nervoso (Pracucci *et al.*, 2021), como traumatismos cerebrais, infecções, proteínas mal dobradas, fragmentos celulares, envelhecimento, poluição ou desbalanços no ambiente cerebral – este último sendo uma característica clássica da ELT. A neuroinflamação é fundamental para minimizar danos, reparar tecidos e restaurar a homeostase. Entretanto, a inflamação persistente passa a se tornar prejudicial para o tecido nervoso, provocando neurotoxicidade e neurodegeneração.

1.3 Neuroinflamação na Epilepsia do Lobo Temporal

Todas as células do sistema nervoso central (SNC) estão envolvidas na neuroinflamação, mas as células microgliais são as primeiras a reagir. 10% da composição celular encefálica corresponde às micróglias, células imunes residentes do tecido nervoso que são prontamente mobilizadas em situações cerebrais patológicas (Salter; Stevens, 2017). Derivadas um progenitor mieloide hematopoiético comum, as micróglias podem ser consideradas próximas dos macrófagos do sistema imune periférico (Vainchtein; Molofsky, 2020), mas com funções ativamente adaptadas ao ambiente neuronal.

As células microgliais são consideradas guardiãs do SNC, devido à gama de papéis fundamentais que desempenham tanto em condições normais como patológicas. Seus processos ramificados estão em constante movimento, realizando vigilância do tecido nervoso e fagocitose de detritos ou subestruturas celulares (Salter; Stevens, 2017; Wolf; Boddeke; Kettenmann, 2017). Elas também promovem proliferação e sobrevivência neuronal, regulam a neurogênese, mantêm a homeostase da mielina, removem sinapses muito ou pouco ativas por poda sináptica, modulam conexões axonais e participam no remodelamento sináptico – além de oferecer proteção contra micro-organismos patogênicos e proteínas próprias danosas (Hickman *et al.*, 2018; Hiragi; Ikegaya; Koyama, 2018; Salter; Stevens, 2017; Wolf; Boddeke; Kettenmann, 2017).

Durante situações de homeostase, essas células são altamente ramificadas e móveis, otimizando a função cerebral e dando suporte a funções neuronais, em um estado saudável (Yu; Deng; Xu, 2023). Entretanto, em resposta a gatilhos neuroinflamatórios, as micróglias passam por uma transição fenotípica funcional para limitar danos e otimizar a sobrevivência, tornandose ameboides e fagocíticas (Yu; Deng; Xu, 2023). Esse é um processo dinâmico que envolve não apenas mudanças morfológicas, mas também alterações contexto-dependentes na distribuição especial, expressão gênica, eletrofisiologia, perfil imunológico e metabolismo (Yu; Deng; Xu, 2023). Morin-Brureau e colaboradores (2018) encontraram diferentes fenótipos microgliais nos encéfalos de pacientes afetados pela ELT mesial com esclerose hipocampal. A morfologia das micróglias variou de altamente ramificada a ameboide, sendo que a ocorrência de células ameboides se correlacionou com menor densidade neuronal e foi maior observada em CA1 e CA3, regiões escleróticas no hipocampo. Essas áreas também apresentaram células microgliais com maior expressão de proteínas do complexo principal de histocompatibilidade tipo II e resposta mais rápida a agonistas purinérgicos.

Alguns estudos apontam que as células microgliais possuem papéis neuroprotetores e antiepilépticos na ELT. Demonstrou-se que a micróglia contribuiu para a restauração da função e da estrutura de dendritos depois de crises severas (Eyo *et al.*, 2021), reduziu a hiperexcitabilidade neuronal (Merlini *et al.*, 2021; Hu *et al.*, 2023) e diminuiu a morte neuronal provocada por ácido caínico em fatias hipocampais (Araki; Ikegaya; Koyama, 2020). Além disso, os níveis de citocinas anti-inflamatórias – como IL-4 e IL-10 – em micróglias são maiores depois de crises epilépticas (Benson; Manzanero; Borges, 2015).

Corroborando esses efeitos neuroprotetores, foi observado que a depleção de micróglias agravou crises induzidas por pilocarpina em camundongos, além de aumentar a degeneração neuronal provocada por excitotoxicidade no hipocampo (Liu *et al.*, 2020). Esse efeito também foi observado para crises induzidas por ácido caínico e por estimulação elétrica hipocampal (Gibbs-Shelton *et al.*, 2023) e em três diferentes linhagens transgênicas de camundongos depois da indução de *status epilepticus* por ácido caínico (Wu *et al.*, 2020). A ausência de células microgliais também aumentou crises epilépticas espontâneas e recorrentes no período crônico e aumentou a mortalidade dos animais (Wu *et al.*, 2020). Em contrapartida, a repopulação de micróglias reverteu os efeitos prejudiciais causados pela depleção dessas células (Gibbs-Shelton *et al.*, 2023; Wu *et al.*, 2020), sugerindo uma nova possibilidade de alvo terapêutico para a ELT.

Apesar de todo o exposto, o comportamento microglial na ELT é tão complexo que essas células também podem contribuir para o agravamento da patologia. Estudos demonstram que as micróglias levam à degradação sináptica e ao desequilíbrio entre excitação e inibição ao podar preferencialmente as sinapses inibitórias (Fan *et al.*, 2023), além de contribuir para a neurodegeneração (Heo *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2015) e para a neurogênese aberrante (Victor; Tsirka, 2020). Contraditoriamente, os níveis microgliais de citocinas pró-inflamatórias, como

TNF-α, IL-1β, IL-6 and IL-12, também demonstraram estar aumentados depois de crises epilépticas (Benson; Manzanero; Borges, 2015; Henning *et al.*, 2023).

Muitos estudos que investigam o papel das micróglias na ELT bloquearam suas funções com a utilização da minociclina, um potente inibidor da ativação microglial e de vias apoptóticas (Yong *et al.*, 2004). O tratamento com minociclina demonstrou suprimir a atividade das células microgliais e a produção de IL-1 β e TNF- α no hipocampo (Wang *et al.*, 2015). Além disso, também foi observada uma diminuição da morte neuronal induzida pelo *status epilepticus* e menor frequência, duração e severidade das crises em um modelo de ELT induzido por pilocarpina em ratos (Wang *et al.*, 2015). Resultados similares foram obtidos com a utilização do G2580, que bloqueia a proliferação microglial pela inibição de receptores CSF1. Di Nunzio e colaboradores (2021) observaram que o GW2580 mediou a neuroproteção no hipocampo, diminuiu a infiltração de leucócitos e reduziu o número de crises em camundongos epilépticos.

Independentemente de serem benéficas ou maléficas no contexto epiléptico, é evidente que as células microgliais estão intrinsicamente envolvidas na fisiopatologia da ELT. À luz disso, cada vez mais pesquisas vêm abordando a modulação microglial para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas inovadoras para a ELT. Alguns estudos sugerem, inclusive, que fármacos antiepilépticos com propriedades anti-inflamatórias voltadas para as células gliais são opções promissoras para o tratamento da epilepsia (Dambach *et al.*, 2014).

A resposta microglial é um dos primeiros eventos da epileptogênese e persiste até mesmo nos estágios crônicos da ELT, mas outras células gliais também desempenham papéis importantes nessa doença. Já é bem estabelecido, por exemplo, que micróglias ativadas recrutam astrócitos reativos e neurotóxicos, principalmente por meio de mediadores inflamatórios, como IL-1 α , TNF- α and C1q (Henning *et al.*, 2023; Liddelow *et al.*, 2017; Sano *et al.*, 2021). Essas células são outro componente essencial na fisiopatologia da ELT.

Os astrócitos são o tipo mais abundante de glia, representando 20 a 50% da composição celular no SNC (Hasel; Liddelow, 2021). Derivados de precursores neuroepiteliais, eles estão envolvidos em uma ampla gama de funções absolutamente essenciais para a homeostase cerebral (Vainchtein; Molofsky, 2020). Essas células estreladas fornecem suporte trófico e metabólico a neurônios, mediam a formação e a eliminação de sinapses, regulam níveis de neurotransmissores, mantêm o balanço iônico e eletrolítico, interagem com células imunes e integram a sinalização neuronal – além de serem componentes estruturais fundamentais da barreira hematoencefálica (Hasel; Liddelow, 2021; Patani; Hardingham; Liddelow, 2023).

Durante situações patológicas, os astrócitos reagem de diferentes maneiras, dependendo da natureza do desequilíbrio homeostático. Frente a lesões ou doenças, essas células se tornam reativas, passando por alterações heterogêneas em aspectos transcricionais, bioquímicos, morfológicos, metabólicos e fisiológicos (Escartin *et al.*, 2021). Esse processo é definido como astrogliose reativa e é um importante processo fisiopatológico da ELT, estando consistentemente associada com a esclerose hipocampal (Blümcke *et al.*, 2013).

Na ELT, os astrócitos demonstram alterações na expressão de proteínas importantes para o equilíbrio entre excitação e inibição, como transportadores de glutamato e GABA, canais de potássio retificadores de entrada, conexinas e aquaporinas (Çarçak; Onat; Sitnikova, 2023). Adicionalmente, astrócitos reativos podem até mesmo liberar mediadores pró-inflamatórios, conhecidos por facilitarem a neurotransmissão excitatória (Dejakaisaya; Kwan; Jones, 2021; Nikolic *et al.*, 2018).

O balanço entre glutamato e GABA é essencial na ELT e os astrócitos desempenham um papel relevante na regulação de neurotransmissores. Por meio de eficientes transportadores de aminoácidos excitatórios, essas células realizam a recaptação, o metabolismo e a reciclagem do excesso de glutamato na fenda sináptica (Sofroniew; Vinters, 2010). Contudo, a expressão de transportadores de glutamato em astrócitos está diminuída na ELT, o que já foi observado tanto em modelos animais como na formação hipocampal de pacientes humanos (Peterson; Binder, 2019; Proper *et al.*, 2002; Sarac *et al.*, 2009). Por isso, esses transportadores também se tornaram um alvo terapêutico. Estudos demonstram que aumentar a expressão ou inibir a degradação do transportador de glutamato 1 alivia prejuízos cognitivos, melhora o quadro de astrogliose reativa e reduz frequência, severidade e duração de crises epilépticas (Peterson *et al.*, 2021; Ramandi *et al.*, 2021; Sha *et al.*, 2017).

Uma outra estratégia para resgatar o balanço entre excitação e inibição é a modulação da neurotransmissão de GABA, como já comentado. Apesar de transportadores de GABA parecerem estar menos expressos na ELT (Schijns *et al.*, 2015), astrócitos são considerados responsáveis pelas correntes inibitórias no encéfalo epiléptico (Müller *et al.*, 2020). Em um modelo animal de ELT induzido por cainato, Müller e colaboradores (2020) demonstraram que os níveis de GABA estão aumentados em astrócitos reativos, o que provavelmente é um mecanismo pelo qual essas células naturalmente tentam controlar as crises epilépticas.

Astrócitos também regulam a excitabilidade neuronal por meio da manutenção do equilíbrio iônico e eletrolítico. Essas células expressam canais de potássio retificadores de

entrada (K_{ir}) que fazem a recaptação do excesso de potássio extracelular liberado por neurônios durante potenciais de ação (Kinboshi; Ikeda; Ohno, 2020). Todo esse potássio é então realocado para regiões com menores concentrações por meio de junções *gap* que contribuem para a formação de um sincício astrocítico (Kinboshi; Ikeda; Ohno, 2020). Dessa forma, astrócitos são capazes de manter a homeostase do potássio no microambiente neuronal.

Na ELT, um subtipo específico desses canais, o K_{ir} 4.1, parece estar negativamente regulado em astrócitos (Kinboshi; Ikeda; Ohno, 2020). Além disso, as supracitadas junções *gap* que permitem a realocação do potássio também estão comprometidas nessa doença (Kinboshi; Ikeda; Ohno, 2020). É relevante mencionar que essa alteração no acoplamento das junções *gap* não se dá devido a uma menor expressão de seus componentes estruturais, as conexinas 43 e 30, mas sim por uma certa perda de função dessas proteínas (Das *et al.*, 2012; Collignon *et al.*, 2006; Fonseca; Green; Nicholson, 2002). As conexinas são abundantemente expressas nos encéfalos de pacientes epilépticos, mas apresentam alterações na distribuição subcelular, na morfologia e nos padrões de fosforilação (Bedner; Steinhäuser, 2023; Deshpande *et al.*, 2017). Esses mecanismos ainda são alvos terapêuticos emergentes, com poucos estudos abordando o tamponamento de potássio e o acoplamento de junções *gap* para o tratamento da ELT (Gangoso *et al.*, 2017; Guo *et al.*, 2022; Walrave *et al.*, 2020).

Em associação com a homeostase iônica, a regulação de água é outro aspecto relevante para a excitabilidade neuronal – já que mudanças na osmolaridade e no tamanho do espaço extracelular podem aumentar ou atenuar a atividade epileptiforme (Binder; Steinhäuser, 2021). No encéfalo, a regulação de água é realizada principalmente pelas aquaporinas-4, canais de água que são expressos de forma ubíqua em células gliais (Binder; Steinhäuser, 2021). Os astrócitos apresentam uma distribuição particular desses canais em diferentes domínios da membrana, sendo que as aquaporinas estão mais concentradas nos pés vasculares do que nos prolongamentos entrelaçados com neurônios (Nagelhus; Mathiisen; Ottersen, 2004). Essa disposição facilita o fluxo de fluidos entre o sangue e o espaço extracelular cerebral (Nagelhus; Mathiisen; Ottersen, 2004). Na ELT, esses canais se redistribuem e se tornam mais abundantes nos processos perissinápticos, gerando edema astrocítico, redução no espaço extracelular e hiperexcitabilidade (Wetherington; Serrano; Dingledine, 2008). Todo esse mecanismo fisiopatológico influenciou alguns estudos a sugerirem a aquaporina-4 como um alvo terapêutico para a ELT (Bonosi *et al.*, 2023). Em acréscimo a todos esses papéis na fisiologia cerebral normal e na fisiopatologia da ELT, os astrócitos são componentes estruturais fundamentais da barreira hematoencefálica, uma interface física, funcional e metabólica que separa o tecido nervoso da corrente sanguínea (Abbott; Rönnbäck; Hansson, 2006). Os pés vasculares dos astrócitos envolvem as células endoteliais que compõem os capilares não fenestrados da microvasculatura cerebral, regulando a permeabilidade dos vasos sanguíneos, mantendo a integridade da barreira e secretando fatores de proteção vascular (Michinaga; Koyama, 2019).

A barreira hematoencefálica é essencial no SNC, limitando a entrada da maioria das moléculas no parênquima cerebral e fornecendo nutrientes para o tecido nervoso (Abbott; Rönnbäck; Hansson, 2006). Além disso, essa barreira exerce grande influência no microambiente das células cerebrais, dada a pequena distância entre neurônios e capilares (Abbott; Rönnbäck; Hansson, 2006). É sabido que, por meio de mecanismos ainda não completamente elucidados, essa interface sofre uma desestruturação durante quadros neuroinflamatórios, demonstrando alterações no citoesqueleto de actina e na expressão das junções oclusivas (Erickson; Dohi; Banks, 2012).

Em um quadro de epilepsia, a barreira hematoencefálica está patologicamente modificada de diversas formas, sendo uma causa e também uma consequência da atividade epiléptica (Löscher, 2020). Estudos realizados em modelos animais e em pacientes já observaram que ocorre angiogênese aberrante nos focos epilépticos da ELT (Marchi; Lerner-Natoli, 2013), fenômeno associado à perda de junções de oclusão e aumento da permeabilidade a imunoglobulinas G (Rigau *et al.*, 2007). Esse processo fisiopatológico gera uma associação particularmente relevante entre os processos inflamatórios centrais e periféricos. Com o afrouxamento da barreira, componentes do sistema imune periférico acabam se deslocando para o tecido nervoso, interagindo com células microgliais e astrócitos.

Pela desestruturação da barreira hematoencefálica, a neuroinflamação acaba perturbando o tráfego normal de leucócitos para o SNC, gerando infiltração de monócitos, neutrófilos, linfócitos B e linfócitos T para o tecido nervoso por meio de uma captura inicial abrupta seguida de uma diapedese anormal (Löscher, 2020; Mayadas *et al.*, 1993). Esse fenômeno é mais um contribuidor para a complexidade da resposta inflamatória na ELT, que envolve não apenas os componentes do SNC, mas também células imunes periféricas. Além disso, a desestruturação da barreira também pode ser constatada em pacientes epilépticos pelo

aumento da concentração sérica de proteínas associadas à barreira hematoencefálica (Bronisz *et al.*, 2023).

Uma importante proteína presente nessa interface entre tecido nervoso e corrente sanguínea é a claudina-5. Componente das junções de oclusão localizadas na porção mais apical das membranas endoteliais, a claudina-5 é uma das proteínas diretamente responsáveis pela permeabilidade dessas junções (Greene; Hanley; Campbell, 2019). Nos pontos em que as junções de oclusão promovem a adesão entre células, a distância intercelular é quase nula, o que contribui para a manutenção da integridade estrutural da barreira hematoencefálica (Greene; Hanley; Campbell, 2019). Em resposta a estímulos neuroinflamatórios, observa-se uma diminuição da expressão das proteínas das junções de oclusão, como a claudina-5 (Greene; Hanley; Campbell, 2019; Greene *et al.*, 2022). Na ELT, esse panorama não é diferente.

Greene e colaboradores (2022) demonstraram, pela primeira vez, uma correlação direta entre a epilepsia e os níveis de claudina-5 na barreira hematoencefálica de pacientes humanos. Nesse estudo, foi observada uma diminuição dos níveis dessa proteína em pacientes com ELT, em comparação a pacientes controles saudáveis. Em um modelo animal de ELT induzido por ácido caínico, empregado no mesmo trabalho, os pesquisadores ainda encontraram que a indução focal de crises epilépticas diminuiu a expressão de claudina-5. Além disso, observaram que a redução específica da expressão de claudina-5 agravou crises induzidas por ácido caínico. Todos esses achados vêm fazendo com que a barreira hematoencefálica também seja um alvo terapêutico alternativo para o tratamento da ELT (Reiss *et al.*, 2022).

Considerando todo o exposto, a neuroinflamação é agora reconhecida como um alvo emergente nas pesquisas que buscam tratamentos inovadores para a ELT. Com a alta taxa de refratariedade e a severidade das crises epilépticas observadas nesses pacientes, destaca-se a urgente necessidade da busca por novos compostos que atuem sobre os alvos inflamatórios relacionados a essa condição. Dentre as várias fontes de moléculas terapêuticas, as peçonhas animais se revelam como reservatórios valiosos de compostos bioativos, trazendo novas perspectivas para o tratamento da ELT.

1.4 Peçonhas Animais como Fontes de Compostos Terapêuticos

Ao longo do processo evolutivo, alguns animais invertebrados desenvolveram peçonhas constituídas por um amplo arsenal de compostos biologicamente ativos (Oliveira; Soares; Silva,

2023). Constantemente sob a ação da pressão seletiva, essas peçonhas promovem uma vantagem na sobrevivência desses animais e estão envolvidas nas interações predador-presa, sendo utilizadas para paralisar ou matar presas ou servindo como proteção contra predadores (Oliveira; Soares; Silva, 2023).

Moléculas derivadas de peçonhas apresentam vários efeitos no SNC de mamíferos, agindo em receptores, transportadores e canais iônicos de neurônios excitatórios e inibitórios – sítios de ação de muitas neurotoxinas (Oliveira; Soares; Silva, 2023). Nesse contexto, tais compostos se mostram como úteis ferramentas farmacológicas, já que podem ajudar no entendimento da transmissão sináptica e também no desenho de novos medicamentos para o tratamento de doenças neurológicas (Mortari, 2007).

Peptídeos antiepilépticos já foram encontrados em peçonhas de diversos invertebrados, como aranhas, escorpiões, moluscos e vespas (Lima *et al.*, 2022). Dentre esses animais cujas peçonhas são objetos de pesquisa, as vespas se destacam pela ampla distribuição, em todo o mundo, e pela grande biodiversidade, com mais de 5.000 espécies catalogadas (El-Wahed *et al.*, 2021). Sabe-se que as vespas utilizam sua peçonha para proteger colônias ou para capturar presas (El-Wahed *et al.*, 2021). A peçonha das vespas possui uma rica gama de enzimas, proteínas, peptídeos, compostos voláteis e moléculas bioativas com efeitos antitumorais, antimicrobianos, anticoagulantes, antioxidantes, anti-inflamatórios e neuroprotetores (El-Wahed *et al.*, 2021).

Estudos anteriores do Laboratório de Neurofarmacologia da Universidade de Brasília (UnB) já identificaram e isolaram diversos peptídeos antiepilépticos derivados ou bioinspirados da peçonha de vespas sociais. Alguns exemplos são Neuropolybina, Chartergellus-CP1, NOR-1202, Occidentalina-1202 e Neurovespina (Silva *et al.*, 2020; Lopes *et al.*, 2021; Quintanilha *et al.*, 2024; Mortari *et al.*, 2023; Carneiro, 2013).

1.5 Peptídeo Neurovespina

O peptídeo Neurovespina é um composto antiepiléptico bioinspirado de um peptídeo isolado da peçonha da vespa social *Polybia occidentalis*. Essa vespa é endêmica de regiões neotropicais e sua peçonha é composta por proteínas de alta massa molecular, peptídeos, aminas biogênicas e sais inorgânicos, sendo que cerca de 70% de sua composição correspondem a peptídeos (Carneiro, 2013; Mortari *et al.*, 2005).

Mortari e colaboradores (2023) investigaram a neurotoxicidade da peçonha bruta dessa vespa em ratos, via administração intracerebroventricular. Foi notado um forte efeito neurotóxico nos animais, sendo observadas crises convulsivas e mortes em 100% dos animais que receberam a maior dose da peçonha bruta, 60 g/L. Por outro lado, a peçonha desnaturada não teve os mesmos efeitos, não chegando a induzir comportamentos pró-cursivos nem mesmo em doses altas (100 g/L). Esses dados sugerem que a neurotoxicidade da peçonha bruta foi causada pelos compostos de alta massa molecular (Mortari *et al.*, 2023).

Ainda foram analisados os efeitos da peçonha desnaturada de *P. occidentalis* em ratos, também pela via intracerebroventricular. Observou-se que, além de levar a um aumento da latência para o início das crises convulsivas, a peçonha desnaturada dessa vespa apresentou alta atividade anticonvulsivante contra crises induzidas por vários agentes convulsivantes, especialmente ácido caínico (Mortari *et al.*, 2023). No mesmo estudo, também foi realizado um isolamento dos compostos de baixa massa molecular da peçonha, através de cromatografia líquida de alta eficiência. Com isso, Mortari e colaboradores (2023) obtiveram um novo peptídeo denominado Occidentalina-1202 (OcTx-1202), formado por nove resíduos de aminoácidos: Glu-Gln-Tyr-Met-Val-Ala-Phe-Trp-Met-NH₂. A OcTx-1202 mostrou um efeito anticonvulsivante dose-dependente contra crises induzidas por ácido caínico em ratos, nas doses de 1, 0,5 e 0,1 µg/animal. Também foi notado que esse peptídeo promoveu um aumento significativo da latência das crises, de forma dose-dependente (Mortari *et al.*, 2023).

Tendo em vista que o estudo inicial apresentou apenas testes realizados com o composto natural, foram analisados os efeitos da OcTx-1202 sintética e observou que esse peptídeo também apresentou atividade anticonvulsivante contra crises epilépticas causadas por ácido caínico. Além disso, ainda foi criado um peptídeo análogo ao natural, visando torná-lo mais estável e aumentar sua atividade anticonvulsivante. A esse peptídeo modificado foi dado o nome de Neurovespina.

A Neurovespina é constituída por nove resíduos de aminoácidos e apresenta a sequência PyrGlu-Gln-Met-Trp-Ala-Val-Phe-Trp-Met-NH₂ (figura 2) (Campos, 2020). O primeiro aminoácido da OcTx-1202, ácido glutâmico, foi substituído por ácido piroglutâmico para aumentar a afinidade do peptídeo com os receptores de membrana do SNC e evitar a degradação (Mortari; Carneiro, 2014). Além disso, foi retirada a tirosina da terceira posição e adicionado um triptofano na quarta posição, visando facilitar a passagem do peptídeo pela barreira hematoencefálica ao amplificar sua característica apolar (Mortari; Carneiro, 2014). O
posicionamento da alanina e da valina foi invertido e os três últimos resíduos de aminoácidos foram mantidos (Mortari; Carneiro, 2014). Por fim, foi realizada uma amidação na extremidade carboxi-terminal do peptídeo, uma modificação pós-traducional que estabiliza regiões helicoidais e atribui maior carga positiva à molécula (Mortari; Carneiro, 2014).



Figura 2. Fórmula estrutural do peptídeo Neurovespina.

