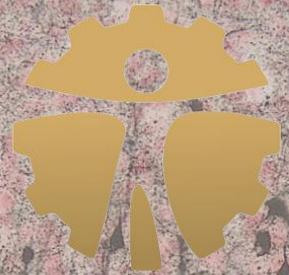




**Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia
Departamento de Fisiologia**



Samuel Amorin Grisote

**Um estudo comparativo de neurodegeneração em
dois modelos experimentais de *Status Epilepticus*:
ácido cáinico e pilocarpina**

**Ribeirão Preto
2021**

Samuel Amorin Grisote

Um estudo comparativo de neurodegeneração em dois modelos experimentais de *Status Epilepticus*: ácido cáinico e pilocarpina

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, FMRP-USP

Orientação: Professor Doutor Norberto Garcia-Cairasco

Agência de fomento: CNPq 3/2018 – 2/2020

Ribeirão Preto
2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha catalográfica

Grisote, Samuel Amarin

Um estudo comparativo de neurodegeneração em dois modelos experimentais de *Status Epilepticus*: ácido caínico e pilocarpina

71 p. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Fisiologia) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

Orientação: Prof. Dr. Norberto Garcia Cairasco

1. Epilepsia; 2. *Status Epilepticus*, 3. neurodegeneração, 4. Ácido Caínico, 5. Pilocarpina

Nome: Samuel Amarin Grisote

Título: Um estudo comparativo de neurodegeneração em dois modelos experimentais de *Status Epilepticus* : ácido caínico e pilocarpina

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof.Dr.: _____

Instituição _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr.: _____

Instituição _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr.: _____

Instituição _____

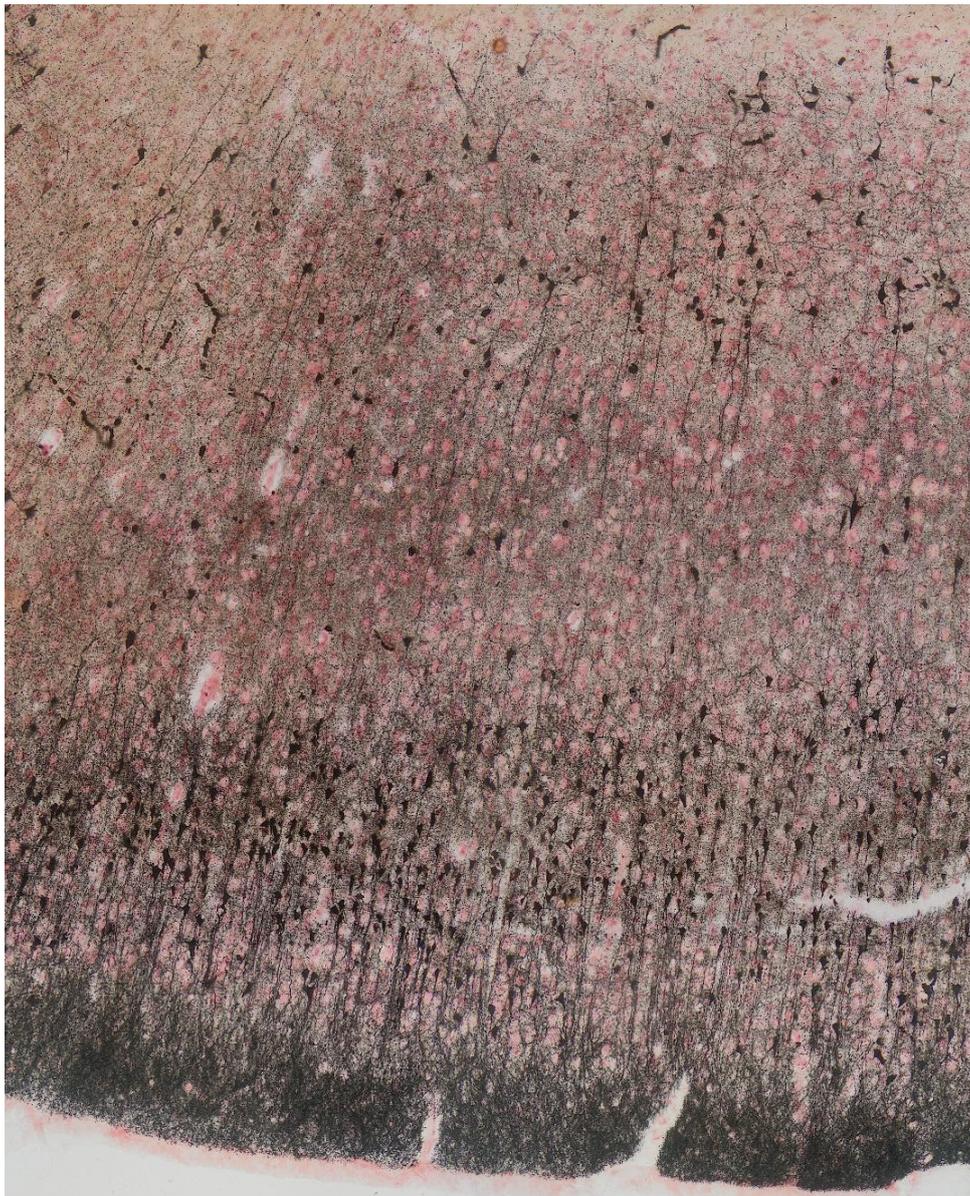
Julgamento: _____ Assinatura: _____

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001

Este trabalho foi realizado com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, 132000/2018-0).

Foto da capa



Neurodegeneração observada em região cortical por meio da técnica de impregnação por prata (De Olmos et al, 1994) em que neurônios mortos devido à excitotoxicidade glutamatérgica ficam impregnados por uma solução de prata (argirofilia). Observe-se em vermelho a contra-coloração por vermelho neutro mostrando células viáveis.

Dedicatória

Dedico, de todo meu coração, esforço e vontade essa Dissertação ao meu Pai Sandro, minha Mãe Marcia e a minha irmã Caroline, vocês foram a peça fundamental, meu trilha e minha bússola para concluir mais esse ciclo de minha vida.

Dedico a todos os que me apoiaram e torceram em toda essa jornada.

Agradecimentos

Primeiramente agradeço aos meus Pais, Marcia e Sandro, por todo suporte emocional, financeiro e de infinitos incentivos, foi, é e sempre será imensurável tudo o que fazem por mim. Junto com vocês, agradeço à Caroline, minha irmã, que desde o início esteve presente fisicamente comigo, vendo todas minhas batalhas e noites sem dormir ou mal dormidas. A vocês três, minha família, minha Ohana, minha base sólida, todo meu amor.

Ao Professor Norberto, que me acolheu mesmo antes do início deste Mestrado, por todo o conhecimento científico, por me mostrar que a vida acadêmica não se resume ao espaço físico de um laboratório, que temos que levar a ciência para todos os cantos possíveis e para todos, desde as crianças que estão no começo aos senhores que ficam sentados na praça em um dia de sábado e por me acolher na família LNNE, que já faz parte da minha vida. Ao Senhor meu muito obrigado por tudo.

À Doutora Alexandra Cunha, a mulher da ciência por quem tenho uma admiração enorme, agradeço por me acolher e me passar um enorme conhecimento científico, por toda a ajuda quando precisei, por todas as horas de estudo ao meu lado. Preciso agradecer também à amiga que ganhei fora do laboratório, agradecer por todas as risadas, por abrir as portas de sua casa e me fazer sentir confortável, a toda sua família que amei conhecer, a todos vocês sempre minhas melhores energias. Obrigado.

À Ana Luiza, que me acolheu logo que cheguei ao LNNE, por todo o conhecimento que me foi passado, todas as técnicas que me ajudou a aperfeiçoar quando precisei, as inúmeras perfusões feitas, inclusive aos finais de semana, que terminavam em uma tarde agradável, junto aos demais colegas e amigos.

À Lívea, Victor e Eduardo, que em 2015, ano em que participei do 50 Curso de Verão em Fisiologia da FMRP-USP, pude conhecer o LNNE e após o término da graduação retornar a esse laboratório.

Aos técnicos José e Flávio que me acolheram desde o início, por todas as horas de ensinamentos, por toda a ajuda nas técnicas ou na parte de documentação quando precisava, também por todas as idas ao biotério dos WAR.

A Suélen, que precisamos nos encontrar em Ribeirão para descobrir que fomos quase vizinhos durante a graduação, ao *blots* realizados quando comecei a frequentar o laboratório, ao tanto de aprendizado e conhecimento que adquirimos dessa minha jornada.

À Adrieli, minha parceira da fisiologia, de cursão, experimentos, de ajudas, você foi muito importante durante o meu ciclo, obrigado por todas as risadas, conhecimentos, compartilhamento de vida.

Nayara por todas as conversas, por pedir a patinha para acalmar, por confiar em mim para participar da perfusão dos seus animais, mas agradeço por toda amizade que me proporcionou.

Ao Rui e William, grandes amigos, que possuem conhecimentos gigantescos e aos grandes amigos que pretendo levar para vida.