A atividade antiepiléptica da Neurovespina foi testada por meio de bioensaios com roedores, em um modelo de indução aguda de crises por ácido caínico. Esse peptídeo mostrou então uma intensa atividade anticonvulsivante contra essas crises nas doses de 3, 1,5 e 0,15 g/animal, via intracerebroventricular e via intraperitoneal – o que evidencia sua capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica. Ainda foi relatado que a atividade antiepiléptica da Neurovespina é cerca de seis vezes mais potente do que a da OcTx-1202 sintética, tendo em vista os valores de DE₅₀ de cada um desses compostos (Carneiro, 2013; Mortari *et al.*, 2023).

Carneiro (2013) também avaliou indiretamente a atividade neuroprotetora da Neurovespina, analisando a reatividade de neurônios de regiões hipocampais (giro denteado, CA1 e CA3) à proteína c-fos. A proteína c-fos é um marcador útil na identificação de circuitos ativados em resposta a estímulos como a epilepsia, já que sua expressão é induzida em situações de estimulação neuronal intensa. Foi observado que, nas regiões CA1 e CA3, a Neurovespina diminuiu significativamente a expressão de c-fos, o que indica um possível efeito neuroprotetor desse peptídeo (Carneiro, 2013).

Em concordância com esse resultado, Campos (2016) também observou atividade neuroprotetora da Neurovespina em um modelo animal de hemiparkinsonismo induzido pela toxina 6-hidroxidopamina. Neurônios da substância negra, afetados na doença de Parkinson, foram avaliados por meio de imunomarcação anti-tirosina hidroxilase, que marca uma enzima presente nos neurônios dopaminérgicos. Analisando-se a porcentagem de neurônios remanescentes reativos à tirosina hidroxilase e comparando-se com o lado contralateral sadio, foi notado que o grupo tratado com a Neurovespina na dose de 4 mg/kg apresentou uma porcentagem de neurônios significativamente maior que o grupo lesado, o que corrobora o efeito neuroprotetor do peptídeo (Campos, 2016).

Foi realizado ainda um estudo com o objetivo de elucidar o mecanismo de ação ou o alvo farmacológico que atribui à Neurovespina sua capacidade antiepiléptica e neuroprotetora. Avaliou-se a atividade da Neurovespina na neurotransmissão glutamatérgica e na homeostase de cálcio intracelular, além de seu efeito na viabilidade celular, na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e em correntes de canais de cálcio voltagem-dependentes do subtipo 1.2 (Cav1.2) (Campos, 2020).

Primeiramente, inferiu-se que a Neurovespina poderia agir na modulação de elementos sinápticos, haja vista seu potente efeito antiepiléptico. Já que vários fármacos antiepilépticos modulam a neurotransmissão glutamatérgica, foram realizados ensaios com sinaptossomas para investigar a competição entre a Neurovespina e o glutamato, sendo observado que não houve competição entre os dois compostos – o que indica que a Neurovespina não compete com os sítios do glutamato em receptores glutamatérgicos (Campos, 2020). Além disso, também foi investigada a modulação da captação do glutamato em um ensaio com sinaptossomas, já que esse peptídeo poderia agir diminuindo o tempo de permanência do glutamato na fenda sináptica. Como resultado, notou-se que a Neurovespina não alterou a captação de glutamato (Campos, 2020).

Outro fator analisado foi a homeostase de cálcio intracelular. O cálcio tem concentração celular extremamente regulada e está relacionado a processos neuronais importantes, como a mobilização de vesículas sinápticas. Em um ensaio com células de neuroblastoma SH-SY5Y, foi visto que as diferentes doses de Neurovespina não alteraram as concentrações intracelulares de cálcio de forma perceptível e, portanto, não geraram o influxo de cálcio ou a mobilização de reservas intracelulares de cálcio (Campos, 2020).

Com o mesmo modelo celular, foi realizado um ensaio de viabilidade celular e produção de ROS para investigação da ação neuroprotetora da Neurovespina. As células de neuroblastoma foram tratadas com Neurovespina e depois submetidas insultos de glutamato e 6-OHDA. Foi observado que células tratadas com Neurovespina em doses de 25 µM e 12,5 µM produziram menos ROS em comparação às células do controle negativo (Campos, 2020).

Por fim, foi realizado também um ensaio eletrofisiológico com a técnica de *patch clamp*, no qual foi avaliado o efeito da Neurovespina em macrocorrentes de cálcio de células que expressavam apenas canais do tipo Cav1.2. Como resultado, observou-se que esse peptídeo inibiu correntes de cálcio desses canais, fato que concilia o efeito antiepiléptico e a ação neuroprotetora da Neurovespina (Campos, 2020).

O estudo de Campos (2020) foi pioneiro na investigação dos alvos farmacológicos da Neurovespina, um potente composto antiepiléptico e neuroprotetor que é fruto de mais de 15 anos de pesquisas. Entretanto, ainda existem algumas lacunas não respondidas sobre a Neurovespina, já que não se sabe o efeito desse peptídeo em alvos relacionados à neuroinflamação. Haja vista que a neuroinflamação é um aspecto fisiopatológico importante na ELT e que é de suma importância aprofundar o entendimento da farmacologia dessa molécula, torna-se particularmente pertinente compreender o efeito da Neurovespina em alvos celulares ou moleculares associados a quadros neuroinflamatórios.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi investigar a atividade do peptídeo Neurovespina em processos neuroinflamatórios no modelo animal de ELT induzido por pilocarpina em camundongos.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito do tratamento com o peptídeo Neurovespina na redução da esclerose hipocampal.
- Avaliar o efeito do tratamento com o peptídeo Neurovespina na proliferação microglial.
- Avaliar o efeito do tratamento com o peptídeo Neurovespina na astrogliose reativa.
- Avaliar o efeito do tratamento com o peptídeo Neurovespina na expressão da citocina pró-inflamatória interleucina-1β.
- Avaliar o efeito do tratamento com o peptídeo Neurovespina na expressão da proteína claudina-5.

3 Metodologia

3.1 Aspectos Éticos

O manuseio dos animais utilizados neste projeto foi rigorosamente norteado pela Lei n° 11.794/2008 e pelas normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, que regulamentam o uso de animais na pesquisa científica. O projeto também foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da UnB, sob o processo SEI n° 23106.044079/2023-01 (anexo I). A CEUA aprovou a utilização de 140 camundongos machos (*Mus musculus*) da linhagem *Swiss*, provenientes do biotério do Instituto de Ciências Biológicas da UnB. Quanto ao uso do peptídeo Neurovespina, bioinspirado de compostos presentes na peçonha da vespa *Polybia occidentalis*, o projeto foi cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado, sob o número A034307 (anexo II).

3.2 Animais Experimentais

Neste projeto, foram utilizados camundongos *Swiss* machos da espécie *Mus musculus*, com 6 a 13 semanas e peso entre 25 e 46 gramas (n = 4-7/grupo). Os animais foram acondicionados no biotério do Instituto de Ciências Biológicas da UnB em condições controladas, com ciclo de claro e escuro de 12 horas, temperatura entre 22 e 24 °C e umidade de 55%. A estrutura física do biotério conta com estantes com exaustão de ar adequada e condicionadores que mantêm a temperatura em uma faixa apropriada. Os animais receberam ração e água *ad libitum* e foram alojados em grupos de no mínimo dois camundongos, sendo no máximo cinco animais em caixas pequenas (30x20x13 cm) e no máximo 10 animais em caixas grandes (30x34x16 cm). Para identificação dos sujeitos, foi utilizada marcação na cauda com caneta permanente.

3.3 Modelo Animal de Epilepsia do Lobo Temporal Induzido por Pilocarpina

Para avaliação da atividade do peptídeo Neurovespina em um contexto neuroinflamatório, os camundongos foram submetidos ao modelo animal de ELT induzido por pilocarpina. O modelo, realizado com base em Carneiro (2017) e em Marques (2024), é subdividido em três etapas: insulto inicial, período latente e período crônico. O insulto inicial compreende a indução de um quadro de *status epilepticus* pela administração sistêmica de pilocarpina. O período latente corresponde ao desenvolvimento da epileptogênese, seguido pelo período crônico, em que os animais apresentam crises epilépticas espontâneas, recorrentes e

não provocadas. No entanto, este projeto se concentrou apenas no estudo do período latente, um estágio pré-epiléptico que compreende uma severa atividade neuroinflamatória, contando com neurodegeneração hipocampal seguida de astrogliose reativa, recrutamento de células microgliais, liberação de citocinas pró-inflamatórias e prejuízos à barreira hematoencefálica (Patel *el al.*, 2019; Pitkänen; Lukasiuk, 2011). O protocolo experimental está representado na figura 3.



Figura 3. Representação esquemática dos nove dias de protocolo experimental, desde o insulto inicial até a eutanásia dos animais. Figura elaborada no BioRender.

No primeiro dia do protocolo experimental, todos os camundongos – exceto os do grupo sadio – foram submetidos ao insulto inicial. Primeiramente, os animais receberam uma injeção intraperitoneal de butilbrometo de escopolamina (4 mg/kg, Boehringer Ingelheim, Brasil), um antagonista muscarínico não-seletivo com efeito anticolinérgico. Por possuir algumas estruturas polares, a baixa lipossolubilidade do composto não permite que ele atravesse a barreira hematoencefálica. Portanto, ele foi utilizado no protocolo para reduzir efeitos adversos periféricos da pilocarpina, como tremor, salivação, cromodacriorreia e diarreia.

Depois de 20 minutos, foi induzido o *status epilepticus* pela administração intraperitoneal de cloridrato de pilocarpina (150 mg/kg, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) solubilizado em solução salina (NaCl, 150 mM). A pilocarpina é um agonista colinérgico que causa hiperativação de receptores muscarínicos do tipo M1, que são o subtipo mais expresso na formação hipocampal. Isso leva à subsequente ativação de neurônios glutamatérgicos excitatórios, gerando o quadro de crises ininterruptas ou repetidas que caracterizam o *status*

epilepticus. O critério para definição do *status epilepticus* se baseou na escala refinada de Racine (Racine, 1972) elaborada por Vigier e colaboradores (2021) (figura 4), sendo estabelecido o início desse quadro com três ocorrências de manifestações comportamentais de crises classe 3 – no caso, extensão da cauda com tremor corporal.

| Classe | Comportamento patológico | |
|---|--|--|
| 1 | Imobilidade | Classe 1 |
| | Acenos com a cabeça | |
| | Prostração | |
| | Rastejamento | |
| | Ataxia/cambaleamento | Classe 2 |
| 2 | Tremores da cabeça | .) |
| | Arqueamento da cauda | |
| | Sacodidelas de cachorro molhado | Classes 3/4 |
| 3 | Extensão da cauda | a n |
| Ŭ | Tremor corporal | |
| 4 | Exorbitismo | |
| - | Mioclonia parcial | |
| | Mobilidade intensificada | Classe 5 |
| 5 | Crises tônico-clônicas generalizadas | |
| (SE normal) | Tremor corporal intenso | |
| | Automatismos oroalimentares | the man |
| | Perda de controle dos membros anteriores | Classe 6 |
| 6 | Quedas repetitivas | |
| (SE severo) | Perda de equilíbrio | A MA MAN AND |
| | Tremor corporal extremo | |
| 7 (SE extremamente severo) | Perda de controle dos membros posteriores | 2 by |
| | Corridas e pulos repetitivos e intensos | Classe 7 |
| | Rolamento lateral | A AND AND AND AND AND AND AND AND AND AN |
| | Extensão tônica geral e colapso cardiorrespiratório | 12 • 11 · 11 |

Figura 4. Escala refinada de Racine. Modificado de Vigier e colaboradores (2021).

Os animais foram mantidos nesse estado por 180 minutos, durante os quais estiveram sob constante monitoramento e observação. Durante essa etapa, os animais apresentam sinais comportamentais progressivamente severos, mas também oscilam entre diferentes estágios do *status epilepticus*. No início, os camundongos apresentam imobilidade, prostração, ataxia, arqueamento da cauda, movimentos orofaciais, salivação, exoftalmia e contrações das vibrissas. Além disso, mesmo com a injeção de escopolamina, eles ainda podem manifestar efeitos colinérgicos periféricos, como diarreia, salivação e tremores. Posteriormente, são observadas crises epilépticas motoras límbicas, caracterizadas por salivação intensa, clonias das patas, perda de controle dos membros e desequilíbrio. Em estágios mais severos, os animais podem ter crises tônico-clônicas generalizadas, tremores corporais extremos e, em última instância, extensão tônica geral do corpo seguida de colapso cardiorrespiratório. Uma grande porcentagem dos animais chega a estágios severos do *status epilepticus*, pela gravidade das crises geradas pela pilocarpina.

Imediatamente após ao período em *status epilepticus*, os camundongos foram resgatados por anestesia inalatória com isoflurano, sendo que cada animal foi submetido a duas rodadas de anestesia com duração de quatro minutos cada uma, taxa de isoflurano a 1% e oxigênio a 1,5 L/min. Entre as rodadas, houve um breve intervalo para recuperação dos animais. Em trabalhos anteriores do grupo, o resgate era realizado com repetidas rodadas de anestesia em uma taxa de 4% (Marques, 2024). Nesse contexto, convém ressaltar que o protocolo de resgate utilizado no presente estudo foi refinado a partir do trabalho de Marques (2024), que desenvolveu esse procedimento de forma pioneira com o objetivo de reduzir a taxa de mortalidade dos animais. Depois do resgate, os animais foram hidratados com 250 µL de soro glicosado a 5% por injeção subcutânea, além de cuidadosamente monitorados durante as horas seguintes. Nos três dias posteriores ao insulto inicial, os camundongos receberam suplementação com Glicopan® Pet, uma solução rica em glicose, vitamina e sais minerais que foi administrada oralmente uma vez ao dia.

Nos dias 2 a 8 do protocolo, os camundongos foram tratados diariamente de acordo com o grupo experimental (tabela 1). O grupo sadio não recebeu nenhum tipo de tratamento. O grupo epiléptico (controle negativo) recebeu solução veículo, que consiste em 80% de solução salina a 150 mM e 20% de dimetilsulfóxido. O grupo controle positivo foi tratado com diazepam (Compaz®) na dose de 4 mg/kg, enquanto que os grupos de tratamento receberam Neurovespina nas doses de 8, 4 ou 2,5 mg/kg. Cabe ressaltar que as doses foram escolhidas com base no trabalho de Carneiro (2017), que já havia investigado o efeito neuroprotetor da

Neurovespina em um protocolo experimental semelhante. A Neurovespina foi diluída na solução veículo supramencionada, sendo relevante ressaltar que o grau de pureza e a estabilidade do peptídeo foram avaliadas periodicamente por meio de espectrometria de massas (dados não mostrados). O tratamento consistiu em injeções subcutâneas administradas duas vezes por dia, uma pela manhã (9h) e uma pela tarde (15h).

| Grupo Experimental | n | Insulto | Tratamento |
|--------------------------|-----|---------|--------------------------|
| Sadio | 4-5 | Não | Nenhum |
| Epiléptico | 5-7 | Sim | Solução veículo |
| Diazepam | 5-7 | Sim | Diazepam (4 mg/kg) |
| Neurovespina (2,5 mg/kg) | 5-6 | Sim | Neurovespina (2,5 mg/kg) |
| Neurovespina (4 mg/kg) | 4 | Sim | Neurovespina (4 mg/kg) |
| Neurovespina (8 mg/kg) | 4 | Sim | Neurovespina (8 mg/kg) |

Tabela 1. Grupos experimentais, intervenções e tratamentos realizados no projeto.

Durante esse período, foram monitoradas diariamente a massa corporal e escores de letargia e agressividade dos animais. Vale ressaltar que, para esses escores, o comportamento dos animais poderia ser pontuado com 0, 1 ou 2. Para a avaliação de letargia, o camundongo poderia receber pontuação 0 (animal responsivo a estímulos, com movimentação, comportamento e consumo de água e ração normais), 1 (animal levemente letárgico, com resposta moderada a estímulos) ou 2 (animal letárgico e irresponsivo a estímulos, com comportamento atípico, ataxia e cessação do consumo de água e ração). Em conjunto com a avaliação de outros sinais clínicos, como peso corporal, aspecto da pelagem e expressões faciais, o ponto final humanitário poderia ser aplicado aos animais com escore 2 nesse parâmetro. A agressividade e a apatia foram pontuadas com 0 (animais com interação social normal e de fácil manuseio), 1 (ocorrência de brigas e maior estresse durante o manuseio) ou 2 (brigas constantes em conjunto com grande dificuldade de manuseio e presença de feridas em animais da caixa). Para camundongos muito agressivos, a intervenção – que não foi necessária no presente projeto – seria a separação do animal do restante do grupo com uma barreira de acrílico transparente, mas mantendo-o na mesma caixa. Essa escala foi desenvolvida no decorrer do presente projeto.

3.4 Processamento Histológico dos Encéfalos

No nono dia de protocolo, os sujeitos experimentais foram eutanasiados por overdose de tiopental sódico administrado via intraperitoneal (120 mg/kg, Cristália, Brasil). Então, cada animal foi submetido a uma perfusão transcardíaca, um método de lavagem e fixação do tecido encefálico que possibilita a difusão de uma solução fixadora através da aorta ascendente. Depois da overdose, foram avaliados os reflexos interdigital, palpebral e corneal. Uma vez constatada a ausência total de reflexos, os animais foram fixados em uma mesa de perfusão para exposição cirúrgica da cavidade torácica. Em cada sujeito, as artérias abdominais foram clampeadas para direcionar a perfusão para a parte superior do corpo e foi feito um corte no átrio direito para permitir o extravasamento de sangue e líquidos do sistema circulatório. Em seguida, posicionou-se uma agulha no ventrículo esquerdo e foi feita a perfusão com influxo de 10 mL de tampão fosfato-salino (PBS) e, em seguida, 10 mL de formaldeído a 4%. Finalmente, os encéfalos foram retirados e armazenados em solução de formaldeído 10% por 24 horas, sendo transferidos em seguida para uma solução de sacarose a 30% por 48 horas, visando a fixação e a crioproteção do tecido, respectivamente.

Depois desse período, os encéfalos foram congelados com isopentano, pela técnica de *snap-freezing*. O isopentano, também chamado de 2-metilbutano, é um alcano de cadeia ramificada com ponto de fusão de -160 °C, o que o torna ideal para o congelamento rápido e uniforme de tecidos. Para isso, os encéfalos foram imersos em isopentano a -80 °C por 20 segundos, sendo armazenados também a -80 °C para posterior seccionamento.

Para a análise histológica, foram realizados cortes coronais da região da formação hipocampal, com espessura de 30 μ m – as coordenadas de referência foram de -1,34 mm a - 2,30 mm a partir de Bregma (Paxinos; Watson, 2004). As fatias encefálicas foram obtidas com a utilização de um criomicrótomo (MC4000, Histo-Line, Itália) regulado em uma faixa de temperatura de -22 a -24 °C. Em seguida, as fatias foram armazenadas a 4 °C em uma solução anticongelante que previne a formação de cristais de gelo nos tecidos, sendo composta por água destilada, etilenoglicol e glicerina. Os protocolos de processamento histológico estão representados na figura 5.



Figura 5. Representação esquemática das etapas de processamento histológico, desde a retirada dos encéfalos até o armazenamento das secções encefálicas em solução anticongelante. Figura elaborada no BioRender.

3.5 Imunofluorescência

A imunofluorescência é uma técnica que permite a visualização e a localização de proteínas de interesse por meio de marcação com anticorpos específicos para as moléculasalvo. Neste projeto, foi empregada a imunofluorescência indireta, método em que se detecta um antígeno por meio de um anticorpo secundário conjugado a um fluoróforo que, por sua vez, se liga a um anticorpo primário específico ao antígeno de interesse (figura 6).



Figura 6. Etapas da imunofluorescência indireta. Figura elaborada no BioRender.

Aqui, foram realizadas quatro diferentes marcações de imunofluorescência, para Iba-1, GFAP, IL-1 β e claudina-5, além de um método de coloração de Nissl fluorescente associado a uma dessas marcações. Ainda que tenha sido utilizada a técnica de *free-floating* para todas as marcações, cada protocolo possui suas próprias particularidades, elencadas nas subseções seguintes e no quadro 1. Ressalta-se que todos os protocolos foram padronizados neste projeto.

| Etapas | | Iba-1 | GFAP | IL-1β | Claudina-5 |
|--|------------------------------|---|---|---|---|
| Antigen Retrieval | | Sim | Não | Não | Não |
| Permeabilização e Bloqueio | | Solução bloqueadora + Triton 0,8% | Solução bloqueadora + Triton 0,8% | Solução bloqueadora + Triton 0,8% | Solução bloqueadora + Triton 0,5% |
| Incubação com | Tempo de incubação | 24 horas | 48 horas | 48 horas | 48 horas |
| anticorpo primário | Concentração do anticorpo | 1:100 | 1:250 | 1:100 | 1:250 |
| Incubação com | Tempo de incubação | 2 horas | 2 horas | 2 horas | 2 horas |
| anticorpo secundário | Concentração do anticorpo | 1:400 | 1:400 | 1:400 | 1:400 |
| Incubação com corante de Nissl fluorescente | | Não | Sim | Não | Não |

Quadro 1. Diferenças entre protocolos de imunofluorescência para as marcações de Iba-1, GFAP, IL-1β e claudina-5.

3.5.1 Iba-1

O Iba-1 é a molécula adaptadora de ligação ao cálcio ionizada 1, sendo uma proteína citoplasmática expressa em células da linhagem monocítica. No tecido nervoso, ela é encontrada em células microgliais, estando relacionada à reorganização do citoesqueleto e ao processo de fagocitose.

Para a marcação do Iba-1, as fatias hipocampais foram retiradas da solução anticongelante e lavadas com PBS duas vezes por 10 minutos cada. Então, de acordo com Jiao e colaboradores (1999), foi feita uma lavagem com citrato de sódio a 10 mM e pH 6.0 em uma temperatura de 80 °C por 20 minutos. Essa lavagem consiste no processo de *antigen retrieval*,

um protocolo para recuperação de antígenos que foram mascarados pela fixação com formaldeído. O objetivo dessa etapa é desfazer ligações cruzadas entre o antígeno de interesse e outras proteínas.

Depois, foram realizadas três lavagens de cinco minutos com PBS, seguida de uma lavagem de duas horas em solução bloqueadora (PBS, BSA 1%, leite desnatado 10%, glicina 0,3 M e Tween 20) com 0,8% de Triton X-100. Essa etapa consiste na permeabilização e bloqueio. A permeabilização das membranas celulares é realizada pelo Triton X-100, um surfactante que cria poros nas membranas e permite que o anticorpo consiga acessar proteínas intracelulares e também proteínas transmembrana cujos epítopos estejam na região citoplasmática. O bloqueio, por sua vez, é necessário para evitar ligações inespecíficas dos anticorpos a quaisquer outras proteínas que não sejam de interesse.

Em seguida, as fatias foram lavadas com PBS três vezes por cinco minutos cada e incubadas com o anticorpo primário anti-Iba-1 produzido em coelho (PA527436, Thermo Fisher Scientific) diluído em solução bloqueadora numa concentração de 1:100. A incubação foi realizada a 4 °C por 24 horas sob agitação constante. Após a incubação com anticorpo primário, foram realizadas três lavagens de cinco minutos com PBS e os cortes foram incubados com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho produzido em cabra e conjugado com o fluoróforo Alexa Fluor™ 488 (A11008, Thermo Fisher Scientific), diluído em uma solução de BSA 1% em PBS. A incubação se deu a temperatura ambiente, sob agitação suave e no escuro - ressaltando-se que, a partir dessa etapa, todo o restante do protocolo foi realizado no escuro, haja vista a fotossensibilidade dos fluoróforos. Cabe salientar que foram realizados controles sem incubação com anticorpo primário, para verificação de possíveis ligações inespecíficas do anticorpo secundário. Posteriormente, foram realizadas três lavagens de 10 minutos com PBS e os cortes foram posicionados em lâminas de vidro gelatinizadas. Após secagem, as fatias foram incubadas por cinco minutos com o meio de montagem Fluoromount-G™ associado a 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Sigma-Aldrich), um corante fluorescente azul que se liga seletivamente ao DNA, marcando núcleos celulares. Por fim, as lâminas foram vedadas com lamínulas e esmalte incolor e armazenadas no escuro a 4 °C para posterior análise microscópica. Em cada lâmina, foram posicionados três cortes do mesmo animal.

3.5.2 GFAP e Coloração de Nissl

O GFAP é a proteína glial fibrilar ácida, uma proteína da classe dos filamentos intermediários altamente expressa por astrócitos. A principal função dessa proteína é fornecer suporte estrutural e estabilidade. Entretanto, em situações patológicas, a expressão de GFAP pode aumentar, tornando-o um marcador útil para avaliação da astrogliose reativa. Neste trabalho, foi realizada uma marcação conjugada, associando a imunofluorescência para GFAP com a coloração de Nissl fluorescente para visualização de neurônios.

Para a marcação do GFAP, as fatias hipocampais foram retiradas da solução anticongelante e lavadas com PBS duas vezes por 10 minutos cada. Então, foi feita uma lavagem de duas horas em solução bloqueadora com 0,8% de Triton X-100, para permeabilização e bloqueio. Em seguida, as fatias foram lavadas com PBS três vezes por cinco minutos cada e incubadas com o anticorpo primário anti-GFAP produzido em coelho (50-9892-82, Thermo Fisher Scientific) diluído em solução bloqueadora numa concentração de 1:250. A incubação foi realizada a 4 °C por 48 horas sob agitação constante. Após a incubação com anticorpo primário anti-IgG de coelho produzido em cabra e conjugado com o fluoróforo Alexa Fluor™ 488 (A11008, Thermo Fisher Scientific), diluído em uma solução de BSA 1% em PBS. A incubação se deu a temperatura ambiente, sob agitação suave e no escuro. Ressalta-se que, a partir dessa etapa, todo o restante do protocolo foi realizado no escuro. Cabe salientar que foram realizados controles sem incubação com anticorpo primário.

As fatias foram então lavadas com PBS três vezes por cinco minutos cada e incubadas com o corante NeurotraceTM vermelho diluído em PBS em uma concentração de 1:100 por uma hora sob agitação. Esse corante permite a visualização de neurônios, ao se ligar com alta seletividade aos corpúsculos de Nissl – estruturas compostas por RNA ribossomal associado ao retículo endoplasmático rugoso. Posteriormente, foram realizadas três lavagens de 10 minutos com PBS e os cortes foram posicionados em lâminas de vidro gelatinizadas. Após secagem, as fatias foram incubadas por cinco minutos com o meio de montagem Fluoromount-GTM associado a DAPI (Sigma-Aldrich). Por fim, as lâminas foram vedadas com lamínulas e esmalte incolor e armazenadas no escuro a 4 °C para posterior análise microscópica. Em cada lâmina, foram posicionados três cortes do mesmo animal.

3.5.3 IL-1β

A IL-1 β , ou interleucina-1 β , é uma citocina pró-inflamatória vital no sistema imunológico, desempenhando um papel essencial na resposta de inflamação. Para marcação de IL-1 β , as fatias hipocampais foram retiradas da solução anticongelante e lavadas com PBS duas vezes por 10 minutos cada. Então, foi feita uma lavagem de duas horas em solução bloqueadora com 0,8% de Triton X-100, para permeabilização e bloqueio.

Em seguida, as fatias foram lavadas com PBS três vezes por cinco minutos cada e incubadas com o anticorpo primário anti-IL-1β produzido em coelho (P420B, Thermo Fisher Scientific) diluído em solução bloqueadora numa concentração de 1:250. A incubação foi realizada a 4 °C por 48 horas sob agitação constante. Após a incubação com anticorpo primário, foram realizadas três lavagens de cinco minutos com PBS e os cortes foram incubados com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho produzido em cabra e conjugado com o fluoróforo Alexa Fluor™ 488 (A11008, Thermo Fisher Scientific), diluído em uma solução de BSA 1% em PBS. A incubação se deu a temperatura ambiente, sob agitação suave e no escuro. Ressaltase que, a partir dessa etapa, todo o restante do protocolo foi realizado no escuro. Cabe salientar que foram realizados controles sem incubação com anticorpo primário.

Posteriormente, foram realizadas três lavagens de 10 minutos com PBS e os cortes foram posicionados em lâminas de vidro gelatinizadas. Após secagem, as fatias foram incubadas por cinco minutos com o meio de montagem Fluoromount-G[™] associado a DAPI (Sigma-Aldrich). Por fim, as lâminas foram vedadas com lamínulas e esmalte incolor e armazenadas no escuro a 4 °C para posterior análise microscópica. Cada lâmina continha três cortes do mesmo animal.

3.5.4 Claudina-5

A claudina-5, como já mencionado, é uma das principais proteínas de junção de oclusão das células endoteliais da barreira hematoencefálica. Para a marcação da claudina-5, as fatias hipocampais foram retiradas da solução anticongelante e lavadas com PBS duas vezes por 10 minutos cada. Então, foi feita uma lavagem de duas horas em solução bloqueadora com 0,5% de Triton X-100, para permeabilização e bloqueio.

Em seguida, as fatias foram lavadas com PBS três vezes por cinco minutos cada e incubadas com o anticorpo primário anti-claudina-5 produzido em coelho (341600, Thermo Fisher Scientific) diluído em solução bloqueadora numa concentração de 1:100. A incubação

foi realizada a 4 °C por 48 horas sob agitação constante. Após a incubação com anticorpo primário, foram realizadas três lavagens de cinco minutos com PBS e os cortes foram incubados com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho produzido em cabra e conjugado com o fluoróforo Alexa Fluor™ 488 (A11008, Thermo Fisher Scientific), diluído em uma solução de BSA 1% em PBS. A incubação se deu a temperatura ambiente, sob agitação suave e no escuro. Ressalta-se que, a partir dessa etapa, todo o restante do protocolo foi realizado no escuro. Cabe salientar que foram realizados controles sem incubação com anticorpo primário.

Posteriormente, foram realizadas três lavagens de 10 minutos com PBS e os cortes foram posicionados em lâminas de vidro gelatinizadas. Após secagem, as fatias foram incubadas por cinco minutos com o meio de montagem Fluoromount-G[™] associado a DAPI (Sigma-Aldrich). Por fim, as lâminas foram vedadas com lamínulas e esmalte incolor e armazenadas no escuro a 4 °C para posterior análise microscópica. Cada lâmina continha três cortes do mesmo animal.

3.6 Análises Microscópicas e Coleta de Dados

Uma vez realizadas as devidas marcações e montagens das lâminas, foi utilizado um microscópio de epifluorescência (DM 2000, Leica, Alemanha) para visualização e registro das regiões de interesse. Os filtros do microscópio permitiram a captação dos sinais fluorescentes emitidos pelos fluoróforos utilizados nas marcações.

Para visualização do Alexa Fluor[™] 488 (pico de excitação em 499 nm e pico de emissão em 520 nm), foi utilizado o filtro L5, que excita em BP 480/40 e filtra emissão em BP 527/30 (figura 7). Para visualização do Neurotrace[™] (pico de excitação em 530 nm e pico de emissão em 615 nm), foi utilizado o filtro N 2.1, que excita em BP 515-560 e filtra emissão em LP 590 (figura 8). Para visualização do DAPI (pico de excitação em 350 nm e pico de emissão em 470 nm), foi utilizado o filtro A, que excita em BP 340-380 e filtra emissão em LP 425 (figura 9).

Todas as imagens foram obtidas com a câmera digital acoplada ao microscópio, sendo que, em cada marcação, parâmetros de exposição, ganho, saturação, gamma e histograma não foram alterados ao longo da aquisição das fotomicrografias. Destaca-se que, por vezes, foi necessário utilizar uma faixa de exposição para garantir a viabilidade das análises. Posteriormente, o software de código aberto ImageJ (2.16.0) foi utilizado para a análise das fotos e coleta de dados.



Figura 7. Espectro de fluorescência do Alexa FluorTM 488 em conjunto com o filtro L5. Figura elaborada na base de dados FPbase (Lambert, 2019).



Figura 8. Espectro de fluorescência do Neurotrace[™] vermelho em conjunto com o filtro N 2.1. Figura elaborada na base de dados FPbase (Lambert, 2019).



Figura 9. Espectro de fluorescência do DAPI em conjunto com o filtro A. Figura elaborada na base de dados FPbase (Lambert, 2019).

3.6.1 Iba-1

Na marcação com Iba-1, foram obtidas fotomicrografias em aumento de 400x em 12 diferentes subregiões de cada lado da formação hipocampal, conforme figura 10A. Foram quatro subregiões na região do giro denteado, três em CA3, três em CA1 e duas na camada molecular. Em cada uma das 2.736 fotomicrografias obtidas, foi realizada uma quantificação cega de micróglias, por contagem manual de células. Para cada subregião, foi realizada a mediana do número de células microgliais quantificadas nos três cortes de uma lâmina (figura 10B).



Figura 10. A) Subregiões de interesse fotografadas em aumento de 400x nas lâminas marcadas com Iba-1. Foram obtidas quatro fotomicrografias na região do giro denteado (GD), três em CA3, três em CA1 e duas nas camadas moleculares do hipocampo (mol). B) Tabela de análise de dados, demonstrando, para cada subregião, a mediana do número de micróglias dos três cortes de uma lâmina. Figura elaborada no BioRender.

3.6.2 GFAP e Coloração de Nissl

Na marcação com GFAP e coloração de Nissl, foram obtidas fotomicrografias em aumento de 200x em três diferentes regiões de interesse de cada lado da formação hipocampal (giro denteado, CA3 e CA1), conforme figura 11.



Figura 11. Regiões de interesse fotografadas em aumento de 200x nas lâminas marcadas com GFAP e Nissl. Foram obtidas uma fotomicrografia na região do giro denteado (GD), uma em CA3 e uma em CA1. Figura elaborada em BioRender.com.

Nas fotomicrografias obtidas, foi realizada uma análise de densidade óptica. Para a análise da marcação com GFAP (558 fotomicrografias), foi medido o nível médio de cinza em toda a área da fotografia (figura 12A). Para cada região de interesse, foi realizada a média da densidade óptica dos três cortes de uma lâmina (figura 12B).



Figura 12. A) Áreas de seleção em cada região de interesse analisada na marcação com GFAP: giro denteado (GD), CA3 e CA1. **B)** Tabela de análise de dados, demonstrando, para cada região de interesse, a média da densidade óptica dos três cortes de uma lâmina. Figura elaborada no BioRender.

Para análise da coloração de Nissl, foi medido o nível médio de cinza em diferentes áreas de seleção em cada região das 684 fotomicrografias obtidas (figura 13A). No giro denteado, foram analisadas três seleções com área de 0,160 pixels quadrados. Em CA3, foram analisadas três seleções com área de 0,250 pixels quadrados. Em CA1, foram analisadas três seleções com área de 0,090 pixels quadrados. Para cada seleção feita nas diferentes áreas de interesse, foi realizada a média da densidade óptica dos três cortes de uma lâmina (figura 13B).



Figura 13. A) Áreas de seleção em cada região de interesse analisada na coloração de Nissl: giro denteado (GD), CA3 e CA1. **B)** Tabela de análise de dados, demonstrando, para cada área seleção nas diferentes regiões de interesse, a média da densidade óptica dos três cortes de uma lâmina. Figura elaborada no BioRender.

3.6.3 IL-1β

Na marcação com IL-1β, foram obtidas fotomicrografias em aumento de 200x em três diferentes regiões de cada lado da formação hipocampal (giro denteado, CA3 e CA1), conforme figura 11. Nas 558 fotomicrografias obtidas, foi realizada uma análise de densidade óptica, sendo que foi medido o nível médio de cinza em diferentes áreas de seleção em cada região, assim como na análise da coloração de Nissl (figura 13A). No giro denteado, foram analisadas três seleções com área de 0,160 pixels quadrados. Em CA3, foram analisadas três seleções com área de 0,090 pixels quadrados. Em CA1, foram analisadas três seleções com área de 0,090 pixels quadrados. Para cada seleção feita nas diferentes áreas de interesse, foi realizada a média da densidade óptica dos três cortes de uma lâmina (figura 13B).

3.6.4 Claudina-5

Na marcação com claudina-5, foram obtidas fotomicrografias em aumento de 200x em três diferentes regiões de cada lado da formação hipocampal, compreendendo toda a camada molecular do hipocampo, conforme figura 14A. Nas 558 fotomicrografias obtidas, foi realizada uma análise de densidade óptica, sendo medido o nível médio de cinza em uma seleção de 9 pixels quadrados em cada uma das fotografias (figura 14B). Para cada lado da formação hipocampal em cada corte analisado, foi realizada a média das três medições (figura 14C).



Figura 14. A) Regiões de interesse fotografadas em aumento de 200x nas lâminas marcadas com claudina-5. Foram obtidas três micrografias em diferentes localidades das camadas moleculares do hipocampo (mol). B) Áreas de seleção nas regiões de interesse das camadas moleculares do hipocampo (mol 1, mol 2 e mol 3). C) Tabela de análise de dados, demonstrando, para cada lado de cada corte, a média da densidade óptica das três diferentes regiões de interesse. Figura elaborada no BioRender.

3.7 Análises Estatísticas

Para o cálculo do tamanho amostral, foi utilizada a seguinte fórmula, recomendada pela CEUA da UnB:

$$n = 1 + \frac{2(DP)^2}{\mu^2} \times (Z\alpha + Z\beta)^2$$

Onde:

n = tamanho da amostra por grupo experimental;

DP = desvio padrão aceitável;

 μ = diferença mínima significativa;

 $Z\alpha$ = valor Z da curva normal padrão para o nível de significância α ;

 $Z\beta$ = valor X da curva normal padrão unilateral para β , sendo β = 1 – poder do teste.

Para este projeto, considerou-se um desvio padrão aceitável (DP) máximo de 0,27 (27%), tendo em vista que os camundongos não são isogênicos. A diferença mínima significativa (μ) esperada entre os grupos é de 0,5 (50%). Os valores de Z são encontrados em livros de estatística de acordo com o nível de significância α , para Z α , e com o poder do teste 1– β , para Z β . Considerando que o nível de significância α é de 0,05, o valor de Z α é de 1,96. Para experimentos na área da saúde, o poder do teste é usualmente de 90%, para o qual o valor de Z β se estabelece como 1,282.

Com isso, obtém-se que:

$$n = 1 + \frac{2(0,27)^2}{0,5^2} \times (1,96 + 1,282)^2$$

$$n = 1 + \frac{0,1458}{0,25} \times (3,242)^2$$

$$n = 1 + 0,5832 \times 10,510564$$

$$n = 7,13$$

O resultado é um número de 7,13 animais. Arredondando-se para o próximo número inteiro, foi necessário um número amostral de 8 animais por grupo, parâmetro que variou nos diferentes grupos experimentais e marcações pela alta mortalidade de animais ao longo dos protocolos de indução de *status epilepticus* e pela perda de material encefálico nas primeiras rodadas experimentais das marcações de imunofluorescência (tabela 2).

| | Iba-1 | GFAP | Nissl | Claudina-5 | IL-1β |
|--------------|-------|------|-------|------------|-------|
| Sadio | 5 | 4 | 5 | 4 | 4 |
| Epiléptico | 7 | 5 | 7 | 5 | 5 |
| Diazepam | 7 | 5 | 7 | 5 | 5 |
| Neurovespina | 6 | F | C | 5 | 5 |
| (2,5 mg/kg) | 0 | 5 | 0 | 5 | |
| Neurovespina | 4 | 4 | Л | 4 | 4 |
| (4 mg/kg) | 4 | | 4 | | |
| Neurovespina | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| (8 mg/kg) | 4 | | 4 | | 4 |
| Total | 38 | 31 | 38 | 31 | 31 |

 Tabela 2. Número de encéfalos obtidos em diferentes grupos experimentais e marcações realizadas no projeto.

As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism[©] 7.0 (Califórnia, EUA). A normalidade dos dados foi primeiramente verificada por meio dos testes de D'Agostino-Pearson e Shapiro-Wilk. Para conjuntos de dados não paramétricos, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn ou do teste de Benjamini, Krieger e Yekutieli para comparações múltiplas. Para conjuntos de dados paramétricos, foi empregada a ANOVA de uma via e o teste de Tukey para comparações múltiplas. Foram considerados como estatisticamente significativos valores de p < 0,05. Para a construção de uma curva de sobrevivência, foi utilizado o método de Kaplan-Meier, também no software GraphPad Prism. Para a análise da massa corporal dos animais, que foi medida diariamente, foi realizado um cálculo da variação percentual da massa, por meio da seguinte fórmula:

$$\Delta(\%) = \frac{Massa \text{ no dia } 1 - Massa \text{ no dia } 9}{Massa \text{ no dia } 1} \times 100$$

4 Resultados

4.1 Modelo Animal de Epilepsia do Lobo Temporal Induzido por Pilocarpina

No que diz respeito à indução do *status epilepticus* por pilocarpina no modelo de ELT, foram requeridas cinco diferentes rodadas experimentais. Nesse contexto, 70 camundongos foram submetidos ao modelo, sendo que 26 (37,14%) morreram no insulto inicial – 22 em decorrência do *status epilepticus* (31,43%) e 4 durante ou imediatamente após o resgate por anestesia inalatória com isoflurano (5,71%). Em dias posteriores do protocolo, 14 animais morreram (20%). No total, foram contabilizadas 40 mortes, o que resulta em uma taxa de mortalidade de 57,14% em todo o projeto. Dos 30 animais que sobreviveram, 8 foram alocados ao grupo epiléptico, 7 ao grupo diazepam, 6 ao grupo Neurovespina (2,5 mg/kg), 5 ao grupo Neurovespina (4 mg/kg) e 4 ao grupo Neurovespina (8 mg/kg), sendo que houve perda experimental do material encefálico de dois animais – um do grupo epiléptico e um do grupo Neurovespina (4 mg/kg). A alocação dos camundongos em diferentes grupos experimentais foi realizada de maneira aleatória.

A figura 15 mostra uma curva de sobrevivência dos animais durante os experimentos. A curva demonstra uma grande quantidade de mortes nos dois primeiros dias do protocolo experimental, com uma perda pontual no terceiro dia, sendo que todos os animais foram eutanasiados no nono dia. Ressalta-se que os animais foram realocados aos diferentes grupos experimentais somente um dia depois do insulto inicial. Com isso, sabe-se que apenas três das 40 mortes foram de sujeitos que já haviam recebido algum tipo de tratamento. Dois animais que morreram no segundo dia haviam recebido Neurovespina, um na dose de 8 mg/kg e outro na dose de 2,5 mg/kg, enquanto um animal que morreu no terceiro dia havia recebido Neurovespina na dose de 8 mg/kg. O quadro 2 mostra o número bruto de mortes nos diferentes dias de protocolo em cada rodada experimental.



Figura 15. Curva de sobrevivência dos camundongos submetidos ao modelo de epilepsia do lobo temporal induzido por pilocarpina neste projeto. Ressalta-se que o experimento foi finalizado no dia 9 do protocolo. O gráfico foi obtido através do método de Kaplan-Meier.

Quadro 2. Número de óbitos nos diferentes dias de protocolo nas cinco rodadas experimentais (R1, R2, R3, R4 e R5), excluindo-se mortes por eutanásia no dia 9 de cada experimento.

| | | R 1 | R2 | R3 | R4 | R5 | Total |
|------------|------------------------------|------------|----|----|----|----|-------|
| Dia 1 | Durante o status epilepticus | 1 | 9 | 2 | 1 | 9 | 26 |
| | Durante ou após o resgate | 0 | 3 | 0 | 0 | 1 | |
| Dia 2 | | 10 | 1 | 0 | 2 | 0 | 13 |
| Dia 3 | | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| Dias 4 a 8 | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Total | | 11 | 13 | 2 | 3 | 11 | 40 |

Durante os nove dias de protocolo experimental, os animais foram monitorados diariamente, medindo-se a massa corporal e classificando-se o comportamento dos sujeitos com base em escores de letargia e agressividade.

Houveram variações percentuais na massa corporal dos animais entre o primeiro e o último dia de protocolo, mas tais alterações não foram estatisticamente diferentes entre os grupos de tratamento. Destaca-se a ausência de variação de massa corporal nos grupos sadio e Neurovespina (4 mg/kg), além de aumento de massa nos grupos epiléptico e diazepam e redução nos grupos tratados com Neurovespina nas doses de 8 e 2,5 mg/kg. Como a análise de

normalidade através dos testes de D'Agostino-Pearson e Shapiro-Wilk atestou a natureza não paramétrica dos dados, a investigação da variação da massa corporal foi realizada por meio do teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn para comparações múltiplas. O gráfico da variação percentual da massa corporal dos sujeitos é apresentado na figura 16.



Figura 16. Variação da massa corporal, em porcentagem, dos sujeitos experimentais ao longo dos protocolos. No cálculo da variação percentual, foram consideradas as massas do primeiro e do último dia. Foi realizado um teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn para comparações múltiplas, considerando-se significância estatística para p < 0,05. Os valores estão representados em mediana \pm IC 95%.

Na análise dos escores de letargia e agressividade, foram observadas alterações pontuais. Ao todo, foram registrados 379 registros para cada escore. Para o escore de letargia, houve apenas duas ocorrências de pontuação 1, ambas registradas no segundo dia da primeira rodada experimental em animais tratados com Neurovespina – um na dose de 8 mg/kg e outro na dose de 2,5 mg/kg. Os dois animais vieram a óbito no dia seguinte. Quanto ao escore de agressividade, 19 ocorrências de pontuação 1 foram documentadas. Uma delas ocorreu no segundo dia da primeira rodada experimental, em um animal do grupo Neurovespina (4 mg/kg). Outras duas foram registradas em um animal epiléptico, nos dias 2 e 3 da segunda rodada experimental. Na quinta e última rodada, houve 16 registros de agressividade em pontuação 1, sendo 14 deles distribuídos igualmente entre dois animais do grupo diazepam, nos dias 3 a 9 do protocolo. Por fim, mais duas ocorrências foram registradas no segundo dia, uma em um outro sujeito tratado com diazepam e mais uma no grupo Neurovespina (2,5 mg/kg). Não foram

registrados escores 2 em nenhuma das categorias comportamentais avaliadas. De modo geral, a maioria dos animais apresentou normalidade ao longo dos dias em relação a responsividade a estímulos, movimentação, comportamento, consumo de água e ração, interação social e resposta ao manuseio. O quadro 3 apresenta o número de ocorrências das diferentes pontuações dos escores de letargia e agressividade.

Quadro 3. Número de ocorrências das diferentes pontuações dos escores de letargia e agressividade.

| Escore | Pontuação | Número de ocorrências | |
|---------------|-----------|-----------------------|--|
| | 0 | 377 | |
| Letargia | 1 | 2 | |
| | 2 | 0 | |
| | 0 | 360 | |
| Agressividade | 1 | 19 | |
| | 2 | 0 | |

4.2 Efeito da Neurovespina na proteção contra a morte de neurônios piramidais na formação hipocampal

Após o protocolo experimental, constatou-se que o tratamento com Neurovespina foi capaz de atenuar de maneira dose-dependente a morte de neurônios induzida no modelo de ELT. Foi possível, neste trabalho, reproduzir a esclerose hipocampal, tendo em vista a maior taxa de morte neuronal em animais epilépticos em relação aos sadios. Com isso, observa-se que a administração de Neurovespina exerceu efeito neuroprotetor, principalmente nas doses de 4 e 8 mg/kg. Por outro lado, o tratamento com diazepam não mostrou proteger os neurônios piramidais contra a degeneração.

Na análise da densidade óptica para coloração de Nissl em toda a formação hipocampal, foram identificadas diferenças estatísticas entre os grupos analisados [H(5) = 93,65; p < 0,0001] (figura 17A). O tratamento com o peptídeo Neurovespina na dose de 4 mg/kg gerou uma redução estatisticamente significativa na morte de neurônios hipocampais, assim como na dose de 8 mg/kg (p < 0,0001). Esses grupos também demonstraram uma maior neuroproteção em relação aos tratamentos com diazepam e com Neurovespina na dose de 2,5 mg/kg (p \leq 0,0044). Ressalta-se que os grupos epiléptico e diazepam apresentaram menor densidade de neurônios em relação ao grupo sadio (p < 0,0001).

Também foram analisadas as regiões da formação hipocampal de forma separada, sendo encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos no giro denteado [H(5) = 27,25; p < 0,0001], em CA3 [H(5) = 66,08; p < 0,0001] e em CA1 [F(5, 192) = 11,04; p < 0,0001]. Primeiramente, foi testada a normalidade dos conjuntos de dados através do teste de D'Agostino-Pearson, no qual apenas os dados referentes à região CA1 apresentaram distribuição normal. Para essa região, foi realizada a ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey para comparações múltiplas. Os demais conjuntos de dados – formação hipocampal total, giro denteado e CA3 – não demonstraram ter distribuição normal e foram analisados com o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn para comparações múltiplas.