Ao Gabriel, o IC que era um pós-graduando, que não media esforços para tentar ajudar sempre que podia, que tem um conhecimento excepcional, por ser esse menino de coração enorme que admiro muito, por todas as horas de ônibus com as conversas que iam das mais aleatórias às mais científicas e profundas.

Ao Jordan, nosso escritor de livros, cientista incrível que você é, o mais recente do laboratório, porém quem se enturmou da forma mais natural, obrigado por um dia me chamar no *facebook* e perguntar do LNNE e hoje fazer parte dele.

A todos os funcionários e demais colegas da fisiologia que fazem parte deste ciclo, meu muito obrigado

Ao meu companheiro, namorado, amigo, Fábio, que nos primeiros 6 meses de Mestrado em 2018 passou a fazer parte da minha vida. Te agradeço por todo o incentivo, todas as palavras de apoio, escutar todas minhas angústias e choros e por deixar eu compartilhar todas as minhas alegrias. Por me ouvir inúmeras vezes falar dos meus projetos e ser muito paciente quando tento explicar alguma coisa e te deixar com muitas informações. Meu muito, muito obrigado por ser você.

Aos meus avós Ricardo e Conceição, por tudo o que fizeram por mim e toda a força que me proporcionaram. Obrigado

E aos meus primos Luiz Henrique, Larissa e principalmente à Vanessa, que me acompanha desde a graduação e foi um exemplo de trajetória e força.

A todas as agências de fomento envolvidas para a construção deste projeto.

Agradeço a Deus e a todas as pessoas que passaram na minha vida para que eu pudesse chegar aonde estou.

Muito obrigado!

“Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas.
Isso é perfeitamente aceitável, elas são a abertura para
achar as que estão certas”.

Carl Sagan

Resumo

Grisote, Samuel Amorin. Um estudo comparativo de neurodegeneração em dois modelos experimentais de *Status Epilepticus*: ácido caínico e pilocarpina. 2021. 71 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto/SP, 2021.

A epilepsia do lobo temporal (ELT), uma das formas mais comuns de epilepsia, afeta 1% da população mundial. Aproximadamente 30% desses pacientes têm a característica de serem refratários, sem remissão, mesmo com tratamentos. A ELT é caracterizada por hiperexcitabilidade e hipersincronia neuronal crônica, principalmente por crises espontâneas iniciadas no lobo temporal mesial, em particular no hipocampo, as quais podem ser secundariamente generalizadas. A administração sistêmica de ácido caínico (AC) e pilocarpina (PILO) tem sido amplamente utilizada para estudar *Status Epilepticus* (SE), evento grave que constitui o chamado insulto inicial, e que pode levar a manifestações como as da ELT. Após o insulto inicial segue o período de latência, quando ocorre o processo de epileptogênese e crises recorrentes espontâneas (CRE). Embora ambos os modelos possam exibir neurodegeneração, os mecanismos responsáveis por esse evento podem diferir em sua patologia. **Métodos:** Foram utilizados ratos Wistar adultos machos (250-280 g), procedentes do Biotério principal do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, os quais receberam injeção intraperitoneal única de PILO (320 mg/kg) ou KA (9 mg/g). Metil-escopolamina foi injetada 30 min (1 mg/kg, i.p) antes da injeção de PILO para minimizar os efeitos periféricos colinérgicos. Os animais foram tratados com Diazepam (10 mg/kg, i.p) 90 min após o início do SE. Em seguida, 24, 48 ou 72 h após o final do SE, os animais foram perfundidos com PBS 0,1 M gelado e solução de paraformaldeído a 4% em PBS. Os cérebros foram removidos, congelados e cortados (30 μ m) em criostato. A degeneração neuronal foi detectada com a técnica amino cupro argêntica. As imagens foram adquiridas com microscópio Olympus BX-61. O número de células impregnadas de prata (Ag⁺) no hipocampo foi quantificado pelo software *ImageJ*. Protocolos aprovados pela CEUA (protocolo nº 028/2010) **Resultados:** A estimativa da densidade celular mostra que em PILO-SE o número de células Ag⁺ em CA1 é semelhante a CA-SE (PILO = 48,7 \pm 32,7; CA = 36,9 \pm 5,3). Em CA2 de PILO-SE há mais células Ag⁺ do que CA-SE (PILO = 6,9 \pm 0,7; CA = 0,9 \pm 0,9). Resultados semelhantes foram encontrados para CA3 (PILO = 32,4 \pm 5,2; CA = 10,3 \pm 0,6) e GD (PILO = 61,5 \pm 38,3; CA = 8,6 \pm 2,8). Após 48 (PILO

= $53,6 \pm 0$; CA = $20,4 \pm 4,5$) e 72 h (PILO = 54 ± 0 ; CA = $20,4 \pm 6,2$), PILO-SE mostra mais células em CA1 Ag⁺ do que KA-SE. No entanto, às 48 h CA2, CA3 e GD mostram densidade semelhante ao tempo de 72 h para células Ag⁺, quando comparados os dois tipos de SE (dados não mostrados). Curiosamente, exceto para CA1, todas as regiões do hipocampo de animais PILO-SE, apresentam uma diminuição na densidade de células Ag⁺ ao longo dos períodos, especialmente em GD. No caso de CA1, densidades celulares semelhantes foram observadas ao longo dos períodos. Já em CA-SE, observamos densidade semelhante de células Ag⁺ em todas as regiões ao longo dos períodos, enquanto em CA1, a densidade de células Ag⁺ caiu de 24 para 48 h e permaneceu a mesma em 72 h, entretanto nenhum dos resultados apresentados possui valores estatísticos de $p \leq 0,05$. Embora ambos os modelos possam exibir neurodegeneração, os mecanismos responsáveis por esse evento podem diferir em sua patologia. No cérebro de rato, o hipocampo se mostra particularmente susceptível à geração de crises induzidas por AK ou PILO e foi escolhido como o foco de nossa análise das mudanças temporais associadas à gênese das CRE. **Conclusão:** Embora o presente estudo teve como objetivo observar a neurodegeneração causada por PILO-SE e CA-SE às 24 h, 48 h e 72 h sobretudo no lobo temporal, não foram apenas áreas hipocampais que apresentaram neurodegeneração, mas sim uma extensa parte do encéfalo, o que traz o questionamento de se estes modelos de SE devem ser considerados seletivos de ELT. Propomos então uma revisão crítica da literatura para confirmar esta hipótese.

Palavras-chave: Epilepsia; *Status Epilepticus*, neurodegeneração, Ácido Caínico, Pilocarpina

ABSTRACT

Grisote, Samuel Amorin. A comparative study of neurodegeneration in two experimental models of Status Epilepticus: kainic acid and pilocarpine. 2021. 71 p. Dissertation (Master in Physiology) - Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto/SP, 2021.

Temporal lobe epilepsy (TLE), one of the most common forms of epilepsy, affects 1% of the world's population. Approximately 30% of these patients are refractory, without remission, even with treatments. LTE is characterized by hyperexcitability and chronic neuronal hypersynchrony, mainly by spontaneous recurrent seizures, initiated in the mesial temporal lobe, in particular in the hippocampus, that can be secondarily generalized. Kainic acid (KA) and Pilocarpine (PILO) administration have been vastly used to induce *Status Epilepticus* (SE) which is known as the primary insult followed by a latent period, where epileptogenesis occurs and afterwards spontaneous recurrent seizures (SRS). **Methods:** Adult male Wistar rats (250-280 g), from the main Vivarium of the Ribeirão Preto Campus at the University of São Paulo were used, which received a single intraperitoneal injection of PILO (320 mg/kg) or KA (9 mg/kg). Methylscopolamine was injected 30 min (1 mg/kg, i.p) prior to PILO injection to minimize cholinergic peripheral effects. Animals were treated with Diazepam (10 mg/kg, i.p) 90 min after the onset of SE. Then, 24, 48 or 72 h after the end of SE, animals were perfused with ice cold PBS 0.1M and 4% paraformaldehyde solution in PBS. Brains were removed, frozen, and cut (30 μ m) in cryostat. Neuronal degeneration was detected with the Amino-Cupric-Silver technique. The images were acquired with an Olympus BX-61 microscope. The number of silver-impregnated (Ag^+) cells in the hippocampus were quantified by the ImageJ software. Protocols were approved by CEUA (protocol n° 028/2010). **Results:** The cell density estimation shows that in PILO-SE the number of Ag^+ cells in CA1 are like KA-SE (PILO=48.7 \pm 32.7; KA=36.9 \pm 5,3). CA2 slices from PILO-SE have more Ag^+ cells than KA-SE (PILO=6.9 \pm 0.7; KA=0,9 \pm 0,9). Similar results were found for CA3 (PILO=32.4 \pm 5.2; KA=10.3 \pm 0.6) and DG (PILO=61.5 \pm 38.3; KA=8.6 \pm 2.8). After 48 h (PILO=53.6 \pm 0; KA=20.4 \pm 4.5) and 72 h (PILO=54 \pm 0; KA=20.4 \pm 6.2) the CA1 from PILO-SE showed more Ag^+ cells than KA-SE. However, at 48 h CA2, CA3 and DG show similar density to the time of 72 h for Ag^+ cells, when compared the two types of SE (data not shown). Interestingly, except for CA1, all hippocampal regions of PILO-SE animals,

show a decrease in the density of Ag⁺ cells along time periods, especially in DG. In the case of CA1, similar cell densities were observed along time periods. In KA-SE, in turn, we observed similar density of Ag⁺ cells in all regions along time periods, whereas in CA1, the density of Ag⁺ cells dropped from 24 h to 48 h and remained the same in 72 h, however none of the results presented has statistical values of $p \leq 0,05$. Although both models may exhibit neurodegeneration, the mechanisms responsible for this event may differ in their pathology. In the rat brain, the hippocampus is shown to be particularly susceptible to the generation of AK-induced or PILO-induced seizures and it has been chosen as the focus for our analysis of the temporal changes associated with the genesis of SRS. **Conclusion:** Although the present study had the aim tot observing the neurodegeneration, mainly at the temporal lobe, caused by SE-PILO and SE-KA in different time windows (24 h, 48 h and 72 h), they were not just hippocampal areas that showed neurodegeneration, but an extensive part of the brain is affected, which raises the question of whether these models of SE should be considered, selective for TLE. We, therefore, propose a critical review of the literature in order to confirm this hypothesis.

Keywords: Epilepsy, *Status Epilepticus*, neurodegeneration, Kainic acid and Pilocarpine.

Sumário

1. Epilepsia	22
1.1. As epilepsias no mundo e no Brasil.....	22
1.1.1. Classificações	23
1.1.2. Diagnóstico e Tratamento	24
1.2. Epilepsia do Lobo Temporal (ELT).....	26
1.3. A epileptogênese	26
1.4. Modelos animais de ELT	28
1.5. Status Epilepticus induzido por Ácido Caínico e Pilocarpina.....	30
1.5.1. Ácido caínico.....	30
1.5.2. Pilocarpina.....	31
2. Neurodegeneração observada pela técnica de impregnação por prata.....	32
2.1. Impregnação por prata de De Olmos	33
2.2. Metodologia.....	33
2.2.1. Animais de experimentação	34
2.2.2. Indução de SE por PILO e AC	34
2.2.3. Perfusão.....	35
2.2.4. Corte dos cérebros	35
2.2.5. Histoquímica de prata amino cupro argêntica (A-Cu-Ag).....	35
2.2.6. Aquisição de imagens	37
2.2.7. Análise quantitativa de neurodegeneração e contagem de células	37
2.3. Resultados	38
2.3.1. Análise morfológica.....	38
2.3.2. Morfologia e Quantificação hipocampal.....	42
3. Discussão	50
Referências	55
Anexo	65

Apêndice.....	66
---------------	----

Lista de figuras

Figura 1. Classificação quanto à sua definição e classificação das epilepsias de acordo com o tipo de crise, tipo de epilepsia, sua etiologia, se está associada a comorbidades. Imagem modificada do guia da ILAE (www.ilae.org/guidelines Acessado em 20 de julho de 2020).

Figura 2. Processo de epileptogênese desde uma injúria/insulto inicial ou pela experimentação animal com modelos químicos e elétricos. Neste momento inicial podem-se observar perdas neuronais por apoptose e necrose, danos nas meninges e vasculares. No período latente, que pode variar de dias a meses, acontecem processos neurais como os inflamatórios e principalmente a reorganização dos circuitos neurais, que culminarão com o surgimento (na fase três) das crises epiléticas espontâneas. *Created with BioRender.com*

Figura 3. Esquema representativo da ação do AC nos neurônios, levando ao aumento do glutamato e conseqüentemente do Ca^{++} intracelular pela ação direta em receptores Cainato e AMPA. *Created with BioRender.com*

Figura 4. Esquema representativo da ação da PILO em neurônios pré e pós-sinápticos. A PILO age em neurônios muscarínicos M1, levando ao aumento intracelular de glutamato, que por sua vez atua em receptores NMDA, levando ao aumento de Cálcio (Ca^{++}) intracelular. A ação conjunta do aumento de Ca^{++} e o aumento do glutamato levam a citotoxicidade celular, causando a neurodegeneração (Lee, et al. 2017). *Created with BioRender.com*

Figura 5. Imagem representativa dos métodos, dosagens e tempos utilizados desde as aplicações dos compostos indutores de SE, passando pelo período de perfusão e o procedimento histológico utilizado, a fim de observar a neurodegeneração.

Figura 6. Em A presença de um neurônio necrótico com coloração de Hematoxilina Eosina (HE). Em B a seta apontando para um núcleo picnótico de um neurônio em degeneração, corado por HE. Imagens extraídas do acervo de imagens do site <http://anatpat.unicamp.br/lamneuro3.html>.

Figura 7. Imagens de cortes histológicos que após perfusão passaram pela técnica de impregnação por prata de De Olmos (1994), onde é possível observar neurônios em degeneração (seta amarela) com núcleos densamente corados. A seta azul em A, D, E, H, I e L indica de qual local as demais imagens sofreram o aumento de 20 vezes. As imagens A, B, E, F, I e J, pertencem ao grupo PILO-SE e as restantes ao grupo AC-SE. Também estão apresentadas as janelas temporais de 24 horas em A, B, C e D, 48 horas em E, F, G e H e 72 horas em I, J, K, e L.

Figura 8. Imagens representativas da formação hipocampal e de neurônios que a compõem. Em (i) imagem representativa das vias de entrada, conexões e saída da formação hipocampal, bem como localização representativa de cada área CA1, CA3, GD. Em (ii) desenho esquemático de neurônios piramidais de CA1 e CA3 e de células granulares do GD, em (a) estão as ramificações dendríticas apicais, em (b) árvore dendrítica basilar (basal). (i) imagem modificada de Deng et al., 2010. (ii) imagem modificada de Spencer (2019).

Figura 9. Densidade de células Ag^+ em função das janelas temporais analisadas de 24 h, 48 h e 72 h após SE-PILO (esquerda) e SE-AC (direita). (n= PILO-SE= 6; AC-SE= 7).

Figura 10. Densidade de células Ag^+ na região hipocampal de CA1 no período de 24 horas após o SE por PILO e AC são semelhantes, mas não há variação estatística entre os tempos de tratamento ($F [2,4] = 0,1316$ $p = 0,8804$). Nos períodos de 48 h e 72 h, respectivamente, o modelo de PILO-SE apresenta maior densidade de Ag^+ que em AC-SE. Resultados expressos em média \pm SEM, análise *two-way ANOVA*. (n= PILO-SE= 6; AC-SE= 7).

Figura 11. Imagens representativas da região CA1 dos modelos de PILO-SE e AC-SE nas três janelas temporais 24 h, 48 h e 72 h onde é possível ver a morfologia nuclear dos neurônios degenerados (setas amarelas), bem como alguns processos dendríticos (seta azul).

Figura 12. Contagem de células na região CA2. No período de 24 h a densidade de PILO-SE é maior que em AC-SE, enquanto nos períodos de 48 h e 72 h tendem a ser semelhantes, porém não há variação estatística entre os tempos de tratamento ($F [2,4] =$

0,1474 $p = 0,3315$). Resultados expressos em média \pm SEM, análise *two-way ANOVA*. (n= PILO-SE= 6; AC-SE= 7)

Figura 13. Imagens representativas de CA2 dos modelos PILO-SE e AC-SE nas três janelas temporais 24 h, 48 h e 72 h, onde é possível observar os núcleos (tem certeza?) (setas amarelas) e alguns processos dendríticos corados pela impregnação de prata (setas azuis) .

Figura 14. No período de 24 h a densidade de PILO-SE é maior que em AC-SE na região de CA3 enquanto nos períodos de 48 h e 72 h tendem a ser semelhantes, mas não há variação estatística entre os tempos de tratamento ($F [2,4] = 0,6,121$ $p = 0,0607$). Resultados expressos em média \pm SEM, análise *two-way ANOVA*. (n= PILO-SE= 6; AC-SE= 7).

Figura 15. imagens representativas de CA3 dos modelos de PILO-SE e AC-SE nas três janelas temporais 24 h, 48 h e 72 h e em preto a morfologia nuclear (certeza?) (setas amarelas), assim como alguns prolongamentos de seus dendríticos (setas azuis) dos neurônios degenerados.

Figura 16. No período de 24 h a densidade de neurônios Ag^+ no PILO-SE é maior que em AC-SE, especificamente na região do GD, enquanto nos períodos de 48 h e 72 h tendem a ser semelhantes, entretanto não há variação estatística entre os tempos de tratamento ($F [2,4] = 0,1624$ $p = 0,3046$). Resultados expressos em média \pm SEM, análise *two-way ANOVA* (n= PILO-SE= 6; AC-SE= 7).