No giro denteado (figuras 17B e 32 - p. 80 deste documento), houve diferença estatística entre os grupos diazepam e sadio (p = 0,0025), e entre o grupo diazepam e os grupos tratados com Neurovespina na dose de 4 mg/kg (p = 0,0007) e 8 mg/kg (p = 0,0068). Em CA3 (figuras 17C e 33 - p. 81 deste documento), os grupos epiléptico, diazepam e Neurovespina (2,5 mg/kg) apresentaram maior esclerose hipocampal em relação ao grupo sadio (p < 0,0001; p < 0,0001; e p = 0,0072, respectivamente). Já em CA1 (figuras 17D e 34 - p. 82 deste documento), o tratamento com Neurovespina na dose de 4 mg/kg foi estatisticamente diferente dos grupos sadio, epiléptico, diazepam e Neurovespina (2,5 mg/kg) (p = 0,0054; p < 0,0001; p < 0,0001; e p = 0,0010, respectivamente), com aumento na densidade óptica obtida pela coloração de Nissl. Nessa mesma região, o tratamento com Neurovespina na dose de 8 mg/kg demonstrou diferenças em relação aos grupos epiléptico (p = 0,0006) e diazepam (p = 0,0005), também com maior densidade neuronal.



Figura 17. Diferenças de densidade óptica para a coloração de Nissl entre os diferentes grupos de tratamento em toda a formação hipocampal (A), no giro denteado (B), em CA3 (C) e em CA1 (D) (n = 4-7). Para os gráficos A, B e C, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn, considerando-se significância estatística para p < 0,05. Os valores estão representados em mediana \pm IC 95%. Para o gráfico D, foi realizada ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey, sendo também considerado p < 0,05. Os valores estão representados em média \pm erro padrão da média. #: diferença em relação ao grupo sadio; *: diferença em relação ao grupo epiléptico; @: diferença em relação ao grupo diazepam; &: diferença em relação ao grupo Neurovespina (2,5 mg/kg).

4.3 Efeito da Neurovespina na proliferação microglial na formação hipocampal

A investigação das células microgliais permitiu observar que, no recorte temporal empregado, animais do grupo epiléptico apresentaram maior quantidade de micróglias em relação ao grupo sadio. Após os sete dias de tratamento, a dose de 4 mg/kg do peptídeo Neurovespina demonstrou atenuar a proliferação de células microgliais na formação hipocampal, retornando os níveis celulares ao mesmo patamar de animais sadios.

Na análise da proliferação de micróglias em toda a formação hipocampal, foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes grupos de tratamento analisados [H(5) = 50,69; p < 0,0001] (figura 18A). Os grupos epiléptico e diazepam demonstraram um aumento no número de micróglias em relação ao grupo sadio (p = 0,0004). Por outro lado, o tratamento com o peptídeo Neurovespina na dose de 4 mg/kg reduziu a proliferação microglial aos níveis do grupo sadio, demonstrando diferença estatística em relação aos grupos epiléptico (p = 0,0005) e diazepam (p < 0,0001). Os grupos tratados com Neurovespina nas doses de 2,5 e 8 mg/kg não reduziram a proliferação microglial, sendo estatísticamente diferentes dos grupos sadio (p < 0,0001 e p = 0,0062, respectivamente) e Neurovespina (4 mg/kg) (p < 0,0001 e p = 0,0065, respectivamente). Para todos as regiões analisadas, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn para comparações múltiplas – haja vista a natureza não paramétrica dos dados, atestada pelos testes de D'Agostino-Pearson e Shapiro-Wilk.

Na análise de cada região da formação hipocampal, também foram encontradas diferenças entre os grupos no giro denteado [H(5) = 22,94; p = 0,0003], em CA3 [H(5) = 20,34; p = 0,0011], em CA1 [H(5) = 14,75; p = 0,0115] e na camada molecular [H(5) = 17,01; p = 0,0045]. No giro denteado (figuras 18B, 19, 20, 21 e 22), foram estatisticamente diferentes do grupo sadio os grupos epiléptico (p = 0,0032), diazepam (p = 0,0450), Neurovespina (2,5 mg/kg) (p = 0,0008) e Neurovespina (8 mg/kg) (p = 0,0010). O grupo tratado com Neurovespina na dose de 4 mg/kg não demonstrou diferenças em relação ao grupos sadio (p = 0,4923). Em CA3 (figuras 18C, 23, 24 e 25), não houveram diferenças entre os grupos sadio e epiléptico, mas o tratamento com Neurovespina (4 mg/kg) reduziu a proliferação microglial em relação aos grupos epiléptico (p = 0,0397), diazepam (p = 0,0017) e Neurovespina na dose de 2,5 mg/kg (p = 0,0211). O mesmo foi observado em CA1 (figuras 18D, 26, 27 e 28), em que o teste de Benjamini, Krieger e Yekutieli revelou que o grupo Neurovespina (4 mg/kg) apresentou menor número de células microgliais quando comparado aos grupos epiléptico (p = 0,0040), diazepam (p = 0,0044) e Neurovespina na dose de 2,5 mg/kg (p = 0,0054). Por fim, na camada molecular (6



(figuras 18E, 29 e 30), o grupo tratado com Neurovespina na dose de 4 mg/kg demonstrou uma redução no número de células microgliais em relação ao grupo diazepam (p = 0,0098).

Figura 18. Diferenças no número de células microgliais marcadas por imunofluorescência para Iba-1 entre os diferentes grupos de tratamento em toda a formação hipocampal (A), no giro denteado (B), em CA3 (C), em CA1 (D) e na camada molecular (E) (n = 4-7). Para todos os conjuntos de dados, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn, considerando-se significância estatística para p < 0,05. Os valores estão representados em mediana \pm IC 95%. #: diferença em relação ao grupo sadio; *: diferença em relação ao grupo epiléptico; @: diferença em relação ao grupo diazepam; &: diferença em relação ao grupo Neurovespina (2,5 mg/kg); %: diferença em relação ao grupo Neurovespina (4 mg/kg).



Figura 19. Imagens representativas de seções coronais hipocampais na região do giro denteado (GD 1). Micróglias foram marcadas com imunofluorescência para Iba-1 (verde) e núcleos celulares foram marcados com DAPI (azul). As fotomicrografias foram obtidas com aumento total de 400x e a linha de escala representa 10 μ m.



Figura 20. Imagens representativas de seções coronais hipocampais na região do giro denteado (GD 2). Micróglias foram marcadas com imunofluorescência para Iba-1 (verde) e núcleos celulares foram marcados com DAPI (azul). As fotomicrografias foram obtidas com aumento total de 400x e a linha de escala representa 10 μ m.



Figura 21. Imagens representativas de seções coronais hipocampais na região do giro denteado (GD 3). Micróglias foram marcadas com imunofluorescência para Iba-1 (verde) e núcleos celulares foram marcados com DAPI (azul). As fotomicrografias foram obtidas com aumento total de 400x e a linha de escala representa 10 μ m.



Figura 22. Imagens representativas de seções coronais hipocampais na região do giro denteado (GD 4). Micróglias foram marcadas com imunofluorescência para Iba-1 (verde) e núcleos celulares foram marcados com DAPI (azul). As fotomicrografias foram obtidas com aumento total de 400x e a linha de escala representa 10 μ m.


Figura 23. Imagens representativas de seções coronais hipocampais na região CA3 (CA3 1). Micróglias foram marcadas com imunofluorescência para Iba-1 (verde) e núcleos celulares foram marcados com DAPI (azul). As fotomicrografias foram obtidas com aumento total de 400x e a linha de escala representa 10 μ m.



Figura 24. Imagens representativas de seções coronais hipocampais na região CA3 (CA3 2). Micróglias foram marcadas com imunofluorescência para Iba-1 (verde) e núcleos celulares foram marcados com DAPI (azul). As fotomicrografias foram obtidas com aumento total de 400x e a linha de escala representa 10 μ m.



Figura 25. Imagens representativas de seções coronais hipocampais na região CA3 (CA3 3). Micróglias foram marcadas com imunofluorescência para Iba-1 (verde) e núcleos celulares foram marcados com DAPI (azul). As fotomicrografias foram obtidas com aumento total de 400x e a linha de escala representa 10 μ m.



Figura 26. Imagens representativas de seções coronais hipocampais na região CA1 (CA1 1). Micróglias foram marcadas com imunofluorescência para Iba-1 (verde) e núcleos celulares foram marcados com DAPI (azul). As fotomicrografias foram obtidas com aumento total de 400x e a linha de escala representa 10 μ m.



Figura 27. Imagens representativas de seções coronais hipocampais na região CA1 (CA1 2). Micróglias foram marcadas com imunofluorescência para Iba-1 (verde) e núcleos celulares foram marcados com DAPI (azul). As fotomicrografias foram obtidas com aumento total de 400x e a linha de escala representa 10 μ m.



Figura 28. Imagens representativas de seções coronais hipocampais na região CA1 (CA1 3). Micróglias foram marcadas com imunofluorescência para Iba-1 (verde) e núcleos celulares foram marcados com DAPI (azul). As fotomicrografias foram obtidas com aumento total de 400x e a linha de escala representa 10 μ m.



Figura 29. Imagens representativas de seções coronais hipocampais na região da camada molecular (mol 1). Micróglias foram marcadas com imunofluorescência para Iba-1 (verde) e núcleos celulares foram marcados com DAPI (azul). As fotomicrografias foram obtidas com aumento total de 400x e a linha de escala representa 10 μ m.



Figura 30. Imagens representativas de seções coronais hipocampais na região da camada molecular (mol 2). Micróglias foram marcadas com imunofluorescência para Iba-1 (verde) e núcleos celulares foram marcados com DAPI (azul). As fotomicrografias foram obtidas com aumento total de 400x e a linha de escala representa 10 μ m.

4.4 Efeito da Neurovespina na astrogliose reativa na formação hipocampal

No recorte temporal analisado, não foi possível observar diferenças entre níveis de reatividade astrocítica de animais sadios e epilépticos. Da mesma forma, o tratamento com todas as doses do peptídeo Neurovespina manteve a astrogliose reativa nos mesmos níveis observados em animais sadios. Entretanto, foi identificado um aumento considerável de astrócitos reativos em animais tratados com diazepam.

Analisando-se a densidade óptica da imunofluorescência para GFAP em toda a formação hipocampal, foram detectadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de tratamento [H(5) = 17,94; p = 0,0030] (figura 31A). Primeiramente, foi testada a normalidade dos conjuntos de dados através dos testes de D'Agostino-Pearson e Shapiro-Wilk, nos quais apenas os dados referentes à região CA3 apresentaram distribuição normal. Para essa região, foi realizada a ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey para comparações múltiplas. Os demais conjuntos de dados – formação hipocampal total, giro denteado e CA1 – não demonstraram ter distribuição normal e foram analisados com o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn para comparações múltiplas.

Não houve diferença entre os grupos sadio e epiléptico (p > 0,9999), mas o grupo diazepam demonstrou um aumento na proliferação de astrócitos reativos em relação ao grupo epiléptico (p = 0,0160). Adicionalmente, o grupo Neurovespina (4 mg/kg) apresentou menor astrogliose em comparação ao tratamento com diazepam (p = 0,0027). Considerando-se cada região da formação hipocampal, não foram detectadas diferenças entre os tratamentos no giro denteado [H(5) = 5,267; p = 0,3842] (figuras 31B e 32), apenas nas regiões CA3 [F (5, 48) = 2,656; p = 0,0337] (figuras 31C e 33) e CA1 [H(5) = 14,16; p = 0,0147] (figuras 31D e 34). Em CA3, apenas o grupo diazepam foi estatisticamente diferente do grupo epiléptico (p = 0,0373), com aumento da astrogliose reativa. Já em CA1, foi possível identificar diferenças entre os grupos, mas o pós-teste não as identificou na análise de comparações múltiplas.



Figura 31. Diferenças de densidade óptica para imunofluorescência para GFAP entre os diferentes grupos de tratamento em toda a formação hipocampal (A), no giro denteado (B), em CA3 (C) e em CA1 (D) (n = 4-5). Para os gráficos A, B e D, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn, considerando-se significância estatística para p < 0,05. Os valores estão representados em mediana \pm IC 95%. Para o gráfico C, foi realizada ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey, sendo também considerado p < 0,05. Os valores estão representados em média. *: diferença em relação ao grupo epiléptico; @: diferença em relação ao grupo diazepam.



Figura 32. Imagens representativas de seções coronais hipocampais na região do giro denteado. Astrócitos foram marcados com imunofluorescência para GFAP (verde), neurônios foram marcados com o corante NeurotraceTM (vermelho) e núcleos celulares foram marcados com DAPI (azul). As fotomicrografias foram obtidas com aumento total de 200x e a linha de escala representa 10 μm.



Figura 33. Imagens representativas de seções coronais hipocampais na região CA3. Astrócitos foram marcados com imunofluorescência para GFAP (verde), neurônios foram marcados com o corante NeurotraceTM (vermelho) e núcleos celulares foram marcados com DAPI (azul). As fotomicrografias foram obtidas com aumento total de 200x e a linha de escala representa 10 μ m.



Figura 34. Imagens representativas de seções coronais hipocampais na região CA1. Astrócitos foram marcados com imunofluorescência para GFAP (verde), neurônios foram marcados com o corante NeurotraceTM (vermelho) e núcleos celulares foram marcados com DAPI (azul). As fotomicrografias foram obtidas com aumento total de 200x e a linha de escala representa 10 μ m.

4.5 Efeito da Neurovespina na expressão da citocina IL-1β na formação hipocampal

Na análise da expressão de IL-1 β , foi possível verificar que não houve uma diferença evidente entre animais sadios e epilépticos, mas a dose de 4 mg/kg do peptídeo Neurovespina reduziu drasticamente os níveis dessa citocina na formação hipocampal. Por outro lado, observou-se um aumento da expressão da interleucina pró-inflamatória nos grupos tratados com diazepam e Neurovespina na dose de 2,5 mg/kg.

Na análise de densidade óptica referente à expressão de IL-1 β , foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os vários grupos de tratamento em toda a formação hipocampal [H(5) = 60,16; p < 0,0001] (figura 35A). Os grupos sadio e epiléptico não diferiram entre si, mas foram estatisticamente diferentes dos grupos diazepam (p < 0,0001) e Neurovespina (2,5 mg/kg) (p = 0,0052 e p = 0,0007, respectivamente), os quais apresentaram aumento na expressão de IL-1 β nas fatias analisadas. O tratamento com Neurovespina na dose de 4 mg/kg ocasionou grande redução na densidade óptica dessa citocina em comparação aos grupos diazepam e Neurovespina (2,5 mg/kg) (p < 0,0001). Adicionalmente, a dose de 8 mg/kg do peptídeo também reduziu a expressão de IL-1 β em relação ao grupo diazepam (p = 0,0052). Esses resultados foram obtidos através do teste de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn para comparações múltiplas, haja vista que os testes de D'Agostino-Pearson e Shapiro-Wilk atestaram a ausência de distribuição normal em todos os conjuntos de dados.

Realizando uma investigação em cada região da formação hipocampal, também foram identificadas diferenças no giro denteado [H(5) = 14,93; p = 0,0106], em CA3 [H(5) = 28,04; p < 0,0001] e em CA1 [H(5) = 26,19; p < 0,0001]. No giro denteado (figuras 35B e 36), apenas o grupo tratado com Neurovespina na dose de 4 mg/kg foi diferente do grupo diazepam, reduzindo a expressão de IL-1 β (p = 0,0308). Em CA3 (figuras 35C e 37), houve um aumento da densidade óptica nos grupos diazepam e Neurovespina (2,5 mg/kg) em relação ao grupo epiléptico (p = 0,0007 e p = 0,0476, respectivamente). Por outro lado, o tratamento com a dose de 4 mg/kg do peptídeo reduziu a expressão dessa citocina pró-inflamatória em relação aos grupos diazepam (p = 0,0003) e Neurovespina (2,5 mg/kg) (p = 0,0198). Por fim, em CA1 (figuras 35D e 38), foi observado o mesmo padrão de aumento da densidade óptica nas fatias tratadas com diazepam, em relação aos grupos sadio (p = 0,0137) e epiléptico (p = 0,0175). Ainda foi detectada uma redução da expressão de IL-1 β com a dose de 4 mg/kg em comparação ao tratamento com diazepam e Neurovespina (2,5 mg/kg) (p = 0,0018 e p = 0,0108, respectivamente).



Figura 35. Diferenças de densidade óptica para imunofluorescência para IL-1 β entre os diferentes grupos de tratamento em toda a formação hipocampal (A), no giro denteado (B), em CA3 (C) e em CA1 (D) (n = 4-5). Foi realizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn, considerando-se significância estatística para p < 0,05. Os valores estão representados em mediana ± IC 95%. #: diferença em relação ao grupo sadio; *: diferença em relação ao grupo epiléptico; @: diferença em relação ao grupo diazepam; &: diferença em relação ao grupo Neurovespina (2,5 mg/kg).



Figura 36. Imagens representativas de seções coronais hipocampais na região do giro denteado. A citocina IL-1 β foi marcada por imunofluorescência (verde) e núcleos celulares foram marcados com DAPI (azul). As fotomicrografias foram obtidas com aumento total de 200x e a linha de escala representa 10 μ m.



Figura 37. Imagens representativas de seções coronais hipocampais na região CA3. A citocina IL-1 β foi marcada por imunofluorescência (verde) e núcleos celulares foram marcados com DAPI (azul). As fotomicrografias foram obtidas com aumento total de 200x e a linha de escala representa 10 μ m.



Figura 38. Imagens representativas de seções coronais hipocampais na região CA1. A citocina IL-1 β foi marcada por imunofluorescência (verde) e núcleos celulares foram marcados com DAPI (azul). As fotomicrografias foram obtidas com aumento total de 200x e a linha de escala representa 10 μ m.

4.6 Efeito da Neurovespina na expressão da proteína claudina-5 na formação hipocampal

Quanto à análise da claudina-5, os grupos sadio e epiléptico não demonstraram diferenças entre si, mas todas as doses do peptídeo Neurovespina, especialmente 4 e 8 mg/kg, ocasionaram um aumento na expressão dessa proteína na formação hipocampal.

Na análise de densidade óptica, foram identificadas diferenças estatisticamente significativas entre os diversos grupos de tratamento [H(5) = 36,84; p < 0,0001] (figuras 39, 40, 41 e 42). Primeiramente, foi testada a normalidade dos conjuntos de dados através dos testes de D'Agostino-Pearson e Shapiro-Wilk, nos nenhum apresentou distribuição normal. Então, empregou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn para comparações múltiplas.

Embora os grupos sadio e epiléptico não tenham sido diferentes entre si (p > 0,9999), o grupo diazepam demonstrou um aumento na densidade óptica em relação ao grupo sadio (p = 0,0382). Além disso, em comparação aos grupos sadio e epiléptico, foi encontrada maior densidade óptica nas fatias dos grupos Neurovespina (4 mg/kg) (p < 0,0001) e Neurovespina (8 mg/kg) (p = 0,0033 e p = 0,0046, respectivamente).



Formação Hipocampal Total

Figura 39. Diferenças de densidade óptica para imunofluorescência para claudina-5 entre os diferentes grupos de tratamento em toda a formação hipocampal (n = 4-5). Foi realizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn, considerando-se significância estatística para p < 0.05. Os valores estão representados em mediana \pm IC 95%. #: diferença em relação ao grupo sadio; *: diferença em relação ao grupo epiléptico.



Figura 40. Imagens representativas de seções coronais hipocampais na região da camada molecular (mol 1). A proteína claudina-5 foi marcada por imunofluorescência (verde) e núcleos celulares foram marcados com DAPI (azul). As fotomicrografias foram obtidas com aumento total de 200x e a linha de escala representa 10 μ m.



Figura 41. Imagens representativas de seções coronais hipocampais na região da camada molecular (mol 2). A proteína claudina-5 foi marcada por imunofluorescência (verde) e núcleos celulares foram marcados com DAPI (azul). As fotomicrografias foram obtidas com aumento total de 200x e a linha de escala representa 10 μ m.



Figura 42. Imagens representativas de seções coronais hipocampais na região da camada molecular (mol 3). A proteína claudina-5 foi marcada por imunofluorescência (verde) e núcleos celulares foram marcados com DAPI (azul). As fotomicrografias foram obtidas com aumento total de 200x e a linha de escala representa 10 μ m.

5 Discussão

A ELT é uma grave condição de saúde com significativas consequências neurobiológicas, psicológicas, emocionais e sociais – além disso, a natureza refratária da doença torna urgente a pesquisa de novos tratamentos e compostos terapêuticos. A pesquisa pré-clinica se estabelece como uma importante etapa na descoberta de novos fármacos e modelos animais são particularmente úteis para a execução de tais estudos. Com a utilização desses modelos, é possível caracterizar mecanismos fisiopatológicos de determinadas doenças, identificar prováveis alvos terapêuticos e avaliar a atividade de compostos no tratamento de tais patologias (Singh; Seed, 2021). O uso de camundongos para o desenvolvimento desses modelos é particularmente vantajoso, tendo em vista que são animais pequenos, de fácil manuseio e com ciclo de vida curto (Singh; Seed, 2021).

Para o estudo da ELT, o modelo que se inicia com a indução de *status epilepticus* por pilocarpina vem sendo amplamente empregado em laboratórios de todo o mundo. Descrito em ratos por Turski e colaboradores em 1983 e caracterizado para camundongos por Cavalheiro, Santos e Priel em 1996, esse modelo mimetiza importantes aspectos da doença, caracterizando-se como isomórfico por mimetizar a patologia, mas não todos os seus traços etiológicos, que ainda não foram completamente elucidados (Curia *et al.*, 2008). Alguns aspectos relevantes do modelo incluem uma rápida indução do *status epilepticus*, a presença de um período latente anterior à ocorrência de crises epilépticas espontâneas e recorrentes (Cavalheiro; Santos; Priel, 1996), a dificuldade de controle das crises (Chakir *et al.*, 2006) e a ocorrência de lesões particulares à ELT – como a esclerose hipocampal (Curia *et al.*, 2008). A presença desses específicos mecanismos fisiopatológicos se estabelece tanto em pacientes com ELT quanto em animais submetidos à administração de pilocarpina, o que justifica a relevância desse modelo e sua utilização no presente trabalho.

Convém ressaltar que, aqui, não foram empregadas fêmeas pelo fato de que o modelo foi melhor validado em machos, haja vista que fêmeas são menos suscetíveis a desenvolver *status epilepticus* e sobreviver ao insulto inicial (Buckmaster; Haney, 2012). Além disso, todos os estudos prévios que avaliaram a atividade farmacológica do peptídeo Neurovespina utilizaram apenas camundongos machos (Carneiro, 2013; Campos, 2016; Carneiro, 2017; Campos, 2020; Marques, 2024). Quanto à idade e ao peso, foram utilizados camundongos com 6 a 13 semanas, de 25 a 46 gramas. De acordo com Buckmaster e Haney (2012), a porcentagem de animais machos que desenvolvem *status epilepticus* e sobrevivem é maior conforme a idade avança, especialmente após a sétima semana de vida. Além disso, machos com maior massa

94

corporal também são mais suscetíveis ao desenvolvimento dessa condição, mas sobrevivem menos (Buckmaster; Haney, 2012). No presente projeto, 100% dos animais submetidos à injeção de pilocarpina desenvolveram *status epilepticus* e foram notados os mesmos padrões de mortalidade identificados por Buckmaster e Haney (2012).

Inclusive, um desafio relacionado ao modelo de ELT induzido por pilocarpina é justamente a taxa de mortalidade intrinsicamente alta, que varia entre 30 e 50% (Lévesque *et al.*, 2021; Carneiro, 2017; Marques, 2024). Neste projeto, a taxa de mortalidade no *status epilepticus*, devido à administração de pilocarpina, foi de 37,14%, em consonância com as taxas reportadas pela literatura. Entretanto, 20% dos camundongos morreram nos dias subsequentes do protocolo, observando-se uma taxa de mortalidade total de 57,14% com, portanto, 42,86% de animais sobreviventes.

As doses utilizadas no insulto inicial foram escolhidas com base nos trabalhos de Carneiro (2017) e Marques (2024), além de buscas na literatura. Primeiramente, os animais receberam uma injeção intraperitoneal de 4 mg/kg de butilbrometo de escopolamina para atenuação dos efeitos periféricos da pilocarpina. É muito comum observar a injeção de escopolamina em 1 mg/kg (Turski *et al.*, 1983; Modebadze *et al.*, 2016; Vigier *et al.*, 2016), mas optou-se por um aumento da dose para proteger ainda mais os animais contra a ativação colinérgica periférica. Ressalta-se que isso não interfere na indução do *status epilepticus*, tendo em vista que o butilbrometo de escopolamina não é capaz de ultrapassar a barreira hematoencefálica (Tytgat, 2008).