Figura 17. Imagens representativas de GD dos modelos de PILO-SE e AC-SE nas três janelas temporais 24 h, 48 h e 72 h. Notam-se neurônios granulares (setas amarelas) e alguns processos (setas azuis) de dendritos marcados em sua tonalidade quase preta.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Número de profissionais e centros especializados em epilepsia por região e Estado.

Tabela 2. Dados de área, contagem e normalização de neurônios Ag^+/mm^2 após 24 h da indução de PILO-SE.

Tabela 3. Dados de área, contagem e normalização de Neurônios Ag^+/mm^2 após 48 h de injeção de PILO para indução de SE

Tabela 4. Dados de área, contagem e normalização de Neurônios Ag^+/mm^2 obtidos após 72 h da injeção de PILO para desencadeamento de SE.

Tabela 5. Dados de área, contagem e normalização de neurônios Ag^+/mm^2 de injeção AC após 24 h da indução de SE.

Tabela 6. Dados de área, contagem e normalização de neurônios Ag^+/mm^2 obtidos após 48 h da injeção de AC para desencadeamento de SE.

Tabela 7. Dados de área, contagem e normalização de neurônios Ag^+/mm^2 obtidos após 72 h da injeção de AC para desencadeamento de SE.

Tabela 8. Após PILO-SE as áreas hipocâmpais CA1, CA2, CA3 e DG, nos tempos de 24 h, 48 h e 72 h.

Tabela 9. Após AC-SE as áreas hipocâmpais CA1, CA2, CA3 e DG, nos tempos de 24 h, 48 h e 72 h.

Lista de abreviações

<i>WHO</i>	<i>World Health Organization</i>
LBE	Liga Brasileira de Epilepsia
ILAE	International League Against Epilepsy
EEG	Eletroencefalograma
CRE	Crises recorrentes espontâneas
CBD	Canabidiol
PTZ	Pentilenotetrazol
SE	<i>Status Epilepticus</i>
PILO	Pilocarpina
AC	Ácido caínico
SE-PILO	<i>Status Epilepticus</i> induzido por pilocarpina
SE-AC	<i>Status Epilepticus</i> induzido por ácido caínico
AMPA	Receptores N-metil-D-aspartato
NMDA	Receptores alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
Ag ⁺	Neurônios impregnados por prata – argirofílicos

1. Epilepsia

1.1. As epilepsias no mundo e no Brasil

Epilepsia está contida dentro das desordens cerebrais e tem como uma das características interrupções das funções normais do cérebro, estas podendo ser recorrentes ou não (FISHER, Robert S. et al., 2005). A Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization, WHO*), estima que 50 milhões de pessoas pelo mundo sofram com algum tipo de epilepsia, ou seja, de 4 a 10 pessoas a cada 1000 apresentam essa desordem neurológica, tornando-a a mais comum. Dentre as pessoas com epilepsia cerca de 80% delas vivem em países pobres ou em desenvolvimento. Ainda, de acordo com a *WHO*, 70% podem viver sem apresentar crises fazendo o uso de tratamento com os anticonvulsivantes apropriados (*World Health Organization, WHO*, 20 June 2019).

No Brasil, de acordo com a *WHO* e a Liga Brasileira de Epilepsia (LBE) a desordem atinge cerca de 3 milhões de pessoas, assim 14 a cada 1000 brasileiros. Com informações contidas na página virtual da LBE (Tabela anexo A; LBE – 15 de outubro 2020), o número de profissionais e centros especializados em epilepsia tem distribuição desigual entre Estados e regiões sendo que São Paulo possui 195 profissionais e centros, enquanto Estados da região Norte como Acre e Rondônia apresentam apenas 2 cada um (LBE – 15 de outubro 2020).

Os poucos trabalhos da prevalência da epilepsia no Brasil, são datados de décadas atrás, há trabalhos sobre a prevalência na grande São Paulo, onde 11,9 habitantes por 1000 eram estimados com epilepsia (Marino et al., 1986). Outro levantamento realizado em duas cidades do sudeste do Brasil mostra que as classes menos favorecidas e os idosos tem a maior prevalência, 7,5 e 8,5 por 1000 habitantes respectivamente (Noronha et al., 2007). Tais dados continuam, até os dias atuais, sendo apresentados pelo Ministério da Saúde e Secretaria de Atenção à Saúde (PORTARIA CONJUNTA Nº 17, DE 21 DE JUNHO DE 2018). O relatório “*Epilepsy: a public health imperative*” de 2019 apresentado pela *WHO*, traz que a incidência no Brasil possui variação de 5,1 a 8,2 casos por 1000 habitantes.

1.1.1. Classificações

Define-se como crises epilépticas a ocorrência transitória de sinais e/ou sintomas devido à atividade neuronal excessiva ou síncrona anormal, enquanto a epilepsia é o distúrbio do cérebro caracterizado por uma predisposição duradoura para gerar crises epilépticas e pelas consequências neurobiológicas, cognitivas, psicológicas e sociais dessa condição, portanto epilepsias são um conjunto de desordens neuronais extremamente diversificado. No entanto, para que o diagnóstico de um tipo de epilepsia seja considerado, o paciente deverá apresentar ao menos uma crise epiléptica, sendo essa caracterizada pela atividade neuronal anormal excessiva e/ou síncrona de grupos de neurônios (FISHER, et al., 2005; GOLDBERG, 2013).

A primeira classificação internacional das epilepsias foi apresentada pela *International League Against Epilepsy – ILAE* durante reunião realizada na cidade de Marselha na França, em 1964 e estabelecida por Henri Gastaut e colaboradores (Gastaut, 1964). Os autores basearam a classificação da doença com base nos tipos de crises epilépticas apresentados pelos pacientes, sendo esses os seguintes grupos: 1- crises parciais; 2- crises generalizadas; 3- crises unilaterais, tônicas ou clônicas em crianças; 4- crises erráticas em recém-nascidos; 5- crises não classificadas. Essas classes foram propostas com o auxílio de padrões de atividade eletroencefalográfica (EEG). Assim as comissões se reuniram durante os períodos de 1970 e 1975 para atualizar as classificações, usando de artifícios tecnológicos da época como as filmagens de crises epilépticas para a discussão (Gastaut, 1970; ILAE,1981) Atualmente as epilepsias são classificadas quanto ao: tipo de crises, como convulsivas motoras ou não motoras (crises de ausência) (Brigo, et al., 2018) apresentada pelo paciente, podendo estas serem focais, generalizadas ou desconhecidas. Essa classificação das crises define o tipo de epilepsia que segue a mesma classificação; focal, generalizada, a combinação focal e generalizada ou desconhecida (Fisher, et al., 2017).

As síndromes epilépticas estão contidas em *clusters* de características que podem ocorrer ao mesmo tempo (Holmes, 2013; Pack, 2019; SCHEFFER, 2017). A síndrome está associada com a idade, assim, sendo caracterizada como de origem: neonatal, infantil, adolescente, adolescente adulto (Pearl, 2018), tipo e causas da crise, se há fatores genéticos, qual área cerebral está envolvida. A primeira classificação pela ILAE em 1989 e atualmente o *site* da ILAE possuem uma lista de síndromes epilépticas, como a epilepsia

reflexa (Wolf, 2017), epilepsia autossômica dominante com características auditivas (Michelucci & Nobile, 1993), síndrome de Dravet (Kuo et al., 2019) entre outras.

Há, no entanto, pacientes que apresentam alguns episódios de crises convulsivas ou não convulsivas como já exposto anteriormente. Nestes casos as crises assim como as epilepsias e síndromes epiléticas podem apresentar diversas etiologias estruturais, genética, infecciosa, metabólica, imune ou desconhecidas e podem estar acompanhadas de comorbidades (SCHEFFER, 2017).

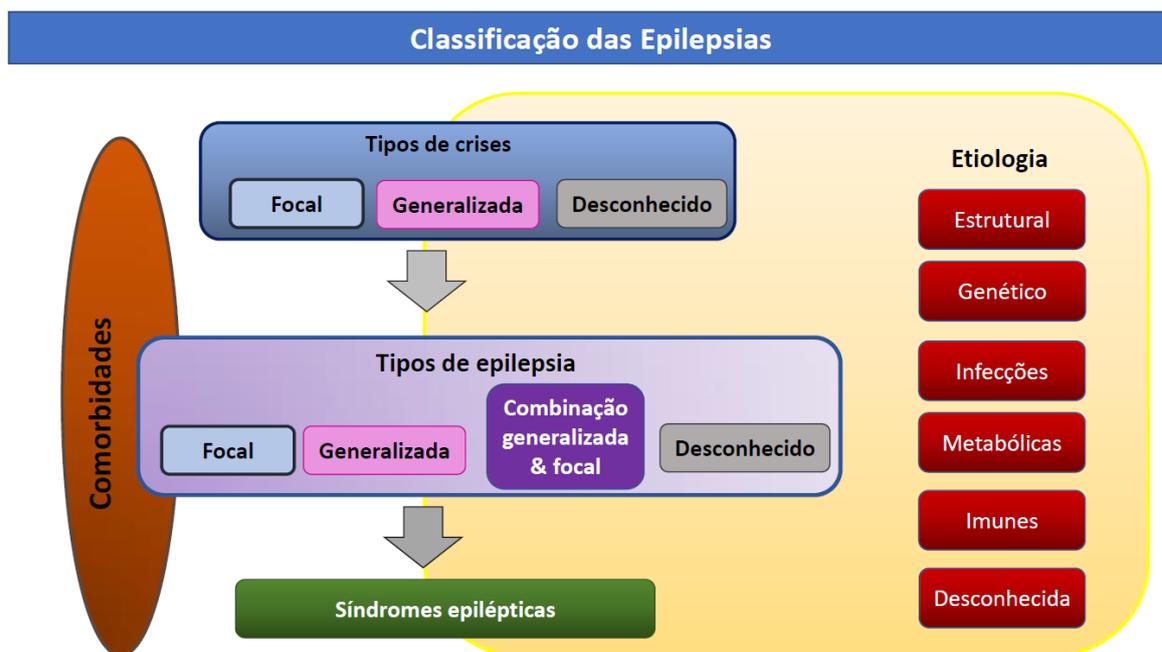


Figura 1. Classificação quanto à sua definição e classificação das epilepsias de acordo com o tipo de crise, tipo de epilepsia, sua etiologia, se está associada a comorbidade. Imagem modificada do guia da ILAE (www.ilae.org/guidelines Acessado em 20 de julho de 2020).

1.1.2. Diagnóstico e Tratamento

Entender os tipos de crises convulsivas, mesmo não sabendo de onde provém, quando um paciente chega ao atendimento e principalmente nas síndromes é importante, assim com o bom e detalhado diagnóstico, que ocorrem em 90% dos casos, viabilizará um tratamento adequado e pertinente a cada paciente (Shneker & Fountain, 2003; Kanner, 2008).

De forma breve o diagnóstico utiliza-se da versão mais recente das classificações das epilepsias proposta pela ILAE (Fisher, et al., 2017). Para o correto diagnóstico são realizados procedimentos associados com a descrição precisa da semiologia e uso de

EEG e métodos diagnósticos suplementares tais como exames de imagem (Tyvaert, 2017; FALCO-WALTER, 2018). O EEG é considerada uma das mais importantes ferramentas, uma vez que permite acompanhar a evolução da desordem neurológica e com tal método é possível fazer a localização de regiões epileptogênicas e junto com o vídeo, de fato com o sincronismo vídeo-EEG, auxiliar na determinação do tipo de crise (Guerreiro, 2016; Maganti, 2013). Outros possíveis meios de diagnóstico suplementares de imagem podem incluir a Tomografia computadorizada (Bronen, 1996) e ressonância magnética, sendo essa uma importante aliada no diagnóstico da epilepsia de lobo temporal mesial e de tumores (Guerreiro, 2016; Cendes, 2013). Recentemente há a possibilidade do uso de testes genéticos (Weber et al., 2017) para a complementação do diagnóstico.

Feito o diagnóstico correto, como na maioria dos medicamentos para outras patologias, as drogas antiepilépticas (DAE), os riscos de efeitos adversos e a eficácia têm de ser ponderados e uma série de avaliações deve ser levada em conta, tais como a toxicidade, o não controle das crises (farmacorressistência) e as comorbidades associadas (Perucca & Tompson, 2011).

As DAE possuem três classificações, DAE de primeira geração, segunda geração e terceira geração e tais classificações estão correlacionadas com as suas respectivas datas de desenvolvimento sendo de 1910 a 1970, 1971 a 2000 e 2000 à atualidade, respectivamente (Löscher, 1998; Perucca & Tompson, 2011; Vidaurre & Herbst, 2019). As ações mais clássicas das DAE, tem como alvos a diminuição da ação glutamatérgica excitatória, ação de modulação em canais de Na⁺, K⁺, Ca⁺⁺ e aumento da neurotransmissão GABAérgica inibitória (Macdonald & Kelly, 1995; Löscher, 1998; Kwan et al., 2001; LaRoche, & Helmers, 2004; Mortari, et al., 2007).

Não há de se passar despercebido o uso de outros medicamentos fora das DAEs clássicas, entre eles o uso de toxinas naturais advindas de animais venenosos, geralmente invertebrados, com alvos para o desenvolvimento de novas DAEs (Mortari, et al., 2007). O uso de canabidiol (CBD), que desde a década de 70 já se mostrava como uma interessante DAE, e pesquisas atuais mostram-no como um eficiente bloqueador de crises tônico-clônicas generalizadas devido à sua ação potencializadora GABAérgica inibitória, entre outros possíveis mecanismos como a mobilização de cálcio dos canais de potássio ativado por cálcio. (Chesher & Jackson, 1974; Lazarini-Lopes et al., 2020).

1.2. Epilepsia do Lobo Temporal (ELT)

Dentre as formas de epilepsia, a mais comum é a epilepsia de lobo temporal (ELT) que chega a afetar 1% da população mundial. Desses casos, 30% possui a característica de serem refratários, ou seja, sem remissão mesmo com tratamentos (Kwan & Brodie, 2010; Nirwan, 2018). A ELT é caracterizada por hiperexcitabilidade e hipersincronia neuronal crônica que se manifesta como crises parciais recorrentes de início no lobo temporal mesial, em específico no hipocampo, com ou sem generalização (Bender & Baram, 2007 Cavazos et al., Cross 2004). O diagnóstico da ELT dá-se, como descrito anteriormente de forma mais abrangente, com a combinação de técnicas de análise comportamental, vídeo-eletroencefalograma (V-EEG), junto com exames de imagens tais como ressonância magnética (Guerreiro, 2016).

A ELT em geral é adquirida como descrito a seguir, porém, quando não ocasionada por lesões, acredita-se que até 20% dela tenha características genéticas ou herdadas (Perucca, et al., 2017; Eadie, 2018). As displasias corticais são umas das causas mais frequentes que levam ao diagnóstico de ELT (Gataullina, et al., 2015) o que pode ocasionar, mais em adultos do que em crianças, esclerose hipocampal, que pode estar associada com a atrofia de outras áreas como a amígdala, giro parahipocampal, hipocampo e córtex entorrinal (Thom et al., 2009; Tatum, 2012; Gataullina, et al., 2015) (Figura 1). Entre outras causas menos frequentes têm-se os tumores, isquemias, hipóxia isquêmica, acidentes vasculares encefálicos, cavernoma (Ho, et al., 1998; Moran, et al., 1999; Prayson, et al., 2010; Thom, 2014; Wang, et al., 2015; Karunakaran, et al., 2018).

Como consequências secundárias à ELT tem-se as suas comorbidades, sendo a depressão a mais comum nos pacientes. Para o estudo da associação ELT-comorbidades há modelos animais que permitem estudar eventos tipo depressão os que corroboram esta comorbidade (Kanner, et al., 2012). Doença de Alzheimer, distúrbios emocionais, alterações cognitivas entre outras comorbidades psiquiátricas podem estar presentes em indivíduos com ELT (Li, et al., 2015; Yilmazer-Hanke, et al., 2016; García-Morales, et al., 2018; Chauvière, 2019).

1.3. A epileptogênese

Uma característica dos modelos animais (que será apresentada ao decorrer do trabalho é que eles mimetizam a ELT em humanos, especialmente quanto à presença de crises recorrentes espontâneas (CRE) (Lothman & Collins (1981), Turski et al 1983, Ben-Ari,

1985, Cavalheiro et al.,2006) . Especificamente o processo de epileptogênese (Figura 2) é o período compreendido entre as primeiras crises e a ocorrência de CRE. No período compreendido entre esses eventos, que pode durar semanas ou meses, ocorrem processos dinâmicos de excitabilidade, interconexões e reestruturação (neuroplasticidade) da circuitaria neural até o aparecimento das primeiras CRE (Pitkänen & Lukasiuk, 2011).