Em seguida, os animais foram injetados com 150 mg/kg de cloridrato de pilocarpina. Na literatura, as doses para a indução de *status epilepticus* em camundongos variam entre 100 e 400 mg/kg (Lévesque *et al.*, 2021). Turski e colaboradores (1984) avaliaram os efeitos comportamentais de injeções de doses progressivamente maiores de pilocarpina. Os pesquisadores observaram que injeções de 100 mg/kg não causaram anormalidades, apenas tremores leves. Com um aumento das doses, efeitos cada vez mais severos foram observados, como mioclonias, crises motoras límbicas e morte – com quase 100% de letalidade na dose de 400 mg/kg (Turski *et al.*, 1984). No trabalho de Carneiro (2017), a dose de pilocarpina utilizada foi de 300 mg/kg, o que gerou um dano hipocampal importante em 180 minutos de *status epilepticus* com mortalidade dentro das taxas comumente reportadas na literatura. Entretanto, experimentos realizados por Marques (2024) atestaram uma necessidade de redução na dose de pilocarpina administrada, haja vista a alta e anormal taxa de mortalidade dos animais. Visando

escolher uma dose que fosse capaz de desencadear um forte *status epilepticus* e, ao mesmo tempo, mantivesse a mortalidade em um nível baixo, Marques (2024) utilizou uma dose de pilocarpina de 150 mg/kg no insulto inicial. No presente estudo, optou-se por continuar empregando injeções de pilocarpina na dose de 150 mg/kg, ressaltando-se que todos os animais desenvolveram *status epilepticus* e esclerose hipocampal identificável, mesmo oito dias após o insulto inicial. Marques (2024) observou expressiva perda neuronal na formação hipocampal em um recorte temporal de 30 dias depois da indução do *status epilepticus*.

Reduzir a taxa de mortalidade é uma grande preocupação e também um desafio significativo associado ao modelo de ELT induzido por pilocarpina, o que também explica a alteração no procedimento de resgate dos animais. Com base no trabalho de Marques (2024), o uso alternativo do isoflurano para o resgate do *status epilepticus* se deu pela alta mortalidade causada pela anterior utilização de tiopental sódico associado ao sulfato de atropina, além de que o diazepam – comumente utilizado nessa etapa – poderia exercer efeitos neuroprotetores logo após o *status epilepticus*, interferindo no dano hipocampal pertinente ao modelo (Cunha *et al.*, 2009). Os parâmetros escolhidos para a administração de isoflurano foram baseados em protocolos utilizados na Universidade do Texas, na Queen's University e na Universidade da Califórnia em Los Angeles (Animal Resources Center, [s.d.]; University Animal Care Committee, 2012; Couto, 2008).

Com isso, este projeto trouxe um refinamento no resgate realizado por anestesia inalatória com isoflurano, primeiramente realizado em uma taxa de 4% por Marques (2024). Aqui, cada animal foi submetido a duas rodadas de anestesia com duração de quatro minutos cada uma, com taxa de manutenção de isoflurano a 1% e oxigênio a 1,5 L/min, com um breve intervalo de recuperação entre as rodadas de anestesia. É relevante notar que, em altas concentrações, o isoflurano é um potente depressor respiratório. Por isso, optou-se por não induzir anestesia na dose de 4% e, então, a dose foi reduzida para uma taxa de manutenção de 1%, para que pudesse ser realizado um resgate mais suave e seguro para os animais já significativamente debilitados pelos 180 minutos em *status epilepticus*. Durante as rodadas de anestesia, os animais foram meticulosamente observados, monitorando-se visualmente padrões cardiorrespiratórios e coloração das membranas mucosas.

As doses escolhidas para administração do peptídeo Neurovespina foram baseadas no trabalho de Carneiro (2017), que avaliou o efeito neuroprotetor do composto. Durante o período latente, os animais receberam injeções intraperitoneais de Neurovespina exatamente nas doses

de 8, 4 e 2,5 mg/kg. Ressalta-se que, aqui, a via de administração utilizada foi a subcutânea, por ser rápida, econômica e simples, geralmente causando mínima dor e desconforto em camundongos conscientes (Levin-Arama *et al.*, 2016; Turner *et al.*, 2011). Além disso, administrações subcutâneas proporcionam uma absorção mais lenta dos compostos (Turner *et al.*, 2011), o que é de interesse para a diminuição da quantidade de injeções, considerando-se a curta meia-vida da Neurovespina de aproximadamente 4 horas (Marques, 2024). A composição da solução veículo com 80% de solução salina a 150 mM e 20% de dimetilsulfóxido se dá pelas especificidades de diluição da Neurovespina, que é altamente hidrofóbica e não se dissolve de forma homogênea em solução salina. A dose de 4 mg/kg para o controle positivo com diazepam foi escolhida também com base nos trabalhos de Carneiro (2017) e Marques (2024).

Um relevante aspecto da utilização do modelo neste estudo foi o recorte temporal específico para a análise dos parâmetros neuroinflamatórios no período latente, considerando que os camundongos foram eutanasiados no oitavo dia após a indução do *status epilepticus*. Como já exposto em seções anteriores, o período latente no modelo de ELT induzido por pilocarpina corresponde ao início da epileptogênese. Nesse estágio pré-epiléptico, é verificada uma severa atividade neuroinflamatória, com recrutamento de células microgliais, esclerose hipocampal, astrogliose reativa, liberação de citocinas pró-inflamatórias e prejuízos à barreira hematoencefálica (Patel *el al.*, 2019; Pitkänen; Lukasiuk, 2011).

A escolha da realização do estudo nessa linha temporal específica foi resultado da avaliação conjunta de diversos trabalhos na literatura. Estudos que avaliam a dinâmica da neurodegeneração e neuroinflamação em diferentes momentos do modelo de ELT induzido por pilocarpina atestam que as alterações fisiopatológicas já começam desde as fases mais iniciais. Apenas 20 minutos após a indução do *status epilepticus*, já é possível identificar morte neuronal na formação hipocampal com um dano celular que piora progressivamente até etapas mais tardias do modelo – três semanas depois do insulto inicial (Fujikawa, 1996; Nascimento *et al.*, 2012). Além disso, a dinâmica microglial e astrocítica discutida a seguir também suporta a escolha do recorte temporal, haja vista que o período de oito dias após a injeção de pilocarpina engloba, simultaneamente, os fenômenos de degeneração neuronal, ativação microglial, proliferação de astrócitos reativos e expressão de citocinas pró-inflamatórias (Fujikawa, 1996; Nascimento *et al.*, 2012; Wyatt-Johnson; Herr; Brewster, 2017; Sano *et al.*, 2021; Benson; Manzanero; Borges, 2015).

Vários estudos já avaliaram parâmetros neuroinflamatórios em diferentes pontos temporais no modelo de ELT induzido por pilocarpina. Nesse modelo, é observado que a ativação de micróglias é um fenômeno inicial importante para a epileptogênese. Sano e colaboradores (2021) verificaram um aumento da área ocupada por essas células nos sete primeiros dias após o status epilepticus em relação ao grupo controle sadio, em consonância ao que foi encontrado no presente trabalho. Wyatt-Johnson, Herr e Brewster (2017) realizaram um completo estudo espaciotemporal em que investigam a proliferação e a ativação microglial quatro horas, três dias e duas semanas depois da injeção de pilocarpina. Foi observado que micróglias já começam a sofrer alterações fenotípicas quatro horas depois do insulto inicial, com células assumindo morfologia majoritariamente ameboide em todas as regiões da formação hipocampal (Wyatt-Johnson; Herr; Brewster, 2017). A proliferação de micróglias foi identificada apenas no recorte de duas semanas após a indução do status epilepticus (Wyatt-Johnson; Herr; Brewster, 2017), mas pode ter ocorrido antes, como verificado no presente trabalho em um período de oito dias depois do insulto inicial. Outros estudos também identificaram mobilização de células microgliais nos estágios mais iniciais do modelo (Borges et al., 2003; Estrada et al., 2012).

No período crônico, contudo, a ativação microglial diminui e a astrogliose reativa se torna mais relevante. Na literatura, a alteração e proliferação dos astrócitos nesse modelo é muito bem documentada, ocorrendo nos estágios mais iniciais, mas sendo mais significativa em fases mais tardias após a indução do *status epilepticus* (Garzillo; Mello, 2002; Borges *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2008; Estrada *et al.*, 2012; Nascimento *et al.*, 2012; Clasadonte *et al.*, 2016; Vizuete *et al.*, 2017; Sano *et al.*, 2021; Tewari *et al.*, 2023).

Aqui, numa avaliação que ocorreu oito dias depois do insulto inicial, não foi possível observar diferenças significativas na expressão de GFAP entre os grupos sadio e epiléptico. Apesar disso, era esperado que houvesse um aumento na astrogliose reativa no recorte temporal analisado neste estudo, considerando que alguns trabalhos – utilizados como base para o delineamento experimental – já identificaram astrogliose reativa uma semana após a indução do *status epilepticus* (Sano *et al.*, 2021; Nascimento *et al.*, 2012). Uma análise anterior realizada no Laboratório de Neurofarmacologia da UnB foi capaz de detectar o aumento da astrogliose reativa no modelo de ELT induzido por pilocarpina. Gomes (2016) identificou um aumento do número de astrócitos imunorreativos a GFAP em um período de 30 dias após o insulto inicial e viu que o peptídeo analisado em seu trabalho foi capaz de reduzir o número de astrócitos na formação hipocampal. Isso sugere que o recorte temporal de oito dias analisado neste estudo

ainda não permitiu a avaliação da atividade do peptídeo Neurovespina na atenuação da astrogliose reativa – embora o tratamento com diazepam tenha aumentado significativamente a expressão de GFAP, como será discutido mais adiante. Mesmo assim, a análise da astrogliose reativa nas fases mais iniciais do modelo se estabelece como um importante aspecto a ser analisado, contribuindo para a compreensão da dinâmica astrocítica na ELT.

Outro fator analisado no presente estudo foi a expressão de citocinas pró-inflamatórias, no caso IL-1 β . No modelo de ELT induzido por pilocarpina, essas moléculas parecem ser mais expressas imediatamente após o insulto inicial, retornando a níveis basais em apenas cinco dias (Arisi *et al.*, 2015). Apenas um dia depois da administração de pilocarpina, Sano e colaboradores (2021) já notaram um aumento significativo na expressão de TNF e IL-1 β em células microgliais, o que corrobora achados anteriores de que micróglias modulam a ativação de astrócitos por meio dessas citocinas (Henning *et al.*, 2023; Liddelow *et al.*, 2017). Entretanto, o perfil desses marcadores inflamatórios ainda não é bem compreendido, haja vista que, nas fases iniciais do modelo, células microgliais também liberam moléculas associadas com integridade celular e citocinas anti-inflamatórias, como arginase-1, IL-4 e IL-10 (Benson; Manzanero; Borges, 2015). Em qualquer recorte temporal, analisar a expressão de citocinas é valioso para o estudo da ELT e de compostos terapêuticos emergentes, dado o complexo caráter neuroinflamatório dessa doença.

Aqui, não foram encontradas diferenças significativas na expressão de IL-1 β entre os grupos sadio e epiléptico. A escolha da imunofluorescência em fatias hipocampais se justifica pelo interesse de observar a localização dos níveis dessa citocina, assim como realizado por Voutsinos-Porche e colaboradores (2004) para várias moléculas inflamatórias. Entretanto, para uma quantificação mais precisa, poderiam ter sido utilizados métodos complementares mais sensíveis e específicos para esse fim, como *western blot* ou citometria de fluxo. Além disso, analisar também um recorte temporal mais inicial ainda poderia oferecer um entendimento mais completo da expressão de IL-1 β no modelo de ELT induzido por pilocarpina, bem como da atividade da Neurovespina nesse aspecto fisiopatológico da doença.

O mesmo vale para a análise da claudina-5, já que muitos trabalhos utilizam técnicas mais específicas para a quantificação total dessa proteína no encéfalo. Empregando a técnica de *western blot*, Rempe e colaboradores (2018) verificaram que, dois dias depois do insulto inicial, a expressão de claudina-5 diminuiu em ratos injetados com pilocarpina. No trabalho, eles hipotetizaram que o glutamato excessivo é capaz de ativar cascatas de sinalização que

levam à diminuição da expressão das proteínas que formam as junções de oclusão das células endoteliais da barreira hematoencefálica, levando à desestabilização estrutural da barreira (Rempe *et al.*, 2018). O estudo de Mendes e colaboradores (2019), por outro lado, demonstrou que a disfunção da barreira ocorre logo depois da indução do *status epilepticus*. Um corante padrão para análises da estrutura da barreira hematoencefálica foi administrado sistemicamente em ratos 30 minutos após a injeção de pilocarpina e observou-se um extravasamento significativo do corante para o tecido encefálico em apenas 5 horas depois do insulto inicial. Curiosamente, a administração do mesmo corante depois de 23 horas e 30 minutos da administração de pilocarpina não gerou um extravasamento relevante, o que indica que a janela de tempo é importante para a análise da integridade da barreira hematoencefálica.

No presente trabalho, não foram vistas diferenças entre os grupos sadio e epiléptico na análise da expressão de claudina-5. Entretanto, a análise dessa proteína nessa fase específica do modelo contribui para o entendimento da integridade das junções de oclusão da barreira hematoencefálica na ELT. Além disso, a utilização de técnicas de imunofluorescência abre uma nova possibilidade de estudo que avalia não apenas as quantidades de determinada proteína no encéfalo, mas também a análise de sua expressão em diferentes localizações de interesse.

Discutindo agora a atividade do peptídeo Neurovespina, foi novamente observado um efeito neuroprotetor com o tratamento na dose de 4 mg/kg do composto, em consonância com os trabalhos de Carneiro (2013), Campos (2016), Carneiro (2017) e Marques (2024). Aqui, foi observada uma curva dose-resposta em U invertido, em que os efeitos do peptídeo aumentaram com doses maiores, mas começaram a diminuir em doses que ultrapassaram a dose terapêutica ideal (Baldi; Bucherelli, 2005). A novidade apresentada por este trabalho é que a neuroproteção se dá desde as fases mais iniciais do modelo. No recorte temporal analisado, já foi possível observar morte de neurônios hipocampais e, também, que a Neurovespina já exerceu atividade neuroprotetora. De acordo com a literatura, a morte neuronal após o *status epilepticus* pode ocorrer tanto por apoptose quanto por necrose (Pollard *et al.*, 1994; Sloviter *et al.*, 1996; Bengzon *et al.*, 1997; Fujikawa; Shinmei; Cai, 1999; Fujikawa; Shinmei; Cai, 2000), o que levanta questionamentos acerca do mecanismo pelo qual o peptídeo exerce neuroproteção.

Campos (2020) havia observado, em seu estudo, que a Neurovespina é capaz de inibir correntes de cálcio em canais Cav1.2, o que é consistente com seu efeito antiepiléptico e neuroprotetor. O excesso de glutamato no espaço extracelular gerado pela hiperexcitabilidade leva ao influxo de cálcio por meio de receptores NMDA e canais de cálcio dependentes de voltagem, o que gera toxicidade (Schurr, 2004). Em 2009, Tsuruta e colaboradores observaram que altas concentrações de glutamato também promovem a internalização e a degradação de canais Cav1.2 como uma resposta a estímulos potencialmente citotóxicos. Em um outro trabalho que também analisou essas estruturas, mas em modelos de depressão, verificou que o aumento da atividade de canais Cav1.2 levou à ativação de cascatas apoptóticas na formação hipocampal (Moreno *et al.*, 2020). Em vista disso, a inibição de correntes nesses canais pode diminuir as quantidades de cálcio intracelular – um gatilho bem conhecido para a morte celular – e prevenir a degeneração de neurônios (Torres-Rico *et al.*, 2024).

A atividade da Neurovespina em canais de cálcio Cav1.2 também pode explicar os resultados obtidos quanto ao efeito do peptídeo na redução da proliferação microglial. Em condições normais, micróglias parecem expressar níveis baixos e não funcionais de canais de cálcio dependentes de voltagem (Hopp, 2020). Entretanto, como investigado por Espinosa-Parrilla e colaboradores (2015), a expressão desses canais pode aumentar devido à excitotoxicidade hipocampal, que passam a assumir uma função pró-inflamatória. Outros trabalhos encontrados na literatura também sugerem que moléculas pró-inflamatórias, como lipopolissacarídeo, TNF- α , IL-1 β e interferon γ , aumentam os níveis intracelulares de cálcio em micróglias (Hoffmann *et al.*, 2003; Franciosi *et al.*, 2002; Goghari *et al.*, 2000; McLarnon *et al.*, 2001). Isso sugere o estabelecimento de um ciclo de feedback inflamatório dependente da presença de cálcio, que pode contribuir para a propagação da ativação microglial (Hopp, 2020). Portanto, considerando a atividade da Neurovespina na inibição de correntes de cálcio, esse efeito também pode se estender para células microgliais, o que contribui para uma atividade combinada anti-inflamatória, neuroprotetora e antiepiléptica.

Por outro lado, o peptídeo não interferiu na astrogliose reativa. Entretanto, não foi possível observar diferenças nem mesmo entre os grupos sadio e epiléptico, dado que a janela temporal analisada não abrangeu fases mais tardias do modelo em que há maior proliferação de astrócitos, como observado por Sano e colaboradores (2021) e por Gomes (2016) em 28 e 30 dias após a injeção de pilocarpina. Seria relevante, em estudos futuros, analisar a atividade da Neurovespina na astrogliose reativa em diferentes recortes temporais no modelo de ELT induzido por pilocarpina.

Mesmo assim, é interessante discutir o papel da astrogliose reativa na ELT, questionando-se se a proliferação de astrócitos realmente é um alvo terapêutico viável. Em

alguns casos, a inflamação é um fenômeno necessário para que mecanismos celulares e moleculares sejam ativados para o combate de algum desequilíbrio homeostático (Raivich *et al.*, 1999). É preciso que haja um fino equilíbrio nesse processo, já que a liberação de mediadores inflamatórios por astrócitos ativados pode proteger ou causar danos ao tecido nervoso (Raivich *et al.*, 1999). Isso significa que a resposta astrocítica pode ser uma resposta de defesa – na tentativa de restaurar a homeostase no SNC e limitar os danos teciduais – ou, quando persistente, um processo fisiopatológico danoso para o encéfalo (Pekny; Pekna, 2014). A neuroinflamação é sempre complexa e heterogênea, oferecendo uma variedade de alvos terapêuticos que devem ser cuidadosamente avaliados no contexto de cada doença. No caso da ELT, a astrogliose reativa está frequentemente associada a epileptogênese, liberação de moléculas pró-inflamatórias, disfunção da barreira hematoencefálica, redução do limiar excitatório e desenvolvimento de crises epilépticas espontâneas e recorrentes (Das *et al.*, 2012; Robel *et al.*, 2015; Vargas-Sánchez *et al.*, 2018; Vezzani; Balosso; Ravizza, 2019; Chen *et al.*, 2023).

De maneira interessante, o peptídeo Neurovespina demonstrou reduzir a expressão de IL-1β na dose de 4 mg/kg, até mesmo em relação ao grupo sadio, que não foi diferente do epiléptico. Pode ser que a redução na expressão dessa interleucina tenha se dado devido à atenuação da proliferação de células microgliais, que são uma importante fonte de citocinas pró-inflamatórias nas fases iniciais do modelo de ELT induzido por pilocarpina (Arisi et al., 2015; Sano et al., 2021). A literatura reporta que alguns fármacos antiepilépticos, como vimpocetina e carbamazepina, reduzem a expressão de IL-1ß no hipocampo de ratos inoculados com lipopolissacarídeo (Gómez; Buijs; Sitges, 2014). Essa citocina parece estar bastante envolvida na fisiopatologia da ELT, reduzindo a neurotransmissão mediada por GABA em pacientes com epilepsia (Roseti et al., 2015). Portanto, citocinas pró-inflamatórias são um alvo alternativo para o desenvolvimento de novos tratamentos para a ELT, haja vista que o contexto neuroinflamatório persistente contribui para a ocorrência de crises epilépticas, além de facilitar a morte de neurônios por necrose (Noe et al., 2013; Chiavegato et al., 2014; Medel-Matus et al., 2014). Como relatado anteriormente, é relevante, no futuro, executar novos experimentos para melhor averiguar o efeito da Neurovespina na expressão de IL-1β, com a utilização de técnicas mais precisas para a quantificação dessa e de outras citocinas.

Uma outra abordagem terapêutica inovadora é a vasculatura encefálica. Reiss e colaboradores (2022) realizaram uma robusta revisão que traz a barreira hematoencefálica como um potencial alvo para o tratamento da ELT, já que a estabilização dessa estrutura pode

trazer benefícios para o controle das crises. Poucos estudos investigam a regulação da claudina-5 para o manejo da epilepsia, mas já foi reportado que restaurar os níveis dessa proteína pode aliviar essas crises epilépticas e a neuroinflamação (Greene *et al.*, 2022). No presente trabalho, novamente não foram identificadas diferenças na expressão de claudina-5 entre os grupos sadio e epiléptico, mas observou-se um aumento da densidade óptica nas fatias hipocampais de animais tratados com Neurovespina. Seriam necessários estudos adicionais para confirmar que o peptídeo exerce alguma influência na integridade da barreira hematoencefálica, como ensaios de *western blot*, testes de extravasamento de corantes ou análise de outras proteínas das junções de oclusão. Além disso, para resultados mais robustos, seria relevante também encontrar a janela temporal em que existem diferenças entre os grupos sadio e epiléptico.

Analisando os resultados obtidos em uma perspectiva global, é possível afirmar que a Neurovespina é um composto particularmente promissor no desenvolvimento de novas terapias para a epilepsia. Com potente atividade antiepiléptica e neuroprotetora, o peptídeo foi avaliado até mesmo em cães diagnosticados com epilepsia idiopática farmacorresistente, demonstrando diminuir a frequência de crises epilépticas de maneira eficaz e segura (Silva, 2024). Considerando também os achados deste trabalho, a Neurovespina apresentou atividade antiinflamatória significativa desde as fases mais iniciais do modelo animal de ELT induzido por pilocarpina – inclusive com desempenho muito superior ao do fármaco selecionado para o grupo controle positivo.

Em última análise, convém discutir justamente os resultados encontrados em relação ao grupo tratado com diazepam, considerando que o tratamento mostrou exacerbar o quadro neuroinflamatório. As repetitivas injeções de diazepam não demonstraram ter efeito neuroprotetor, além de ter sido notado um aumento da proliferação microglial, da astrogliose reativa e da expressão de IL-1β. Curiosamente, o fármaco apenas elevou um pouco a expressão de claudina-5. Entretanto, todos os outros parâmetros apontam para o agravamento da neuroinflamação.

O diazepam é um benzodiazepínico que se liga alostericamente a receptores GABA_A, aumentando a afinidade do receptor por GABA e promovendo o influxo de íons cloreto (Riss *et al.*, 2008; He; Wang; Chen, 2024). Além de ser utilizado como ansiolítico, hipnótico, sedativo e relaxante muscular, esse fármaco é a primeira linha de tratamento para *status epilepticus*, mas não é recomendado para o manejo crônico da epilepsia (Riss *et al.*, 2008; He; Wang; Chen, 2024). Um dos motivos é o desenvolvimento de tolerância, que parece estar associado com mudanças na composição das subunidades dos receptores GABA_A (Ferreri; Gutiérrez; Gravielle, 2015). Também já foi observado que ratos tratados com diazepam por três semanas desenvolveram tolerância cruzada aos efeitos dos anticonvulsivantes clobazam, clonazepam e midazolam (Ramsey-Williams; Wu; Rosenberg, 1994).

Além disso, o fármaco possui toxicidade significativa. Um estudo global de farmacovigilância analisou 15.546 relatórios do Sistema de Notificação de Efeitos Adversos do *Food and Drug Administration* dos Estados Unidos, a maior base de dados sobre efeitos adversos e erros de medicação (He; Wang; Chen, 2024). Entre 2004 e 2023, foi reportado que o uso do diazepam esteve associado com sonolência, parada cardíaca, perda de consciência, sedação e prejuízo cognitivo, além de efeitos mais severos, como dependência, coma e overdose intencional ou acidental (Pádua-Reis *et al.*, 2021; Shi *et al.*, 2022; He; Wang; Chen, 2024).

Alguns estudos já investigaram o efeito do diazepam na neuroinflamação, especialmente na modulação microglial e astrocítica. Em consonância com os achados do presente projeto e em contraste com Cunha e colaboradores (2009), um estudo também verificou que o tratamento com diazepam, após indução de *status epilepticus* por pilocarpina, não exerce neuroproteção relevante nas camadas celulares do hipocampo (Tong *et al.*, 2022). Esse trabalho também identificou um aumento de áreas marcadas com GFAP e Iba-1 em comparação ao tratamento com midazolam, outro benzodiazepínico (Tong *et al.*, 2022). Os pesquisadores levantaram a hipótese de que isso pode ser devido à ação do diazepam em receptores GABA_A em diferentes células do tecido nervoso (Tong *et al.*, 2022). Em outro contexto, Supasai e colaboradores (2020) também compararam diazepam e midazolam, mas após uma lesão gerada por intoxicação aguda com um inibidor de colinesterase organofosforado. Foi observado que o diazepam não foi capaz de atenuar a proliferação de astrócitos e nem a ativação microglial persistente. Outros estudos da literatura também reportam que o tratamento com diazepam não promove melhora em quadros neuroinflamatórios (Vito *et al.*, 2014).