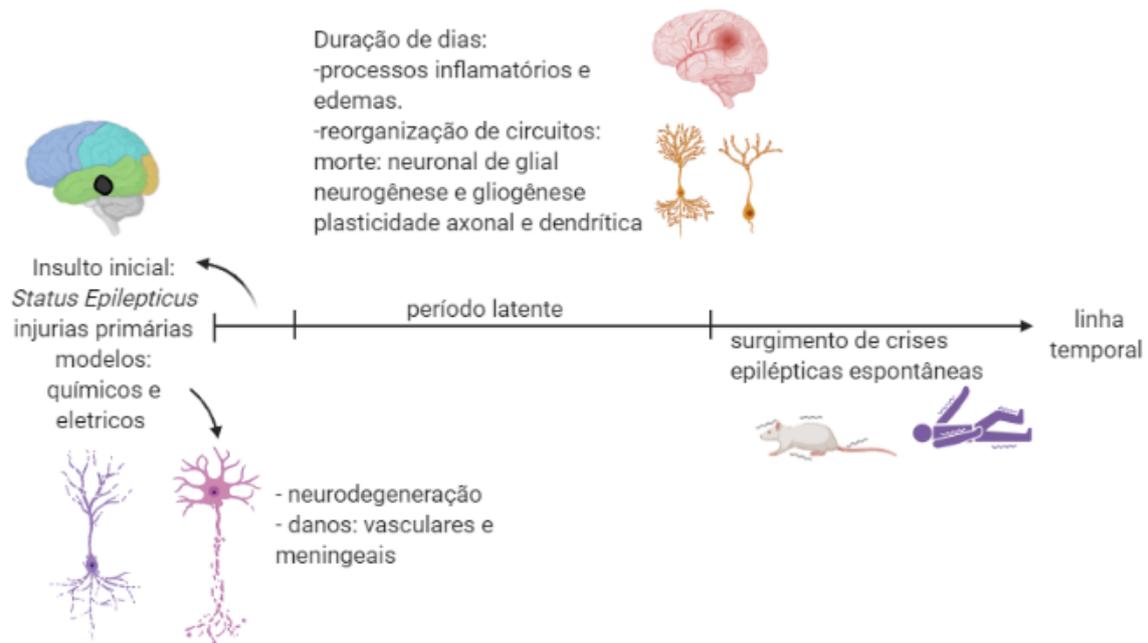


Figura 2. Processo de epileptogênese desde uma injúria/insulto inicial ou pela experimentação animal com modelos químicos e elétricos. Neste momento inicial podem-se observar perdas neuronais por apoptose e necrose, danos nas meninges e vasculares. No período latente, que pode variar de dias a meses, acontecem processos neurais como os inflamatórios e principalmente a reorganização dos circuitos neurais, que culminarão com o surgimento (na fase três) das crises epilépticas espontâneas. *Created with BioRender.com*

O processo inicial tem sempre um gerador ou um insulto. Em modelos animais um dos métodos é o *Status Epilepticus (SE)* por meio de modelos químicos ou elétricos (PITKÄNEN et al.,2007). O *SE* é definido pela ILAE como “uma ocorrência transitória de sintomas e/ou sinais devida à atividade neuronal excessiva”. Tal condição se caracteriza por uma crise epiléptica suficientemente prolongada ou repetida em intervalos curtos, de modo a levar a uma condição duradoura” (Trinka, et al., 2015). Em humanos o *SE* pode estar associado a, por exemplo, derrames ou traumatismos encefálicos, como os descritos já por Hesdorffer et al. (1998).

No período caracterizado como latente, que pode durar de dias a meses, ocorre a reorganização de circuitaria onde as conexões anteriormente normais mudam para conexões que podem levar a uma excitabilidade alterada, provocando a sustentabilidade das CRE, sendo essa a fase três do processo de epileptogênese com a ELT instaurada. (PITKÄNEN, et al.,2007; Loscher & Brandt, 2010; PITKÄNEN, et al.,2015).

1.4. Modelos animais de ELT

As epilepsias e síndromes epiléticas tem um amplo espectro de variedades, como exposto anteriormente, assim, estudá-las ao longo de décadas é um trabalho que exige métodos específicos a cada condição e sempre que possível modelos animais, computacionais e clínicos tem que conversar entre si, visando o aperfeiçoamento, para trazer aos indivíduos com epilepsia, o melhor benefício de tratamento e a resolução da doença. Portanto, e para tanto, os modelos animais são bem descritos na literatura, entretanto exigem cautela ao se fazer a translação para a clínica. Já que a ELT é a forma mais comum, na literatura encontram-se vários modelos a fim de garantir um estudo robusto da geração ao controle das crises e a proposição de novas DAE.

Para o estudo da ELT, os modelos usualmente utilizados são os elétricos, genéticos, patologias neurais e químicas (Kandratavicius, et al., 2014; Depaulis & Hamelin, 2015). Entre esses modelos há duas divisões: modelos agudos compreendendo modelos genéticos, elétricos de estimulações únicas e alguns modelos químicos como o pentilenotetrazol (PTZ), e modelos crônicos químicos que geram um processo de epileptogênese que leva a CRE. Os modelos geradores de *SE* induzidos pela pilocarpina (PILO), o ácido caínico (AC) e elétrico com estimulações elétricas repetidas, chamado de abrasamento (*kindling*) em um local definido, que pode levar a perda e alteração neuronal (Löscher & Dieter, 1988; De Deyn, et al., 1992; McIntyre, et al., 2002; Kandratavicius, et al., 2014; Van Erum, et al., 2019).

Modelos animais de estimulação elétrica, como já diz o nome, se utilizam da estimulação elétrica de áreas específicas ou total do cérebro, a fim de gerar crises, tendo como vantagem a alta reprodutibilidade e a baixa mortalidade dos animais (Löscher & Dieter, 1988; Kandratavicius, et al. 2014; Pitkänen, et al., 2017). Dentre os métodos mais estudados está o de crises induzidas por eletrochoque que ativa a uma frequência de 50 – 60 Hz todo o cérebro, gerando crises clônicas mínimas (Browning & Nelson,1985; Frankel, et al., 2001), em contrapartida a estimulação elétrica em áreas

específicas, geralmente límbicas, é amplamente utilizado para o estudo da eletrofisiologia das crises e de crises focais que tendem à generalização (Velísek & Mares, 2004; Sloan, et al., 2011). O *kindling* elétrico incorpora respostas comportamentais crescentes avaliadas pela escala de Racine (1972). O protocolo geralmente é crônico, com repetidas estimulações em um intervalo de tempo estabelecido, que aumenta a susceptibilidade do surgimento de CRE (Goddard, et al., 1969; He, Wen e McNamara, 2014). Usualmente o registro ideal de vídeo-EEG permite avaliar o sincronismo entre os eventos comportamentais e os EEGráficos, as chamadas pós descargas. (Goddard et al, 1969).

A genética é um fator que pode levar à ocorrência de crises, assim há modelos desenvolvidos para o estudo das epilepsias, entre eles temos os modelos audiogênicos, que apresentam crises audiogênicas com gravidade (medida por índices específicos, escala de gravidade do tronco cerebral (Garcia-Cairasco et al, 1992; e escala para crises límbicas (Racine, 1972) associada inicialmente à generalização quando da repetição de crises audiogênicas (*kindling* audiogênico; Marescaux et al, 1987). Este fenômeno inicialmente foi descrito por Pavlov na década de 20 (Ross & Coleman, 2002) e posteriormente deu origem à mais antiga linhagem audiogênica do mundo a *Krushinski-Molodkina*, [KM], (Poletaeva et al, 2017), os animais da linhagem “*Wistar Audiogenic Rat (WAR)*”, obtidos a partir do cruzamento endogâmico entre irmãos e que respondem a um estímulo sonoro de alta intensidade (110-120 decibéis) (Doretto, et al. 2003; Garcia-Cairasco et al, 2017). Outros modelos tais como os “*Wistar Albino Glaxo/Rijwijk rats (WAG/Rij)*” e os “*Wistar Audiogenic Sensitive Rat*” de Strasbourg também apresentam crises audiogênicas (Van, et al., 1986; Marescaux, et al., 1987). Há modelos genéticos de crises de ausência que mimetizam o que ocorre na clínica com a descarga de ponta e onda lenta, de aproximadamente 3Hz (nos modelos pré-clínicos usualmente esta frequência varia de 6Hz a 8Hz), e características como letargia e menor peso/crescimento há nos animais da linhagem “*Genetic Absence Epilepsy in Rats from Strasbourg (GAERS)*”(Felix, 2002; Akman, et al., 2009).

Crises febris, traumatismo craniano e hipóxia estão associados a patologias neurais, que geralmente ocorrem na infância e que elevam o risco para o desenvolvimento e ou pré-disposição da epileptogênese e por consequência aparecerem CRE e ELT (Holmes, 2009; Rakhade & Jensen, 2009). O modelo de percussão lateral de fluido e o impacto cortical controlado é um exemplo de traumatismo utilizado para o estudo da ELT (Loscher & Brandt, 2010).

Os modelos químicos crônicos, de drogas convulsivantes, são os mais utilizados para mimetizar a ELT. A PILO e o AC, as substâncias convulsivantes mais utilizadas de forma sistêmica ou diretamente em estruturas cerebrais (Furtado et al, 2002; Leite, et al., 2002). Microinjeções feitas diretamente em estruturas hipocâmpais e ou na amígdala majoritariamente, permitem estudar a ELT com menor morte neuronal do que o modelo sistêmico (Castro et al, Furtado et al, 2011; Rattka, et al., 2013). Aplicadas sistemicamente, PILO e AC induzem SE (SE-PILO e SE-AC) e levam ao processo de epileptogênese (Leite, et al., 2002; Dudek et al.,2006), porém há implicações que devem ser consideradas, discutidas em breve.