A busca por novos tratamentos para a ELT ainda se estabelece como um desafio na pesquisa farmacêutica. Dada a alta taxa de refratariedade desses pacientes, alvos alternativos, como aqueles relacionados à neuroinflamação, podem abrir caminhos para a descoberta de compostos terapêuticos. A Neurovespina, já reconhecida como antiepiléptica e neuroprotetora, é uma opção inovadora que visa contribuir para esse enorme desafio e, por isso, torna-se necessário o entendimento aprofundado da farmacologia desse composto bioinspirado na peçonha de vespas sociais. Era uma possibilidade de que o peptídeo, além de atuar em correntes

de canais de cálcio, atenuasse a neuroinflamação no modelo animal de ELT induzido por pilocarpina. O presente estudo buscou agregar conhecimento científico aos possíveis mecanismos de ação da Neurovespina e oferecer direcionamentos futuros para a elucidação mais clara da atividade do composto em processos neuroinflamatórios. Uma vez constatados e corroborados efeitos anti-inflamatórios do peptídeo em estudos posteriores, ainda pode-se sugerir a avaliação do composto como tratamento para várias outras doenças neurológicas que sejam acompanhadas pela neuroinflamação. Além disso, progredir na compreensão da Neurovespina pode trazer um importante fármaco antiepiléptico e neuroprotetor para uso clínico e prevenção de determinadas patologias cerebrais.

6 Conclusões

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que a Neurovespina exerce atividade neuroprotetora e anti-inflamatória na dose de 4 mg/kg, atenuando a morte de neurônios induzida no modelo de ELT induzido por pilocarpina. O peptídeo foi capaz de reduzir a proliferação microglial a níveis observados em animais sadios, além de diminuir consideravelmente a expressão da citocina pró-inflamatória IL-1 β e aumentar a expressão da proteína claudina-5. Não foram observados efeitos do composto na astrogliose reativa no recorte temporal analisado. Com o presente trabalho, abre-se a possibilidade de investigar de maneira mais aprofundada o efeito da Neurovespina na neuroinflamação, com técnicas de quantificação e análise mais robustas, além da avaliação do peptídeo em diferentes recortes temporais no modelo de ELT induzido por pilocarpina.

7 Referências Bibliográficas

ABARRATEGUI, B.; MAI, R.; SARTORI, I.; FRANCIONE, S.; PELLICCIA, V.; COSSU, M.; TASSI, L. Temporal lobe epilepsy: a never-ending story. **Epilepsy & Behavior**, v. 122, 108122, 2021. http://doi.org/10.1016/j.yebeh.2021.108122.

ABBOTT, N. J.; RÖNNBÄCK, L.; HANSSON, E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, n. 1, p. 41-53, 2006. https://doi.org/10.1038/nrn1824.

AMARAL, D. G.; SCHARFMAN, H. E.; LAVENEX, P. The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). **Progress In Brain Research**, v. 163, p. 3-22, 2007. https://doi.org/10.1016/s0079-6123(07)63001-5.

ANIMAL RESOURCES CENTER – THE UNIVERSITY OF TEXAS AT AUSTIN.Mouse-SpecificAnesthesiaGuidance.[S.D.].Disponívelem:<https://utexas.app.box.com/s/9qkkwnm4ry969fhdnehfmcm3lipp05f0>.Acessoem:12jan.2025.

ARAKI, T.; IKEGAYA, Y.; KOYAMA, R. Microglia attenuate the kainic acid-induced death of hippocampal neurons in slice cultures. **Neuropsychopharmacology Reports**, v. 40, n. 1, p. 85-91, 2020. https://doi.org/10.1002/npr2.12086.

ARISI, G. M.; FORESTI, M. L.; KATKI, K.; SHAPIRO, L. A. Increased CCL2, CCL3, CCL5, and IL-1 β cytokine concentration in piriform cortex, hippocampus, and neocortex after pilocarpine-induced seizures. **Journal of Neuroinflammation**, v. 12, 129, 2015. https://doi.org/10.1186/s12974-015-0347-z.

AVOLI, M.; CURTIS, M.; GNATKOVSKY, V.; GOTMAN, J.; KÖHLING, R.; LÉVESQUE, M.; MANSEAU, F.; SHIRI, Z.; WILLIAMS, S. Specific imbalance of excitatory/inhibitory signaling establishes seizure onset pattern in temporal lobe epilepsy. **Journal of Neurophysiology**, v. 115, n. 6, p. 3229-3237, 2016. http://doi.org/10.1152/jn.01128.2015.

AVOLI, M.; D'ANTUONO, M.; LOUVEL, J.; KÖHLING, R.; BIAGINI, G.; PUMAIN, R.; D'ARCANGELO, G.; TANCREDI, V. Network and pharmacological mechanisms leading to epileptiform synchronization in the limbic system in vitro. **Progress in Neurobiology**, v. 68, n. 3, p. 167-207, 2002. http://doi.org/10.1016/s0301-0082(02)00077-1.
BALDI, E.; BUCHERELLI, C. The inverted "U-shaped" dose-effect relationships in learning and memory: modulation of arousal and consolidation. **Nonlinearity in Biology, Toxicology, Medicine**, v. 3, n. 1, p. 9-21, 2005. https://doi.org/10.2201/nonlin.003.01.002.

BEDNER, P.; STEINHÄUSER, C. Role of impaired astrocyte gap junction coupling in epileptogenesis. Cells, v. 12, n. 12, 1669, 2023. https://doi.org/10.3390/cells12121669.

BENGZON, J.; KOKAIA, Z.; ELMÉR, E.; NANOBASHVILI, A.; KOKAIA, M.; LINDVALL,
O. Apoptosis and proliferation of dentate gyrus neurons after single and intermittent limbic seizures. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,
v. 94, n. 19, p. 10432-10437, 1997. https://doi.org/10.1073/pnas.94.19.10432.

BENSON, M. J.; MANZANERO, S.; BORGES, K. Complex alterations in microglial M1/M2 markers during the development of epilepsy in two mouse models. **Epilepsia**, v. 56, n. 6, p. 895–905, 2015. https://doi.org/10.1111/epi.12960.

BERG, A. T.; BERKOVIC, S. F.; BRODIE, M. J.; BUCHHALTER, J.; CROSS, J. H.; VAN EMDE BOAS, W.; ENGEL, J.; FRENCH, J.; GLAUSER, T. A.; MATHERN, G. W.; MOSHÉ, S. L.; NORDLI, D.; PLOUIN, P.; SCHEFFER, I. E. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. **Epilepsia**, v. 51, n. 4, p. 676-685, 2010. https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2010.02522.x.

BINDER, D. K.; STEINHÄUSER, C. Astrocytes and Epilepsy. **Neurochemical Research**, v. 46, n. 10, p. 2687-2695, 2021. https://doi.org/10.1007/s11064-021-03236-x.

BLÜMCKE, I.; THOM, M.; ARONICA, E.; ARMSTRONG, D. D.; BARTOLOMEI, F.; BERNASCONI, A.; BERNASCONI, N.; BIEN, C. G.; CENDES, F.; CORAS, R.; CROSS, J. H.; JACQUES, T. S.; KAHANE, P.; MATHERN, G. W.; MIYATA, H.; MOSHE, S. L.; OZ, B.; OZKARA, C.; PERUCCA, E.; SISODIYA, S.; WIEBE, S.; SPREAFICO, R. International consensus classification of hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy: a task force report from the ILAE Commission on diagnostic methods. **Epilepsia**, v. 54, n. 7, p. 1315-1329, 2013. https://doi.org/10.1111/epi.12220.

BLUME, W. T.; LÜDERS, H. O.; MIZRAHI, E.; TASSINARI, C.; BOAS, W. E.; ENGEL, J. Glossary of Descriptive Terminology for Ictal Semiology: report of the ILAE task force on classification and terminology. **Epilepsia**, v. 42, n. 9, p. 1212-1218, 2001. https://doi.org/10.1046/j.1528-1157.2001.22001.x.

BOCCARA, C. N.; KJONIGSEN, L. J.; HAMMER, I. M.; BJAALIE, J. G.; LEERGAARD, T. B.; WITTER, M P. A three-plane architectonic atlas of the rat hippocampal region. **Hippocampus**, v. 25, n. 7, p. 838-857, 2015. https://doi.org/10.1002/hipo.22407.

BONOSI, L.; BENIGNO, U. E.; MUSSO, S.; GIARDINA, K.; GERARDI, R. M.; BRUNASSO, L.; COSTANZO, R.; PAOLINI, F.; BUSCEMI, F.; AVALLONE, C.; GULINO, V.; IACOPINO, D. G.; MAUGERI, R. The Role of Aquaporins in Epileptogenesis - A Systematic Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 15, p. 11923, 2023. https://doi.org/10.3390/ijms241511923.

BORGES, K.; GEARING, M.; McDERMOTT, D. L.; SMITH, A. B.; ALMONTE, A. G.; WAINER, B. H.; DINGLEDINE, R. Neuronal and glial pathological changes during epileptogenesis in the mouse pilocarpine model. **Experimental Neurology**, v. 182, n. 1, p. 21-34, 2003. https://doi.org/10.1016/s0014-4886(03)00086-4.

BORGES, K.; MCDERMOTT, D.; IRIER, H.; SMITH, Y.; DINGLEDINE, R. Degeneration and proliferation of astrocytes in the mouse dentate gyrus after pilocarpine-induced status epilepticus. **Experimental Neurology**, v. 201, n. 2, p. 416-427, 2006. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2006.04.031.

BRODTKORB, E. Common imitators of epilepsy. Acta Neurologica Scandinavica, v. 127 (suppl. 196), p. 5-10, 2013. https://doi.org/10.1111/ane.12043.

BRONISZ, E.; CUDNA, A.; WIERZBICKA, A.; KURKOWSKA-JASTRZĘBSKA, I. Bloodbrain barrier-associated proteins are elevated in serum of epilepsy patients. **Cells**, v. 12, 368, 2023. https://doi.org/10.3390/cells12030368.

BUCKMASTER, P. S.; HANEY, M. M. Factors affecting outcomes of pilocarpine treatment in a mouse model of temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Research**, v. 102, n. 3, p. 153-159, 2012. http://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2012.05.012.

CAIN, S. M.; SNUTCH, T. P. Voltage-Gated Calcium Channels in Epilepsy. *In*: NOEBELS, J.
F. *et al.* (Eds.). Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies. 4. ed. Bethesda: Oxford University Press, 2012. p. 61-84.

CAMPOS, G.A.A. Avaliação da ação antiparkinsoniana do peptídeo Neurovespina no modelo murino da Doença de Parkinson. 2016. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal)
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

CAMPOS, G.A.A. **Investigação do mecanismo de ação e do alvo farmacológico do peptídeo neuroprotetor Neurovespina**. 2020. Tese (Doutorado em Biologia Animal) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2020.

CAPPAERT, N. L. M.; VAN STRIEN, N. M.; WITTER, M. P. Hippocampal formation. In: PAXINOS, G. (Ed.). **The Rat Nervous System**. 4. ed. Sydney: Academic Press, 2015. p. 512-573.

ÇARÇAK, N.; ONAT, F.; SITNIKOVA, E. Astrocytes as a target for therapeutic strategies in epilepsy: current insights. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 16, 1183775, 2023. https://doi.org/10.3389/fnmol.2023.1183775.

CARNEIRO, L.A. Avaliação antiepiléptica e neuroprotetora de dois peptídeos sintetizados a partir da Occidentalina-1202 isolada da vespa social *Polybia occidentalis*. 2013. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

CARNEIRO, L.A. Atividade antiepiléptica e neuroprotetora do peptídeo Neurovespina em um modelo crônico de Epilepsia do Lobo Temporal e avaliação da sua toxicidade aguda em camundongos Swiss. 2017. Tese (Doutorado em Biologia Básica e Translacional) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2017.

CAVALHEIRO, E. A.; SANTOS, N. F.; PRIEL, M. R. The pilocarpine model of epilepsy in mice. **Epilepsia**, v. 37, n. 10, p. 1015-1019, 1996. http://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1996.tb00541.x.

CHAKIR, A.; FABENE, P. F.; OUAZZANI, R.; BENTIVOGLIO, M. Drug resistance and hippocampal damage after delayed treatment of pilocarpine-induced epilepsy in the rat. **Brain Research Bulletin**, v. 71, n. 1-3, p. 127-138, 2006. https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2006.08.009.

CHEN, Y.; NAGIB, M. M.; YASMEN, N.; SLUTER, M. N.; LITTLEJOHN, T. L.; YU, Y.; JIANG, J. Neuroinflammatory mediators in acquired epilepsy: an update. **Inflammation Research**, v. 72, n. 4, p. 683-701, 2023. https://doi.org/10.1007/s00011-023-01700-8.

CHIAVEGATO, A.; ZUROLO, E.; LOSI, G.; ARONICA, E.; CARMIGNOTO, G. The inflammatory molecules IL-1 β and HMGB1 can rapidly enhance focal seizure generation in a

brain slice model of temporal lobe epilepsy. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 8, p. 155, 2014. https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00155.

CLASADONTE, J.; MOREL, L.; BARRIOS-CAMACHO, C. M.; CHIANG, M. S.; ZHANG, J.; IYER, L.; HAYDON, P. G.; YANG, Y. Molecular analysis of acute and chronic reactive astrocytes in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. **Neurobiology of Disease**, v. 91, p. 315-325, 2016. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.03.024.

COLLIGNON, F.; WETJEN, N. M.; COHEN-GADOL, A. A.; CASCINO, G. D.; PARISI, J.; MEYER, F. B.; MARSH, W. R.; ROCHE, P.; WEIGAND, S. D. Altered expression of connexin subtypes in mesial temporal lobe epilepsy in humans. **Journal of Neurosurgery**, v. 105, n. 1, p. 77-87, 2006. https://doi.org/10.3171/jns.2006.105.1.77.

COOPER, E. C. Potassium Channels (including KCNQ) and Epilepsy. *In*: NOEBELS, J. F. *et al.* (Eds.). **Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies**. 4. ed. Bethesda: Oxford University Press, 2012. p. 49-60.

CORAS, R.; BLÜMCKE, I. Clinico-pathological subtypes of hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy and their differential impact on memory impairment. **Neuroscience**, v. 309, p. 153-161, 2015. http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.08.003.

COUTO, M. **Practical Guide to Gas Anesthesia in Rodents** – Division of Laboratory and Animal Medicine of University of California in Los Angeles (UCLA). 2008. Disponível em: <https://labs.dgsom.ucla.edu/dlam/files/view/docs/education-andtraining/private/Anesthesia Machine Guide.pdf>. Acesso em: 12 jan. 2025.

CUNHA, A. O.; MORTARI, M. R.; LIBERATO, J. L.; DOS SANTOS, W. F. Neuroprotective effects of diazepam, carbamazepine, phenytoin and ketamine after pilocarpine-induced status epilepticus. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 104, n. 6, p. 470–477, 2009. https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2009.00403.x.

CURIA, G.; LONGO, D.; BIAGINI, G.; JONES, R. S. G.; AVOLI, M. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 172, p.143-157, 2008. http://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2008.04.019.

DAMBACH, H.; HINKEROHE, D.; PROCHNOW, N.; STIENEN, M. N.; MOINFAR, Z.; HAASE, C. G.; HUFNAGEL, A.; FAUSTMANN, P. M. Glia and epilepsy: experimental

investigation of antiepileptic drugs in an astroglia/microglia co-culture model of inflammation. **Epilepsia**, v. 55, n. 1, p. 184-192, 2014. https://doi.org/10.1111/epi.12473.

DAS, A.; WALLACE, G. C.; HOLMES, C.; McDOWELL, M. L.; SMITH, J. A.; MARSHALL, J. D.; BONILHA, L.; EDWARDS, J. C.; GLAZIER, S. S.; RAY, S. K.; BANIK, N. L. Hippocampal tissue of patients with refractory temporal lobe epilepsy is associated with astrocyte activation, inflammation, and altered expression of channels and receptors. **Neuroscience**, v. 220, p. 237-246, 2012. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.06.002.

DE BOER, H. M. Epilepsy stigma: moving from a global problem to global solutions. **Seizure**, v. 19, n. 10, p. 630-636, 2010. https://doi.org/10.1016/j.seizure.2010.10.017.

DEJAKAISAYA, H.; KWAN, P.; JONES, N. C. Astrocyte and glutamate involvement in the pathogenesis of epilepsy in Alzheimer's disease. **Epilepsia**, v. 62, n. 7, p. 1485-1493, 2021. https://doi.org/10.1111/epi.16918.

DESHPANDE, T.; LI, T.; HERDE, M. K.; BECKER, A.; VATTER, H.; SCHWARZ, M. K.; HENNEBERGER, C.; STEINHÄUSER, C.; BEDNER, P. Subcellular reorganization and altered phosphorylation of the astrocytic gap junction protein connexin43 in human and experimental temporal lobe epilepsy. **Glia**, v. 65, n. 11, p. 1809-1820, 2017. https://doi.org/10.1002/glia.23196.

DEVINSKY, O. Diagnosis and treatment of temporal lobe epilepsy. **Reviews in Neurological Diseases**, v. 1, n. 1, p. 2-9, 2004.

DEVINSKY, O. Sudden, Unexpected Death in Epilepsy. **New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 19, p. 1801-1811, 2011. http://doi.org/10.1056/nejmra1010481.

DI NUNZIO, M.; DI SAPIA, R.; SORRENTINO, D.; KEBEDE, V.; CEROVIC, M.; GULLOTTA, G. S.; BACIGALUPPI, M.; AUDINAT, E.; MARCHI, N.; RAVIZZA, T.; VEZZANI, A. Microglia proliferation plays distinct roles in acquired epilepsy depending on disease stages. **Epilepsia**, v. 62, n. 8, p. 1931-1945, 2021. https://doi.org/10.1111/epi.16956.

DIAMANTIS, A.; SIDIROPOULOU, K.; MAGIORKINIS, E. Epilepsy during the Middle Ages, the Renaissance and the Enlightenment. **Journal of Neurology**, v. 257, n. 5, p. 691-698, 2010. https://doi.org/10.1007/s00415-009-5433-7.

DUDEK, F. E.; STALEY, K. J. The Time Course and Circuit Mechanisms of Acquired Epileptogenesis. *In*: NOEBELS, J. F. *et al.* (Eds.). Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies. 4. ed. Bethesda: Oxford University Press, 2012. p. 465-478.

EL-WAHED, A.; YOSRI, N.; SAKR, H. H.; DU, M.; ALGETHAMI, A. F. M.; ZHAO, C.; ABDELAZEEM, A. H.; TAHIR, H. E.; MASRY, S. H. D.; ABDEL-DAIM, M. M.; MUSHARRAF, S. G.; EL-GARAWANI, I.; KAI, G.; AL NAGGAR, Y.; KHALIFA, S. A. M.; EL-SEEDI, H. R. Wasp venom biochemical components and their potential in biological applications and nanotechnological interventions. **Toxins**, v. 13, n. 3, p. 206, 2021. https://doi.org/10.3390/toxins13030206.

ENGEL, J. Mesial Temporal Lobe Epilepsy: what have we learned?. **The Neuroscientist**, v. 7, n. 4, p. 340-352, 2001. https://doi.org/10.1177/107385840100700410.

ERICKSON, M. A.; DOHI, K.; BANKS, W. A. Neuroinflammation: a common pathway in CNS diseases as mediated at the blood-brain barrier. **Neuroimmunomodulation**, v. 19, n. 2, p. 121-130, 2012. https://doi.org/10.1159/000330247.

ESCARTIN, C.; GALEA, E.; LAKATOS, A.; O'CALLAGHAN, J. P.; PETZOLD, G. C.; SERRANO-POZO, A.; STEINHÄUSER, C.; VOLTERRA, A.; CARMIGNOTO, G.; AGARWAL, A.; ALLEN, N. J.; ARAQUE, A.; BARBEITO, L.; BARZILAI, A.; BERGLES, D. E.; BONVENTO, G.; BUTT, A. M.; CHEN, W. T.; COHEN-SALMON, M.; CUNNINGHAM, C.; DENEEN, B.; DE STROOPER, B.; DÍAZ-CASTRO, B.; FARINA, C.; FREEMAN, M.; GALLO, V.; GOLDMAN, J. E.; GOLDMAN, S. A.; GÖTZ, M.; GUTIÉRREZ, A.; HAYDON, P. G.; HEILAND, D. H.; HOL, E. M.; HOLT, M. G.; IINO, M.; KASTANENKA, K. V.; KETTENMANN, H.; KHAKH, B. S.; KOIZUMI, S.; LEE, C. J.; LIDDELOW, S. A.; MACVICAR, B. A.; MAGISTRETTI, P.; MESSING, A.; MISHRA, A.; MOLOFSKY, A. V.; MURAI, K. K.; NORRIS, C. M.; OKADA, S.; OLIET, S. H. R.; OLIVEIRA, J. F.; PANATIER, A.; PARPURA, V.; PEKNA, M.; PEKNY, M.; PELLERIN, L.; PEREA, G.; PÉREZ-NIEVAS, B. G.; PFRIEGER, F. W.; POSKANZER, K. E.; QUINTANA, F. J.; RANSHOFF, R. M.; RIQUELME-PEREZ, M.; ROBEL, S.; ROSE, C. R.; ROTHSTEIN, J. D.; ROUACH, N.; ROWITCH, D. H.; SEMYANOV, A.; SIRKO, S.; SONTHEIMER, H.; SWANSON, R. A.; VITORICA, J.; WANNER, I. B.; WOOD, L. B.; WU, J.; ZHENG, B.; ZIMMER, E. R.; ZOREC, R.; SOFRONIEW, M. V.; VERKHRATSKY, A. Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. Nature Neuroscience, v. 24, n. 3, p. 312-325, 2021. https://doi.org/10.1038/s41593-020-00783-4.

ESPINOSA-PARRILLA, J. F.; MARTÍNEZ-MORENO, M.; GASULL, X.; MAHY, N.; RODRÍGUEZ, M. J. The L-type voltage-gated calcium channel modulates microglial proinflammatory activity. **Molecular and Cellular Neurosciences**, v. 64, p. 104-115, 2015. https://doi.org/10.1016/j.mcn.2014.12.004.

ESTRADA, F. S.; HERNÁNDEZ, V. S.; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, E.; CORONA-MORALES, A. A.; SOLÍS, H.; ESCOBAR, A.; ZHANG, L. Glial activation in a pilocarpine rat model for epileptogenesis: a morphometric and quantitative analysis. **Neuroscience Letters**, v. 514, n. 1, p. 51-56, 2012. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2012.02.055.

EYO, U. B.; HARUWAKA, K.; MO, M.; CAMPOS-SALAZAR, A. B.; WANG, L.; SPEROS, X. S.; SABU, S.; XU, P.; WU, L. J. Microglia provide structural resolution to injured dendrites after severe seizures. **Cell Reports**, v. 35, n. 5, 109080, 2021. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109080.

FAN, J.; DONG, X.; TANG, Y.; WANG, X.; LIN, D.; GONG, L.; CHEN, C.; JIANG, J.; SHEN,
W.; XU, A.; ZHANG, X.; XIE, Y.; HUANG, X.; ZENG, L. Preferential pruning of inhibitory synapses by microglia contributes to alteration of the balance between excitatory and inhibitory synapses in the hippocampus in temporal lobe epilepsy. CNS Neurosciences & Therapeutics,
v. 29, n. 10, p. 2884-2900, 2023. https://doi.org/10.1111/cns.14224.

FERRERI, M. C.; GUTIÉRREZ, M. L.; GRAVIELLE, M. C. Tolerance to the sedative and anxiolytic effects of diazepam is associated with different alterations of GABAA receptors in rat cerebral cortex. **Neuroscience**, v. 310, p. 152-162, 2015. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.09.038.

FISHER, R. S.; ACEVEDO, C.; ARZIMANOGLOU, A.; BOGACZ, A.; CROSS, J. H.; ELGER, C. E.; ENGEL, J.; FORSGREN, L.; FRENCH, J. A.; GLYNN, M. ILAE Official Report: a Practical Clinical Definition of Epilepsy. **Epilepsia**, v. 55, n. 4, p. 475-482, 2014. https://doi.org/10.1111/epi.12550.

FISHER, R. S.; CROSS, J. H.; FRENCH, J. A.; HIGURASHI, N.; HIRSCH, E.; JANSEN, F. E.; LAGAE, L.; MOSHÉ, S. L.; PELTOLA, J.; ROULET PEREZ, E.; SCHEFFER, I. E.; ZUBERI, S. M. Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. **Epilepsia**, v. 58, n. 4, p. 522-530, 2017. https://doi.org/10.1111/epi.13670.