Para modelos químicos, assim como os anteriormente descritos, o grau de gravidade das crises é aferido utilizando a escala de Racine (1972) modificada por Pinel & Rovner (1978) que possui variação de *scores* de 0 a 8: 0- sem crise, 1- movimentos orofaciais, 2- balançar de cabeça, 3- mioclônia de membro anterior, 4- extensão dorsal (levantamento), 5- perda de equilíbrio com queda, 6- duas ou mais quedas, 7- pulo e corrida, 8- crise tônico-clônica (Racine, 1972; Pinel & Rovner, 1978)

1.5. *Status Epilepticus* induzido por Ácido Caínico e Pilocarpina

1.5.1. Ácido caínico

O AC, um composto que vem sendo utilizado como indutor de crises desde o final da década de 70 (Nadler et al., 1978), é extraído e isolado de uma alga vermelha, *Digenea simplex*, encontrada nos oceanos tropicais e subtropicais, pela primeira vez na década de 50 (Ben-Ari, 1985; Lévesque & Avoli, 2013). Inicialmente foi utilizado contra o verme *Ascaris lumbricoides* no combate da ascaridíase (Shinozaki & Shiro, 1970).

A neurotoxicidade do AC foi demonstrada por Olney e colaboradores (1974) o que deu início a experimentos que concluíram se tratar de um potente análogo do glutamato (Ben-Ari, 1985) e que atua como agonista dos receptores ionotrópicos, AMPA (Receptores alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico) e cainato (não-NMDA - receptor N-Metil-D-Aspartato). Os receptores cainato recebem esse nome devido à alta afinidade que algumas subunidades desse receptor apresentam pelo composto (Figura 3) (Bettler & Mulle, 1995; Vincent & Mulle 2009).

As características miméticas que fazem do AC um modelo de ELT são a indução de SE e subsequentemente, a epileptogênese com a presença das CRE (Stables et al., 2002;

Dudek, et al.,2006). A ação geradora de SE pelo AC, se deve à ativação sustentada de áreas do hipocampo, principalmente CA3, via receptores AMPA e cainato, o que resulta em despolarização prolongada dos mesmos e em sinapses glutamatérgicas nos interneurônios GABAérgicos, causa um aumento da inibição tônica pela ativação (Olney et al., 1974; Ben-Ari & Cossart, 2000), além de potencializar o efeito do glutamato endógeno impedindo a sua recaptação (Castillo et al., 2006) devido a lesões de áreas e regiões específicas (Castillo et al., 2006).

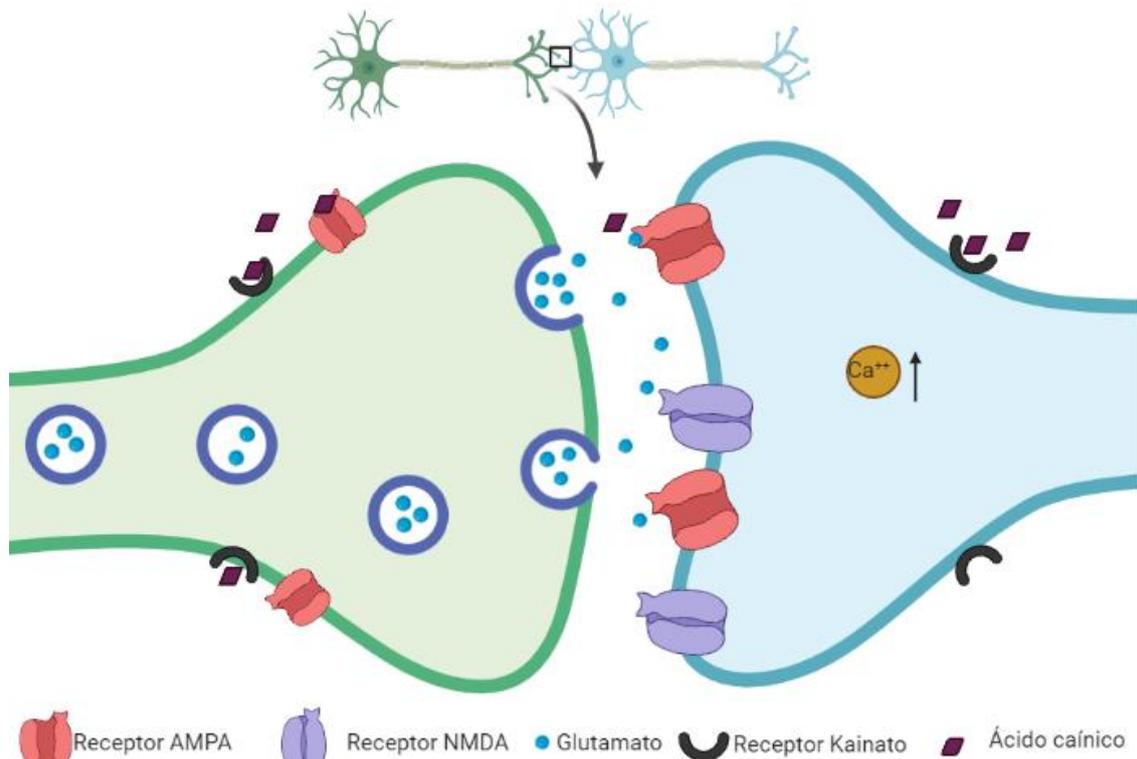


Figura 3. Esquema representativo da ação do AC nos neurônios, levando ao aumento do glutamato e conseqüentemente do Ca^{++} intracelular pela ação direta em receptores Cainato e AMPA. *Created with BioRender.com*

1.5.2. Pilocarpina

Assim como o AC, a PILO, extraída do *Pilocarpus jaborandi* já era utilizada na área médica, especificamente na clínica oftálmica como um regulador de pressão ocular (Holmstedt, et al., 1979), antes de ser usado como modelo de mimetização de ELT.

De fato, Turski e colaboradores (1983) já estudaram os efeitos da administração sistêmica de PILO e observaram que causava alterações comportamentais, que com o passar dos minutos levava a crises límbicas motoras, e alterações histológicas (Turski, et al. 1983a). O mesmo grupo fez um estudo com variações de doses de 100 a 400 mg/kg de PILO e observou os comportamentos acoplados a registro eletroencefalográfico, o que permitiu detectar crises límbicas (Turski, et al. 1983b). Em ambas as ocasiões os

pesquisadores notaram o dano causado em outras regiões do encéfalo, além das áreas hipocâmpais. Subseqüentes estudos (Turski et al., 1989), com o mecanismo de agonistas muscarínicos colinérgicos já conhecidos (PILO é um agonista M1), propuseram a PILO como um novo modelo para o estudo de drogas anti-epilépticas (DAE) (Turksi, 2000).

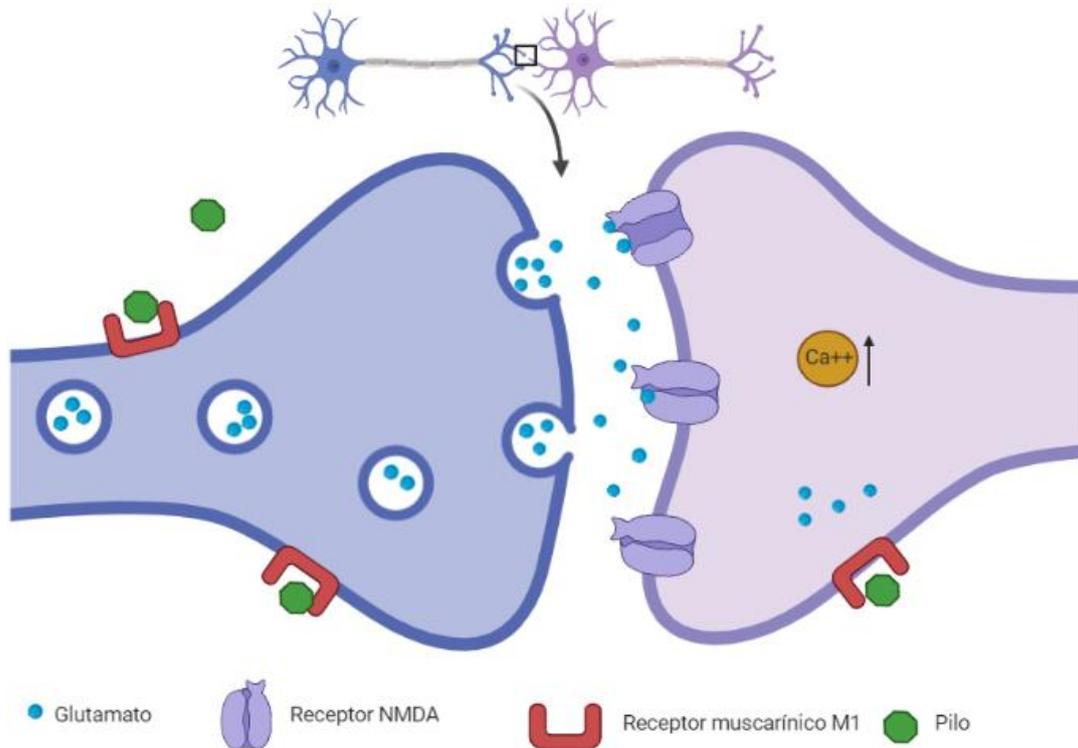


Figura 4. Esquema representativo da ação da PILO em neurônios pré e pós-sinápticos. A PILO age em neurônios muscarínicos M1, levando ao aumento intracelular de glutamato, que por sua vez atua em receptores NMDA, levando ao aumento de Cálcio (Ca^{++}) intracelular. A ação conjunta do aumento de Ca^{++} e o aumento do glutamato levam a citotoxicidade celular, causando a neurodegeneração (Lee, et al. 2017). *Created with BioRender.com*

O mecanismo de ação da PILO tem início sistêmico com a ativação colinérgica de receptores muscarínicos do tipo M1, devido à sua ação de agonista muscarínico e esse efeito colabora com a ativação de receptores do tipo NMDA, sustentando as crises epilépticas (Figura 4) (Hamilton, et al. 1997; Nirwan et al., 2017; Lee, et al. 2017)).