FONSECA, C. G.; GREEN, C. R.; NICHOLSON, L. F. Upregulation in astrocytic connexin 43 gap junction levels may exacerbate generalized seizures in mesial temporal lobe epilepsy. **Brain Research**, v. 929, n. 1, p. 105-116, 2002. https://doi.org/10.1016/s0006-8993(01)03289-9.

FRANCIOSI, S.; CHOI, H. B.; KIM, S. U.; MCLARNON, J. G. Interferon-gamma acutely induces calcium influx in human microglia. **Journal of Neuroscience Research**, v. 69, n. 5, p. 607-613, 2002. https://doi.org/10.1002/jnr.10331.

FUJIKAWA, D. G. The temporal evolution of neuronal damage from pilocarpine-induced status epilepticus. **Brain Research**, v. 725, n. 1, p. 11-22, 1996. https://doi.org/10.1016/0006-8993(96)00203-x.

FUJIKAWA, D. G.; SHINMEI, S. S.; CAI, B. Lithium-pilocarpine-induced status epilepticus produces necrotic neurons with internucleosomal DNA fragmentation in adult rats. **The European Journal of Neuroscience**, v. 11, n. 5, p. 1605-1614, 1999. https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1999.00573.x.

FUJIKAWA, D. G.; SHINMEI, S. S.; CAI, B. Seizure-induced neuronal necrosis: implications for programmed cell death mechanisms. **Epilepsia**, v. 41, Suppl 6 S9-S13, 2000. https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.2000.tb01549.x.

GANGOSO, E.; TALAVERÓN, R.; JARAÍZ-RODRÍGUEZ, M.; DOMÍNGUEZ-PRIETO, M.; EZAN, P.; KOULAKOFF, A.; MEDINA, J. M.; GIAUME, C.; TABERNERO, A. A c-Src inhibitor peptide based on connexin43 exerts neuroprotective effects through the inhibition of glial hemichannel activity. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 10, p. 418, 2017. https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00418.

GARZILLO, C. L.; MELLO, L. E. Characterization of reactive astrocytes in the chronic phase of the pilocarpine model of epilepsy. **Epilepsia**, v. 43, suppl. 5, p. 107-109, 2002. https://doi.org/10.1046/j.1528-1157.43.s.5.40.x.

GBD 2016 EPILEPSY COLLABORATORS. Global, regional, and national burden of epilepsy, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **The Lancet Neurology**, v. 18, n. 4, p. 357–375, 2019. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30454-X.

GIBBS-SHELTON, S.; BENDEROTH, J.; GAYKEMA, R. P.; STRAUB, J.; OKOJIE, K. A.; UWERU, J. O.; LENTFERINK, D. H.; RAJBANSHI, B.; COWAN, M. N.; PATEL, B.; CAMPOS-SALAZAR, A. B.; PEREZ-REYES, E.; EYO, U. B. Microglia play beneficial roles in multiple experimental seizure models. Glia, v. 71, n. 7, p. 1699-1714, 2023. https://doi.org/10.1002/glia.24364.

GOGHARI, V.; FRANCIOSI, S.; KIM, S. U.; LEE, Y. B.; McLARNON, J. G. Acute application of interleukin-1beta induces Ca(2+) responses in human microglia. **Neuroscience Letters**, v. 281, n. 2-3, p. 83-86, 2000. https://doi.org/10.1016/s0304-3940(00)00824-7.

GOMES, F. M. M. Avaliação antiepiléptica do peptídeo Neuropolybina no modelo crônico de Epilepsia do Lobo Temporal induzido por pilocarpina em camundongos. 2016. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

GÓMEZ, C. D.; BUIJS, R. M.; SITGES, M. The anti-seizure drugs vinpocetine and carbamazepine, but not valproic acid, reduce inflammatory IL-1 β and TNF- α expression in rat hippocampus. **Journal of Neurochemistry**, v. 130, n. 6, p. 770-779, 2014. https://doi.org/10.1111/jnc.12784.

GREENE, C.; HANLEY, N.; CAMPBELL, M. Claudin-5: gatekeeper of neurological function. Fluids and Barriers of the CNS, v. 16, n. 1, 3, 2019. https://doi.org/10.1186/s12987-019-0123z.

GREENE, C.; HANLEY, N.; RESCHKE, C. R.; REDDY, A.; MÄE, M. A.; CONNOLLY, R.; BEHAN, C.; O'KEEFFE, E.; BOLGER, I.; HUDSON, N.; DELANEY, C.; FARRELL, M. A.; O'BRIEN, D. F.; CRYAN, J.; BRETT, F. M.; BEAUSANG, A.; BETSHOLTZ, C.; HENSHALL, D. C.; DOHERTY, C. P.; CAMPBELL, M. Microvascular stabilization via bloodbrain barrier regulation prevents seizure activity. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, 2022. https://doi.org/10.1038/s41467-022-29657-y.

GUO, A.; ZHANG, H.; LI, H.; CHIU, A.; GARCÍA-RODRÍGUEZ, C.; LAGOS, C. F.; SÁEZ, J. C.; LAU, C. G. Inhibition of connexin hemichannels alleviates neuroinflammation and hyperexcitability in temporal lobe epilepsy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 119, n. 45, e2213162119, 2022. https://doi.org/10.1073/pnas.2213162119.

HASEL, P.; LIDDELOW, S. A. Astrocytes. **Current Biology**, v. 31, n. 7, p. R326-R327, 2021. https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.01.056. HE, W.; WANG, Y.; CHEN, K. A real-world pharmacovigilance study of FDA adverse event reporting system events for diazepam. **Frontiers in Pharmacology**, v. 15, 1278442, 2024. https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1278442.

HENNING, L.; ANTONY, H.; BREUER, A.; MÜLLER, J.; SEIFERT, G.; AUDINAT, E.; SINGH, P.; BROSSERON, F.; HENEKA, M. T.; STEINHÄUSER, C.; BEDNER, P. Reactive microglia are the major source of tumor necrosis factor alpha and contribute to astrocyte dysfunction and acute seizures in experimental temporal lobe epilepsy. **Glia**, v. 71, n. 2, p. 168-186, 2023. https://doi.org/10.1002/glia.24265.

HEO, K.; CHO, Y. J.; CHO, K. J.; KIM, H. W.; KIM, H. J.; SHIN, H. Y.; LEE, B. I.; KIM, G.
W. Minocycline inhibits caspase-dependent and -independent cell death pathways and is neuroprotective against hippocampal damage after treatment with kainic acid in mice.
Neuroscience Letters, v. 398, n. 3, p. 195-200, 2006. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.01.027.

HICKMAN, S.; IZZY, S.; SEN, P.; MORSETT, L.; EL KHOURY, J. Microglia in neurodegeneration. **Nature Neuroscience**, v. 21, n. 10, p. 1359-1369, 2018. https://doi.org/10.1038/s41593-018-0242-x.

HIRAGI, T.; IKEGAYA, Y.; KOYAMA, R. Microglia after seizures and in epilepsy. **Cells**, v. 7, n. 4, 26, 2018. https://doi.org/10.3390/cells7040026.

HOFFMANN, A.; KANN, O.; OHLEMEYER, C.; HANISCH, U.K.; KETTENMANN, H. Elevation of basal intracellular calcium as a central element in the activation of brain macrophages (microglia): Suppression of receptor-evoked calcium signaling and control of release function. **Journal of Neuroscience**, v. 23, p. 4410-4419, 2003. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-11-04410.2003.

HOPKER, C. C.; BERBERIAN, A. P.; MASSI, G.; WILLIG, M. H.; TONOCCHI, R. A pessoa com epilepsia: percepções acerca da doença e implicações na qualidade de vida. **CoDAS**, v. 29, n. 1, e20150236, 2017. https://doi.org/10.1590/2317-1782/20172015236.

HOPP, S. C. Targeting microglia L-type voltage-dependent calcium channels for the treatment of central nervous system disorders. **Journal of Neuroscience Research**, v. 99, n. 1, p. 141-162, 2020. https://doi.org/10.1002/jnr.24585.

HU, Y.; YAO, Y.; QI, H.; YANG, J.; ZHANG, C.; ZHANG, A.; LIU, X.; ZHANG, C.; GAN,
G.; ZHU, X. Microglia sense and suppress epileptic neuronal hyperexcitability.
Pharmacological Research, v. 195, 106881, 2023.
https://doi.org/10.1016/j.phrs.2023.106881.

INSAUSTI, R.; AMARAL, D. G. Hippocampal formation. In: PAXINOS, G.; MAI, J. K. (Eds.). The Human Nervous System. 2. ed. California: Academic Press, 2004. p. 872-915.

INSAUSTI. R.; MUÑOZ-LÓPEZ, M.; INSAUSTI, A. M.; ARTACHO-PÉRULA, E. The Human Periallocortex: Layer Pattern in Presubiculum, Parasubiculum and Entorhinal Cortex. A Review. Frontiers in Neuroanatomy, v. 11, n. 84, 2017. https://10.3389/fnana.2017.00084.

INTERNATIONAL LEAGUE AGAINST EPILEPSY. **ILAE Goals, Mission, and Strategy**, 2024. Disponível em: https://www.ilae.org/about-ilae/ilae-mission-goals-and-strategy. Acesso em: 19 dez. 2024.

JACKSON, J. H. A Study of Convulsions. Archives of Neurology, v. 22, n. 2, p. 184-188, 1970. https://doi.org/10.1001/archneur.1970.00480200090012.

JACKSON, J. H. The Lumleian Lectures on Convulsive Seizures. **British Medical Journal**, v. 1, n. 1526, p. 703-707, 1890. https://doi.org/10.1136/bmj.1.1526.703.

JIAO, Y.; SUN, Z.; LEE, T.; FUSCO, F. R ; KIMBLE, T. D.; MEADE, C. A.; CUTHBERTSON, S.; REINER, A. A simple and sensitive antigen retrieval method for free-floating and slidemounted tissue sections. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 93, n. 2, p. 149-162, 1999. http://doi.org/10.1016/s0165-0270(99)00142-9.

KIM, D. S.; KIM, J. E.; KWAK, S. E.; CHOI, K. C.; KIM, D. W.; KWON, O. S.; CHOI, S. Y.; KANG, T. C. Spatiotemporal characteristics of astroglial death in the rat hippocampoentorhinal complex following pilocarpine-induced status epilepticus. The **Journal of Comparative Neurology**, v. 511, n. 5, p. 581-598, 2008. https://doi.org/10.1002/cne.21851.

KINBOSHI, M.; IKEDA, A.; OHNO, Y. Role of Astrocytic Inwardly Rectifying Potassium (Kir) 4.1 Channels in Epileptogenesis. **Frontiers in Neurology**, v. 11, 626658, 2020. https://doi.org/10.3389/fneur.2020.626658.

KWAN, P.; ARZIMANOGLOU, A.; BERG, A. T.; BRODIE, M. J.; HAUSER, W. A.; MATHERN, G.; MOSHÉ, S. L.; PERUCCA, E.; WIEBE, S.; FRENCH, J. Definition of drug resistant epilepsy: consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE commission on

therapeutic strategies. **Epilepsia**, v. 51, n. 6, p. 1069-1077, 2010. http://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2009.02397.x.

KWON, C. S.; JACOBY, A.; ALI, A.; AUSTIN, J.; BIRBECK, G. L.; BRAGA, P.; CROSS, J. H.; DE BOER, H.; DUA, T.; FERNANDES, P. T.; FIEST, K. M.; GOLDSTEIN, J.; HAUT, S.; LORENZETTI, D.; MIFSUD, J.; MOSHE, S.; PARKO, K. L.; TRIPATHI, M.; WIEBE, S.; JETTE, N. Systematic review of frequency of felt and enacted stigma in epilepsy and determining factors and attitudes toward persons living with epilepsy - Report from the International League Against Epilepsy Task Force on Stigma in Epilepsy. **Epilepsia**, v. 63, n. 3, p. 573–597, 2022. https://doi.org/10.1111/epi.17135.

LABAT, R. Traité Akkadien de Diagnostics et Pronostics Médicaux. 1^a ed. Leiden: Académie Internationale d'Histoire des Sciences, 1951. Disponível em: <https://archive.org/details/traitakkadiended0000laba/mode/2up>.

LAMBERT, T. J. FPbase: a community-editable fluorescent protein database. **Nature Methods**, v. 16, n. 4, p. 277-278, 2019. http://doi.org/10.1038/s41592-019-0352-8.

LÉVESQUE, M.; BIAGINI, G.; CURTIS, M.; GNATKOVSKY, V.; PITSCH, J.; WANG, S.; AVOLI, M. The pilocarpine model of mesial temporal lobe epilepsy: over one decade later, with more rodent species and new investigative approaches. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 130, p. 274-291, 2021. https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.08.020.

LEVIN-ARAMA, M.; ABRAHAM, L.; WANER, T.; HARMELIN, A.; STEINBERG, D. M.; LAHAV, T.; HARLEV, M. Subcutaneous Compared with Intraperitoneal Ketamine-Xylazine for Anesthesia of Mice. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science, v. 55, n. 6, p. 794-800, 2016.

LIDDELOW, S. A.; GUTTENPLAN, K. A.; CLARKE, L. E.; BENNETT, F. C.; BOHLEN, C. J.; SCHIRMER, L.; BENNETT, M. L.; MÜNCH, A. E.; CHUNG, W. S.; PETERSON, T. C.; WILTON, D. K.; FROUIN, A.; NAPIER, B. A.; PANICKER, N.; KUMAR, M.; BUCKWALTER, M. S.; ROWITCH, D. H.; DAWSON, V. L.; DAWSON, T. M.; STEVENS, B.; BARRES, B. A. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. **Nature**, v. 541, n. 7638, p. 481-487, 2017. https://doi.org/10.1038/nature21029.

LIMA, L. S.; LOYOLA, V.; BICCA, J. V. M. L.; FARO, L.; VALE, C. L. C.; LOTUFO DENUCCI, B.; MORTARI, M. R. Innovative treatments for epilepsy: Venom peptides,

cannabinoids, and neurostimulation. **Journal of Neuroscience Research**, v. 100, n. 11, p. 1969-1986, 2022. https://doi.org/10.1002/jnr.25114.

LIU, M.; JIANG, L.; WEN, M.; KE, Y.; TONG, X.; HUANG, W.; CHEN, R. Microglia depletion exacerbates acute seizures and hippocampal neuronal degeneration in mouse models of epilepsy. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, v. 319, n. 3, p. C605-C610, 2020. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00205.2020.

LOPES, K. S.; QUINTANILHA, M. V. T.; DE SOUZA, A. C. B.; ZAMUDIO-ZUÑIGA, F.; POSSANI, L. D.; MORTARI, M. R. Antiseizure potential of peptides from the venom of social wasp Chartergellus communis against chemically-induced seizures. **Toxicon**, v. 194, p. 23-36, 2021. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2021.02.009.

LÖSCHER, W. Animal models of intractable epilepsy. **Progress In Neurobiology**, v. 53, n. 2, p. 239-258, 1997. http://doi.org/10.1016/s0301-0082(97)00035-x.

LÖSCHER, W. Epilepsy and Alterations of the Blood–Brain Barrier: Cause or Consequence of Epileptic Seizures or Both?. In: CADER, Z.; NEUHAUS, W. (Eds.). Physiology, Pharmacology and Pathology of the Blood-Brain Barrier. Handbook of Experimental Pharmacology, vol 273. Cham: Springer, 2020. https://doi.org/10.1007/164 2020 406

LÖSCHER, W.; HIRSCH, L. J.; SCHMIDT, D. The enigma of the latent period in the development of symptomatic acquired epilepsy — Traditional view versus new concepts. **Epilepsy & Behavior**, v. 52, p. 78-92, 2015. http://doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.08.037.

LÖSCHER, W.; POTSCHKA, H.; SISODIYA, S. M.; VEZZANI, A. Drug Resistance in Epilepsy: clinical impact, potential mechanisms, and new innovative treatment options. **Pharmacological Reviews**, v. 72, n. 3, p. 606-638, 2020. http://doi.org/10.1124/pr.120.019539.

MAGIORKINIS, E.; SIDIROPOULOU, K.; DIAMANTIS, A. Hallmarks in the History of Epilepsy: Epilepsy in Antiquity. **Epilepsy & Behavior**, v. 17, n. 1, p.103-108, 2010. https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2009.10.023.

MANTEGAZZA, M.; CATTERALL, W. A. Voltage-Gated Na⁺ Channels: Structure, Function, and Pathophysiology . *In*: NOEBELS, J. F. *et al.* (Eds.). Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies. 4. ed. Bethesda: Oxford University Press, 2012. p. 33-48.

MARCHI, N.; LERNER-NATOLI, M. Cerebrovascular remodeling and epilepsy. **Neuroscientist**, v. 19, p. 304-312, 2013. https://doi.org/10.1177/1073858412462747.

MARQUES, F. V. B. S. **Desenvolvimento de uma nanoemulsão com o neuropeptídeo Neurovespina: avanços na terapia antiepiléptica e neuroprotetora**. 2024. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2024.

MAYADAS, T. N.; JOHNSON, R. C.; RAYBURN, H.; HYNES, R. O.; WAGNER, D. D. Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P selectin-deficient mice. **Cell**, v. 74, n. 3, p. 541-554, 1993. http://doi.org/10.1016/0092-8674(93)80055-j.

MCLARNON, J. G.; FRANCIOSI, S.; WANG, X.; BAE, J. H.; CHOI, H. B.; KIM, S. U. Acute actions of tumor necrosis factor-alpha on intracellular Ca(2+) and K(+) currents in human microglia. **Neuroscience**, v. 104, n. 4, p. 1175-1184, 2001. https://doi.org/10.1016/s0306-4522(01)00119-1.

MEDEL-MATUS, J. S.; ÁLVAREZ-CRODA, D. M.; MARTÍNEZ-QUIROZ, J.; BELTRÁN-PARRAZAL, L.; MORGADO-VALLE, C.; LÓPEZ-MERAZ, M. L. IL-1β increases necrotic neuronal cell death in the developing rat hippocampus after status epilepticus by activating type I IL-1 receptor (IL-1RI). **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 38, p. 232-240, 2014. https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2014.09.006.

MENDES, N. F.; PANSANI, A. P.; CARMANHÃES, E. R. F.; TANGE, P.; MEIRELES, J. V.; OCHIKUBO, M.; CHAGAS, J. R.; DA SILVA, A. V.; MONTEIRO DE CASTRO, G.; LE SUEUR-MALUF, L. The blood-brain barrier breakdown during acute phase of the pilocarpine model of epilepsy is dynamic and time-dependent. **Frontiers in Neurology**, v. 10, 382, 2019. https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00382.

MERLINI, M.; RAFALSKI, V. A.; MA, K.; KIM, K. Y.; BUSHONG, E. A.; RIOS CORONADO, P. E.; YAN, Z.; MENDIOLA, A. S.; SOZMEN, E. G.; RYU, J. K.; HABERL, M. G.; MADANY, M.; SAMPSON, D. N.; PETERSEN, M. A.; BARDEHLE, S.; TOGNATTA, R.; DEAN, T., Jr.; ACEVEDO, R. M.; CABRIGA, B.; THOMAS, R.; COUGHLIN, S. R.; ELLISMAN, M. H.; PALOP, J. J.; AKASSOGLU, K. Microglial Gi-dependent dynamics regulate brain network hyperexcitability. **Nature Neuroscience**, v. 24, n. 1, p. 19-23, 2021. https://doi.org/10.1038/s41593-020-00756-7.

MICHINAGA, S.; KOYAMA, Y. Dual Roles of Astrocyte-Derived Factors in Regulation of Blood-Brain Barrier Function after Brain Damage. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 3, 571, 2019. https://doi.org/10.3390/ijms20030571.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Epilepsia**, 2019. Disponível em: http://antigo-19.pdf>. Acesso em: 03 dez. 2024.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais**, 2022. Disponível em: https://www.conass.org.br/wp-content/uploads/2022/01/RENAME-2022.pdf>. Acesso em: 03 dez. 2024.

MODEBADZE, T.; MORGAN, N. H.; PÉRÈS, I. A.; HADID, R. D.; AMADA, N.; HILL, C.; WILLIAMS, C.; STANFORD, I. M.; MORRIS, C. M.; JONES, R. S.; WHALLEY, B. J.; WOODHALL, G. L. A Low Mortality, High Morbidity Reduced Intensity Status Epilepticus (RISE) Model of Epilepsy and Epileptogenesis in the Rat. **PloS One**, v. 11, n. 2, e0147265, 2016. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147265.

MORENO, C.; HERMOSILLA, T.; HARDY, P.; ABALLAI, V.; ROJAS, P.; VARELA, D. Cav1.2 activity and downstream signaling pathways in the hippocampus of an animal model of depression. **Cells**, v. 9, p. 2609, 2020. https://doi.org/10.3390/cells9122609.

MORIN-BRUREAU, M.; MILIOR, G.; ROYER, J.; CHALI, F.; LE DUIGOU, C.; SAVARY, E.; BLUGEON, C.; JOURDREN, L.; AKBAR, D.; DUPONT, S.; NAVARRO, V.; BAULAC, M.; BIELLE, F.; MATHON, B.; CLEMENCEAU, S.; MILES, R. Microglial phenotypes in the human epileptic temporal lobe. **Brain**, v. 141, n. 12, p. 3343-3360, 2018. https://doi.org/10.1093/brain/awy276.

MORTARI, M. R.; CUNHA, A. O. S.; DOS ANJOS, L. C.; AMARAL, H. O.; QUINTANILHA, M. V. T.; GELFUSO, E. A.; HOMEM-DE-MELLO, M.; DE ALMEIDA, H.; REGO, S.; MAIGRET, B.; LOPES, N. P.; DOS SANTOS, W. F. A new class of peptides from wasp venom: a pathway to antiepileptic/neuroprotective drugs. **Brain Communications**, v. 5, n. 1, fcad016, 2023. https://doi.org/10.1093/braincomms/fcad016.

MORTARI, M.R. Atividade neurobiológica e caracterização química da peçonha da vespa social *Polybia occidentalis* (Hymenoptera, Vespidae): identificação de peptídeos antinociceptivos e anticonvulsivantes. 2007. Tese (Doutorado em Psicobiologia) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007. MORTARI, M.R.; CARNEIRO, L.C. Peptídeo modificado da peçonha de vespa social e seu uso como antiepiléptico e neuroprotetor. BR1020140047280. Depósito: 27 fev. 2014. Licenciamento: 04 dez. 2017.

MORTARI, M.R.; CUNHA, A.O.S.; OLIVEIRA, L.; VIEIRA, E.B.; GELFUSO, E.A.; COUTINHO-NETTO, J.; SANTOS, W.F. Anticonvulsant and behavioural effects of the denatured venom of the social wasp *Polybia occidentalis* (Polistinae, Vespidae). **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 97, n. 5, p. 289-295, 2005. https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2005.pto_137.x.

MÜLLER, J.; TIMMERMANN, A.; HENNING, L.; MÜLLER, H.; STEINHÄUSER, C.; BEDNER, P. Astrocytic GABA accumulation in experimental temporal lobe epilepsy. **Frontiers in Neurology**, v. 11, 614923, 2020. https://doi.org/10.3389/fneur.2020.61492.

NAGELHUS, E. A.; MATHIISEN, T. M.; OTTERSEN, O. P. Aquaporin-4 in the central nervous system: cellular and subcellular distribution and coexpression with K_{ir}4.1. **Neuroscience**, v. 129, n. 4, p. 905-913, 2004. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.08.053.

NASCIMENTO, A. L.; SANTOS, N. F.; PELÁGIO, F. C.; TEIXEIRA, S. A.; FERRARI, E. A. M.; LANGONE, F. Neuronal degeneration and gliosis time-course in the mouse hippocampal formation after pilocarpine-induced status epilepticus. **Brain Research**, v. 1470, p. 98-110, 2012. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.06.008.

NEVES, G.; COOKE, S. F.; BLISS, T. V. P. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 9, n. 1, p. 65-75, 2008. https://doi.org/10.1038/nrn2303.

NICOTERA, P.; LEIST, M.; MANZO, L. Neuronal cell death: a demise with different shapes. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 20, n. 2, p. 46-51. https://doi.org/10.1016/s0165-6147(99)01304-8.

NIKOLIC, L.; SHEN, W.; NOBILI, P.; VIRENQUE, A.; ULMANN, L.; AUDINAT, E. Blocking TNFα-driven astrocyte purinergic signaling restores normal synaptic activity during epileptogenesis. **Glia**, v. 66, n. 12, p. 2673-2683, 2018. https://doi.org/10.1002/glia.23519.

NOE, F. M.; POLASCHECK, N.; FRIGERIO, F.; BANKSTAHL, M.; RAVIZZA, T.; MARCHINI, S.; BELTRAME, L.; BANDERÓ, C. R.; LÖSCHER, W.; VEZZANI, A. Pharmacological blockade of IL-1β/IL-1 receptor type 1 axis during epileptogenesis provides neuroprotection in two rat models of temporal lobe epilepsy. **Neurobiology of Disease**, v. 59, p. 183-193, 2013. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2013.07.015.

OLIVEIRA, A. N.; SOARES, A. M.; SILVA, S. L. Why to study peptides from venomous and poisonous animals? **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 29, 76, 2023. https://doi.org/10.1007/s10989-023-10543-0.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Epilepsy**, 2024. Disponível em: ">https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/epile

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Epilepsy: a public health imperative**. Geneva: World Health Organization, 2019. 171 p.

PÁDUA-REIS, M.; NÔGA, D. A.; TORT, A. B. L.; BLUNDER, M. Diazepam causes sedative rather than anxiolytic effects in C57BL/6J mice. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 9335, 2021. https://doi.org/10.1038/s41598-021-88599-5.

PATANI, R.; HARDINGHAM, G. E.; LIDDELOW, S. A. Functional roles of reactive astrocytes in neuroinflammation and neurodegeneration. **Nature Reviews Neurology**, v. 19, n. 7, p. 395-409, 2023. https://doi.org/10.1038/s41582-023-00822-1.

PATEL, D. C.; TEWARI, B. P.; CHAUNSALI, L.; SONTHEIMER, H. Neuron-glia interactions in the pathophysiology of epilepsy. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 20, n. 5, p. 282-297, 2019. http://doi.org/10.1038/s41583-019-0126-4.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates**. 2^a ed. California, EUA: Academic Press, 2004. 136 p.

PEKNY, M.; PEKNA, M. Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. **Physiological Reviews**, v. 94, n. 4, p. 1077-1098, 2014. https://doi.org/10.1152/physrev.00041.2013.

PETERSON, A. R.; BINDER, D. K. Regulation of Synaptosomal GLT-1 and GLAST during Epileptogenesis. **Neuroscience**, v. 411, p. 185-201, 2019. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.05.048.

PETERSON, A. R.; GARCIA, T. A.; CULLION, K.; TIWARI-WOODRUFF, S. K.; PEDAPATI, E. V.; BINDER, D. K. Targeted overexpression of glutamate transporter-1 reduces

seizures and attenuates pathological changes in a mouse model of epilepsy. **Neurobiology of Disease**, v. 157, 105443, 2021. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2021.105443.

PITKÄNEN, A.; LUKASIUK, K. Mechanisms of epileptogenesis and potential treatment targets. **The Lancet Neurology**, v. 10, n. 2, p. 173-186, 2011. http://doi.org/10.1016/s1474-4422(10)70310-0.

PITKÄNEN, A.; LUKASIUK, K.; DUDEK, F. E.; STALEY, K. J. Epileptogenesis. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, v. 5, n. 10, a022822, 2015. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022822.

POLLARD, H.; CHARRIAUT-MARLANGUE, C.; CANTAGREL, S.; REPRESA, A.; ROBAIN, O.; MOREAU, J.; BEN-ARI, Y. Kainate-induced apoptotic cell death in hippocampal neurons. **Neuroscience**, v. 63, n. 1, p. 7-18, 1994. https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)90003-5.

PRACUCCI, E.; PILLAI, V.; LAMERS, D.; PARRA, R.; LANDI, S. Neuroinflammation: a signature or a cause of epilepsy?. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 13, 6981, 2021. https://doi.org/10.3390/ijms22136981.

PROPER, E. A.; HOOGLAND, G.; KAPPEN, S. M.; JANSEN, G. H.; RENSEN, M. G.; SCHRAMA, L. H.; VAN VEELEN, C. W.; VAN RIJEN, P. C.; VAN NIEUWENHUIZEN, O.; GISPEN, W. H.; DE GRAAN, P. N. Distribution of glutamate transporters in the hippocampus of patients with pharmaco-resistant temporal lobe epilepsy. **Brain**, v. 125, p. 32-43, 2002. https://doi.org/10.1093/brain/awf001.

QUINTANILHA, M. V. T.; GOBBO, G. A. M.; PINHEIRO, G. B.; SOUZA, A. C. B.; CAMARGO, L. C.; MORTARI, M. R. Evaluating a venom-bioinspired peptide, NOR-1202, as an antiepileptic treatment in male mice models. **Toxins**, v. 16, n. 8, 342, 2024. https://doi.org/10.3390/toxins16080342.

RACINE, R. J. Modification of seizure activity by electrical stimulation: ii. motor seizure. **Electroencephalography and Clinical Neurophysiology**, v. 32, n. 3, p. 281-294, 1972. http://doi.org/10.1016/0013-4694(72)90177-0.

RAIVICH, G.; JONES, L. L.; WERNER, A.; BLÜTHMANN, H.; DOETSCHMANN, T.; KREUTZBERG, G. W. Molecular signals for glial activation: pro- and anti-inflammatory

cytokines in the injured brain. Acta Neurochirurgica Supplement, v. 73, p. 21-30, 1999. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6391-7_4.

RAMANDI, D.; ELAHDADI SALMANI, M.; MOGHIMI, A.; LASHKARBOLIOUKI, T.; FEREIDONI, M. Pharmacological upregulation of GLT-1 alleviates the cognitive impairments in the animal model of temporal lobe epilepsy. **PloS One**, v. 16, n. 1, e0246068, 2021. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246068.

RAMSEY-WILLIAMS, V. A.; WU, Y.; ROSENBERG, H. C. Comparison of anticonvulsant tolerance, crosstolerance, and benzodiazepine receptor binding following chronic treatment with diazepam or midazolam. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 48, n. 3, p. 765-772, 1994. https://doi.org/10.1016/0091-3057(94)90344-1.

REISS, Y.; BAUER, S.; DAVID, B.; DEVRAJ, K.; FIDAN, E.; HATTINGEN, E.; LIEBNER, S.; MELZER, N.; MEUTH, S. G.; ROSENOW, F.; RÜBER, T.; WILLEMS, L. M.; PLATE, K. H. The neurovasculature as a target in temporal lobe epilepsy. **Brain Pathology**, v. 33, n. 2, e13147, 2022. https://doi.org/10.1111/bpa.13147.

REMPE, R. G.; HARTZ, A. M. S.; SOLDNER, E. L. B.; SOKOLA, B. S.; ALLURI, S. R.; ABNER, E. L.; KRYSCIO, R. J.; PEKCEC, A.; SCHLICHTIGER, J.; BAUER, B. Matrix metalloproteinase-mediated blood-brain barrier dysfunction in epilepsy. **The Journal of Neuroscience**, v. 38, n. 18, p. 4301-4315, 2018. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2751-17.2018.

RIGAU, V.; MORIN, M.; ROUSSET, M. C.; DE BOCK, F.; LEBRUN, A.; COUBES, P.; PICOT, M. C.; BALDY-MOULINIER, M.; BOCKAERT, J.; CRESPEL, A.; LERNER-NATOLI, M. Angiogenesis is associated with blood-brain barrier permeability in temporal lobe epilepsy. **Brain**, v. 130, p. 1942-1956, 2007. https://doi.org/10.1093/brain/awm118.

RISS, J.; CLOYD, J.; GATES, J.; COLLINS, S. Benzodiazepines in epilepsy: pharmacology and pharmacokinetics. Acta Neurologica Scandinavica, v. 118, n. 2, p. 69-86, 2008. https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2008.01004.x.

ROBEL, S.; BUCKINGHAM, S. C.; BONI, J. L.; CAMPBELL, S. L.; DANBOLT, N. C.; RIEDEMANN, T.; SUTOR, B.; SONTHEIMER, H. Reactive astrogliosis causes the development of spontaneous seizures. **The Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 8, p. 3330-3345, 2015. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1574-14.2015.

ROSETI, C.; VAN VLIET, E. A.; CIFELLI, P.; RUFFOLO, G.; BAAYEN, J. C.; DI CASTRO, M. A.; BERTOLLINI, C.; LIMATOLA, C.; ARONICA, E.; VEZZANI, A.; PALMA, E. GABAA currents are decreased by IL-1 β in epileptogenic tissue of patients with temporal lobe epilepsy: implications for ictogenesis. **Neurobiology of Disease**, v. 82, p. 311-320, 2015. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.07.003.

SALTER, M. W.; STEVENS, B. Microglia emerge as central players in brain disease. Nature Medicine, v. 23, n. 9, p. 1018-1027, 2017. https://doi.org/10.1038/nm.4397.

SANO, F.; SHIGETOMI, E.; SHINOZAKI, Y.; TSUZUKIYAMA, H.; SAITO, K.; MIKOSHIBA, K.; HORIUCHI, H.; CHEUNG, D. L.; NABEKURA, J.; SUGITA, K.; AIHARA, M.; KOIZUMI, S. Reactive astrocyte-driven epileptogenesis is induced by microglia initially activated following status epilepticus. **JCI Insight**, v. 6, n. 9, e135391, 2021. https://doi.org/10.1172/jci.insight.135391.

SARAC, S.; AFZAL, S.; BROHOLM, H.; MADSEN, F. F.; PLOUG, T.; LAURSEN, H. Excitatory amino acid transporters EAAT-1 and EAAT-2 in temporal lobe and hippocampus in intractable temporal lobe epilepsy. **APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, v. 117, n. 4, p. 291-301, 2009. https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2009.02443.x.

SCHEFFER, I. E.; BERKOVIC, S.; CAPOVILLA, G.; CONNOLLY, M. B.; FRENCH, J.; GUILHOTO, L.; HIRSCH, E.; JAIN, S.; MATHERN, G. W.; MOSHÉ, S. L. ILAE classification of the epilepsies: position paper of the ILAE commission for classification and terminology. **Epilepsia**, v. 58, n. 4, p. 512-521, 2017. http://doi.org/10.1111/epi.13709.

SCHIJNS, O.; KARACA, Ü.; ANDRADE, P.; DE NIJS, L.; KÜSTERS, B.; PEETERS, A.; DINGS, J.; PANNEK, H.; EBNER, A.; RIJKERS, K.; HOOGLAND, G. Hippocampal GABA transporter distribution in patients with temporal lobe epilepsy and hippocampal sclerosis. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 68, p. 39-44, 2015. https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2015.07.004.

SCHULTZ, C.; ENGELHARDT, M. Anatomy of the Hippocampal Formation. In: SZABO, K.; HENNERICI, M. G. (Eds.). **The Hippocampus in Clinical Science**. Basel: Karger, 2014. p. 6-17. https://doi.org/10.1159/000360925.

SCHURR, A. Neuroprotection against ischemic/hypoxic brain damage: blockers of ionotropic glutamate receptor and voltage sensitive calcium channels. **Current Drug Targets**, v. 5, p. 603-618, 2004. https://doi.org/10.2174/1389450043345209.

SCORZA, F. A.; ARIDA, R. M.; NAFFAH-MAZZACORATTI, M. G.; SCERNI, D. A.; CALDERAZZO, L.; CAVALHEIRO, E. A. The pilocarpine model of epilepsy: what have we learned? Anais da Academia Brasileira de Ciências, v. 81, n. 3, p. 345-365, 2009. https://doi.org/10.1590/s0001-37652009000300003.

SHA, L.; WANG, X.; LI, J.; SHI, X.; WU, L.; SHEN, Y.; XU, Q. Pharmacologic inhibition of Hsp90 to prevent GLT-1 degradation as an effective therapy for epilepsy. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 214, n. 2, p. 547-563, 2017. https://doi.org/10.1084/jem.20160667.

SHI, Y.; CUI, M.; OCHS, K.; BRENDEL, M.; STRÜBING, F. L.; BRIEL, N.; ECKENWEBER, F.; ZOU, C.; BANATI, R. B.; LIU, G. J.; MIDDLETON, R. J.; RUPPRECHT, R.; RUDOLPH, U.; ZEILHOFER, H. U.; RAMMES, G.; HERMS, J.; DOROSTKAR, M. M. Long-term diazepam treatment enhances microglial spine engulfment and impairs cognitive performance via the mitochondrial 18 kDa translocator protein (TSPO). **Nature Neuroscience**, v. 25, n. 3, p. 317-329, 2022. https://doi.org/10.1038/s41593-022-01013-9.

SILVA, J. C.; COUTO, L. L.; AMARAL, H. O.; GOMES, F. M. M.; CAMPOS, G. A. A.;
SILVA, L. P.; MORTARI, M. R. Neuropolybin: A new antiseizure peptide obtained from wasp venom. Biochemical Pharmacology, v. 181, 114119, 2020.
https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114119.

SILVA, P. D. G. Neurovespina como Terapia Adjuvante em Cães com Epilepsia Idiopática Farmacorresistente. 2024. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2024.

SINGH, V. K.; SEED, T. M. How necessary are animal models for modern drug discovery? **Expert Opinion On Drug Discovery**, v. 16, n. 12, p. 1391-1397, 2021. https://doi.org/10.1080/17460441.2021.1972255.

SLOVITER, R. S.; DEAN, E.; SOLLAS, A. L.; GOODMAN, J. H. Apoptosis and necrosis induced in different hippocampal neuron populations by repetitive perforant path stimulation in the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 366, n. 3, p. 516-533, 1996. https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19960311)366:3<516::AID-CNE10>3.0.CO;2-N. SOFRONIEW, M. V.; VINTERS, H. V. Astrocytes: biology and pathology. Acta Neuropathologica, v. 119, n. 1, p. 7-35, 2010. https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8.

SUPASAI, S.; GONZÁLEZ, E. A.; ROWLAND, D. J.; HOBSON, B.; BRUUN, D. A.; GUIGNET, M. A.; SOARES, S.; SINGH, V.; WULFF, H.; SAITO, N.; HARVEY, D. J.; LEIN, P. J. Acute administration of diazepam or midazolam minimally alters long-term neuropathological effects in the rat brain following acute intoxication with diisopropylfluorophosphate. **European Journal of Pharmacology**, v. 886, 173538, 2020. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173538.

TATUM, W. O. Mesial Temporal Lobe Epilepsy. **Journal Of Clinical Neurophysiology**, v. 29, n. 5, p. 356-365, 2012. http://doi.org/10.1097/wnp.0b013e31826b3ab7.

TÉLLEZ-ZENTENO, J. F.; HERNÁNDEZ-RONQUILLO, L. A Review of the Epidemiology of Temporal Lobe Epilepsy. **Epilepsy Research And Treatment**, v. 2012, p. 1-5, 2012. http://doi.org/10.1155/2012/630853

TEMKIN, O. **The Falling Sickness**. 1^a ed. Baltimore: The John Hopkins University Press, 1945. Disponível em: https://archive.org/details/fallingsicknessh0000temk/mode/2up.

TEWARI, B. P.; HARSHAD, P. A.; SINGH, M.; JOSHI, N. B.; JOSHI, P. G. Pilocarpineinduced acute seizure causes rapid area-specific astrogliosis and alters purinergic signaling in rat hippocampus. **Brain Research**, v. 1815, 148444, 2023. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2023.148444.

THIJS, R. D.; SURGES, R.; O'BRIEN, R. J.; SANDER, J. W. Epilepsy in adults. **The Lancet**, v. 393, n. 10172, p. 689-701, 2019. https://doi.org/10.1016/s0140-6736(18)32596-0.

TONG, X.; ZHANG, Z.; ZHU, J.; LI, S.; QU, S.; QIN, B.; GUO, Y.; CHEN, R. A comparison of epileptogenic effect of status epilepticus treated with diazepam, midazolam, and pentobarbital in the mouse pilocarpine model of epilepsy. **Frontiers in Neurology**, v. 13, 821917, 2022. https://doi.org/10.3389/fneur.2022.821917.

TORRES-RICO, M.; GARCÍA-CALVO, V.; GIRONDA-MARTÍNEZ, A.; PASCUAL-GUERRA, J.; GARCÍA, A. G.; MANEU, V. Targeting calciumopathy for neuroprotection: focus on calcium channels Cav1, Orai1 and P2X7. **Cell Calcium**, v. 123, 102928, 2024. https://doi.org/10.1016/j.ceca.2024.102928.

TSURUTA, F.; GREEN, E. M.; ROUSSET, M.; DOLMETSCH, R. E. PIKfyve regulates CaV1.2 degradation and prevents excitotoxic cell death. **The Journal of Cell Biology**, v. 187, n. 2, p. 279-294, 2009. https://doi.org/10.1083/jcb.200903028.

TURNER, P. V.; BRABB, T.; PEKOW, C.; VASBINDER, M. A. Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science, v. 50, n. 5, p. 600-613, 2011.

TURSKI, W. A.; CAVALHEIRO, E. A.; SCHWARZ, M.; CZUCZWAR, S. L. J.; KLEINROK, Z.; TURSKI, L. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioral, electroencephalographic and neuropathological study. **Behavioural Brain Research**, v. 9, p.315-335, 1983. https://doi.org/10.1016/0166-4328(83)90136-5.

TURSKI, W. A.; CAVALHEIRO, E. A.; BORTOLOTTO, Z. A.; MELLO, L. M.; SCHWARZ, M.; TURSKI, L. Seizures produced by pilocarpine in mice: a behavioral, electroencephalographic and morphological analysis. **Brain Research**, v. 321, n. 2, p. 237-253, 1984. https://doi.org/10.1016/0006-8993(84)90177-x.

TYTGAT, G. N. Hyoscine butylbromide – a review on its parenteral use in acute abdominal spasm and as an aid in abdominal diagnostic and therapeutic procedures. **Current Medical Research and Opinion**, v. 24, n. 11, p. 3159-3173, 2008. https://doi.org/10.1185/03007990802472700.

UNIVERSITY ANIMAL CARE COMMITTEE – QUEEN'S UNIVERSITY. Standard Operating Procedure for Anesthesia in Mice. 2012. Disponível em: <https://www.queensu.ca/animals-in-

science/sites/aiswww/files/uploaded_files/sops/mice/2023/UACC-SOP-7-6-

AnesthesiaInMice2022-AUG-08.pdf>. Acesso em: 12 jan. 2025.

VAINCHTEIN, I. D.; MOLOFSKY, A. V. Astrocytes and microglia: in sickness and in health. **Trends in Neurosciences**, v. 43, n. 3, p. 144-154, 2020. https://doi.org/10.1016/j.tins.2020.01.003.

VAN STRIEN, N. M.; CAPPAERT, N. L. M.; WITTER, M. P. The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 4, p. 272-282, 2009. https://doi.org/10.1038/nrn2614.

VAN VLIET, E. A.; ARONICA, E.; GORTER, J. A. Role of blood-brain barrier in temporal lobe epilepsy and pharmacoresistance. **Neuroscience**, v. 277, p. 455-473, 2014. http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.07.030.

VARGAS-SÁNCHEZ, K.; MOGILEVSKAYA, M.; RODRÍGUEZ-PÉREZ, J.; RUBIANO, M. G.; JAVELA, J. J.; GONZÁLEZ-REYES, R. E. Astroglial role in the pathophysiology of status epilepticus: an overview. **Oncotarget**, v. 9, n. 42, p. 26954-26976, 2018. https://doi.org/10.18632/oncotarget.25485.

VEZZANI, A.; BALOSSO, S.; RAVIZZA, T. Neuroinflammatory pathways as treatment targets and biomarkers in epilepsy. **Nature Reviews Neurology**, v. 15, n. 8, p. 459-472, 2019. https://doi.org/10.1038/s41582-019-0217-x.

VICTOR, T. R.; TSIRKA, S. E. Microglial contributions to aberrant neurogenesis and pathophysiology of epilepsy. **Neuroimmunology and Neuroinflammation**, v. 7, p. 234-247, 2020. https://doi.org/10.20517/2347-8659.2020.02.

VIGIER, A.; PARTOUCHE, N.; MICHEL, F.J.; CRÉPEL, V.; MARISSAL, T. Substantial outcome improvement using a refined pilocarpine mouse model of temporal lobe epilepsy. **Neurobiology of Disease**, v. 161, p. 105547, 2021. http://doi.org/10.1016/j.nbd.2021.105547.

VITO, S. T.; AUSTIN, A. T.; BANKS, C. N.; INCEOGLU, B.; BRUUN, D. A.; ZOLKOWSKA, D.; TANCREDI, D. J.; ROGAWSKI, M. A.; HAMMOCK, B. D.; LEIN, P. J. Post-exposure administration of diazepam combined with soluble epoxide hydrolase inhibition stops seizures and modulates neuroinflammation in a murine model of acute TETS intoxication. Pharmacology, v. 281, 2, 185-194, 2014. Toxicology and Applied n. p. https://doi.org/10.1016/j.taap.2014.10.001.

VIZUETE, A. F. K.; HENNEMANN, M. M.; GONÇALVES, C. A.; DE OLIVEIRA, D. L. Phase-Dependent Astroglial Alterations in Li-Pilocarpine-Induced Status Epilepticus in Young Rats. **Neurochemical Research**, v. 42, n. 10, p. 2730-2742, 2017. https://doi.org/10.1007/s11064-017-2276-y.

VOUTSINOS-PORCHE, B.; KONING, E.; KAPLAN, H.; FERRANDON, A.; GUENOUNOU, M.; NEHLIG, A.; MOTTE, J. Temporal patterns of the cerebral inflammatory response in the rat lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. **Neurobiology of Disease**, v. 17, n. 3, p. 385-402, 2004. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2004.07.023.

131

WALRAVE, L.; VINKEN, M.; LEYBAERT, L.; SMOLDERS, I. Astrocytic Connexin43 Channels as Candidate Targets in Epilepsy Treatment. **Biomolecules**, v. 10, n. 11, 1578, 2020. https://doi.org/10.3390/biom10111578.

WANG, N.; MI, X.; GAO, B.; GU, J.; WANG, W.; ZHANG, Y.; WANG, X. Minocycline inhibits brain inflammation and attenuates spontaneous recurrent seizures following pilocarpine-induced status epilepticus. **Neuroscience**, v. 287, p. 144-156, 2015. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.12.021.

WETHERINGTON, J.; SERRANO, G.; DINGLEDINE, R. Astrocytes in the epileptic brain. **Neuron**, v. 58, n. 2, p. 168-178, 2008. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.04.002.

WOLF, S. A.; BODDEKE, H. W.; KETTENMANN, H. Microglia in physiology and disease. **Annual Review of Physiology**, v. 79, p. 619-643, 2017. https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034406.

WU, W.; LI, Y.; WEI, Y.; BOSCO, D. B.; XIE, M.; ZHAO, M. G.; RICHARDSON, J. R.; WU,
L. J. Microglial depletion aggravates the severity of acute and chronic seizures in mice. Brain,
Behavior, and Immunity, v. 89, p. 245-255, 2020. https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.06.028.

WYATT-JOHNSON, S. K.; HERR, S. A.; BREWSTER, A. L. Status epilepticus triggers timedependent alterations in microglia abundance and morphological phenotypes in the hippocampus. **Frontiers in Neurology**, v. 8, 700, 2017. https://doi.org/10.3389/fneur.2017.00700.

YONG, V. W.; WELLS, J.; GIULIANI, F.; CASHA, S.; POWER, C.; METZ, L. M. The promise of minocycline in neurology. **The Lancet Neurology**, v. 3, n. 12, p. 744-751, 2004. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(04)00937-8.

YOU, J.; HUANG, H.; CHAN, C. T. Y.; LI, L. Pathological targets for treating temporal lobe epilepsy: discoveries from microscale to macroscale. **Frontiers in Neurology**, v. 12, 779558, 2022. https://doi.org/10.3389/fneur.2021.779558.

YU, C.; DENG, X. J.; XU, D. Microglia in epilepsy. **Neurobiology of Disease**, v. 185, 106249, 2023. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2023.106249.



ANEXO A – Certificado da Comissão de Ética no Uso Animal

ANEXO B – Cadastro do Peptídeo Neurovespina no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado



Ministério do Meio Ambiente CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº A034307

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

| Número do cadastro: | A034307 |
|-----------------------|---|
| Usuário: | Universidade de Brasília |
| CPF/CNPJ: | 00.038.174/0001-43 |
| Objeto do Acesso: | Patrimônio Genético |
| Finalidade do Acesso: | Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico |
| Espécie | |
| Polybia occidentalis | |
| Título da Atividade: | Avaliação da atividade anti-inflamatória e antiapoptótica de um peptídeo em um modelo animal de epilepsia do lobo temporal |
| Equipe | |
| Márcia Renata Mortari | Universidade de Brasília |
| Larissa Silva de Lima | Universidade de Brasília |

Data do Cadastro: Situação do Cadastro: 31/01/2024 12:37:42 Concluído

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 12:38 de 31/01/2024.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO - SISGEN