2. Neurodegeneração observada pela técnica de impregnação por prata

O nosso objetivo é detectar neurônios em degeneração impregnados por prata (argirofilia Ag^+), por meio de uma modificação da técnica original de Golgi (essa técnica é diferente da proposta por Golgi em 1873). Mesmo com modificações como a de Vints

e colaboradores (2019) que deixa a técnica com maior resolução, aquela modificada por De Olmos (1994) tem algumas especificidades para a citotoxicidade glutamatérgica. Assim, a técnica de De Olmos (1994) permite a identificação apenas de neurônios em degeneração associados com o SE-PILO e SE-AC.

Em diferentes janelas de tempo, 24 h, 48 h e 72 h, foram feitas as imagens das lâminas previamente confeccionadas a partir da técnica de impregnação por prata de De Olmos (1994). Utilizando essas imagens foi feita uma comparação da morfologia de neurônios na situação controle (estado normal), como já descritos na literatura, por comparação com os neurônios Ag⁺, degenerados. A quantificação de neurodegeneração da área do hipocampo permitiu obter a densidade de neurônios Ag⁺. Apresentam-se resultados preliminares conforme a descrição. Esses dados deveriam ser complementados com protocolos que utilizam a técnicas de histofluorescência para Fluoro-Jade C (Schmued et al., 1997; Castro et al., 2011) que marca neurônios em neurodegeneração por necrose, e que seriam executados durante o ano de 2020. Entretanto com as adversidades mundiais impostas pela pandemia do Covid-19, não houve a possibilidade de realizar essa complementação.

2.1. Impregnação por prata de De Olmos

A técnica de impregnação por prata de De Olmos (1994), diferente de outras que não detectam neurodegeneração, possibilita tal investigação, devido à sua especificidade na marcação pela impregnação, pela detecção de danos neurais causados por epilepsia, efeitos de isquemia entre outros traumas que possam vir a causar lesões. É uma técnica que possibilita a detecção de lesões por neurotoxinas como a 6-hidroxidopamina, puromicina, toxina tétânica e os efeitos excitotóxicos do glutamato (De Olmos, et al., 1994).

2.2. Metodologia

Este projeto faz parte do Edital MCT/CNPq 05/2007 - PROSUL / Edital 05/2007 – PROSUL, parte dos protocolos foi aplicada por membros do Laboratório de Neurofisiologia e Neuroetologia Experimental – LNNE, equipe composta por: Simone Marroni, Eduardo Umeoka, Olagide Wagner Castro, Victor R. Santos e Artur Fernandes. Estes indivíduos cederam lâminas, a fim de permitir fazer a análise histológica para a construção desta Dissertação.

2.2.1. Animais de experimentação

Foram utilizados dezessete (17) ratos Wistar machos adultos (250-280 g), provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos individualmente em gaiolas em ambiente controlado, com temperatura constante (21°C) e 12/12 horas de ciclo claro / escuro, com as luzes acesas às 07:00 e apagadas às 19:00 e acesso livre a comida e água. Os procedimentos de manutenção e experimentais estavam de acordo com o Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório recomendados pela Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC) e que seguem normas internacionais (*Society for Neuroscience, SfN*) de uso de animais em experimentação. Todos os esforços foram feitos para minimizar qualquer dor, desconforto e estresse dos animais durante os procedimentos experimentais. Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com as diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) nº 028/2010 e aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (CETEA).

2.2.2. Indução de SE por PILO e AC

O AC e a PILO estão entre os modelos experimentais mais utilizados para estudar a ELT (Leite et al, 2002; Kandratavicius et al, 2014). Sete (7) animais foram tratados com metil-escopolamina (1 mg/kg, i.p.; todos os medicamentos fornecidos pela Sigma, St. Louis, EUA) 30 minutos antes do cloridrato de PILO para minimizar os seus efeitos periféricos. A PILO foi injetada nestes animais em uma dose única de 320 mg/kg i.p. O início do SE foi considerado quando os animais sofreram uma crise motora de classe 3 na escala de crises límbicas de Racine (1972), caracterizada por clônus anterior, seguido por crises tônico-clônicas sustentadas que duraram mais de 5 min. Todos os animais foram tratados com 10 mg/kg de Diazepam i.p. (União Química, São Paulo, Brasil) 90 minutos após o início do SE.

O AC (Sigma K-0250) foi dissolvido em NaCl a 0,9% e injetado i.p. (9 mg/kg) e injetados em 10 animais. O desenvolvimento e a duração da atividade de crise após a injeção de AC foram observados e o comportamento filmado por 3 horas. O

desenvolvimento comportamental do SE foi classificado utilizando a escala descrita por Lothman e Collins (1981). Apenas os animais que atingiram o quarto estágio da escala foram considerados para o estudo.

2.2.3. Perfusão

Os animais foram anestesiados com Tribromoetanol 2,5% (Aldrich). A caixa torácica foi aberta com auxílio de uma tesoura e a aorta descendente clampeada na altura do abdômen, para fixação somente do tecido em interesse, o cérebro, e não todo o animal. Em seguida foi injetado no ventrículo esquerdo nitrito de sódio 0,2 ml, uma solução vasodilatadora, na concentração de 0,5%, então a aorta foi canulada e o rato perfundido com 150 ml de solução lavadora (NaCl 0,8%, sacarose 0,8% e glicose 0,4% diluídos em 100 ml de água mili-Q) e na sequência com 300 ml de solução fixadora (sulfito de sódio na concentração de 2%) 2,2 ml, borato de sódio 3,8 g, paraformaldeído 40 g e ácido bórico 10 g, diluídos em 1000 ml de água mili-Q, pH 7.4). As cabeças dos ratos foram cortadas, os cérebros foram retirados e transferidos à solução fixadora por 24 h. Depois foram colocados na sacarose 30% (Merck) diluída em solução fixadora para crioproteção.

Após submersão na sacarose, os cérebros foram congelados em isopentano 99% (Vetec) e gelo seco e transferidos para o freezer -20°C (*Kelvinator Scientific, Conway, USA*).

2.2.4. Corte dos cérebros

Os cérebros foram cortados em secções de 40 μm em criostato (*Microm HM-550-E, Walldorf, Germany*) com temperatura variando de -18° a -20°C . As secções foram colocadas em placas contendo solução fixadora e armazenadas na geladeira.

2.2.5. Histoquímica de prata amino cupro argêntica (A-Cu-Ag)

O procedimento iniciou-se com a preparação de uma solução pré-impregnadora composta de: água bidestilada 100 ml, nitrato de prata 100 mg, ácido α -amino-butírico 53 mg, D1-alanina 46 mg, nitrato de cobre 0,5%, nitrato de cádmio 0,5%, nitrato de lântano 0,5 %, vermelho neutro 0,5 %, piridina 1,0 ml, trietanolamina 1,0 ml e isopropanol 2,0 ml.

Essa solução pré-impregnadora foi aquecida até alcançar 50°C no forno micro-ondas. Depois de deixar por toda a noite à temperatura ambiente, a solução foi filtrada. Após filtrar, os cortes foram lavados com água deionizada (2 banhos de 30 segundos em dois recipientes distintos), em seguida os cortes passaram pela solução pré-impregnadora aquecidos em constante agitação no forno micro-ondas até alcançar os 50°C.

Depois que a solução chegou à temperatura ambiente (2 horas aproximadamente) os cortes foram submetidos a 1 banho com água deionizada e 2 banhos de 30 segundos com acetona. Após os cortes foram passados a uma solução impregnadora preparada com os seguintes reagentes: nitrato de prata 412 mg, água bidestilada 5,0 ml, etanol 100% 4,0 ml, acetona 0,05 ml, hidróxido de lítio 0,4% 3,0 ml e amoníaco 0,65 ml.

Neste estágio, os cortes permaneceram em agitação constante durante 50 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram banhados com uma solução redutora contendo: formalina 10% 11 ml, ácido cítrico 1% 6,3 ml, etanol 100% 90 ml e água bidestilada 800 ml, durante 25 minutos em rotação constante. Foi adicionado a cada 5 minutos um volume de 0,3 ml da mesma solução impregnadora utilizada inicialmente. Depois os cortes foram submetidos a 1 banho com água deionizada, 1 banho com ácido acético e 2 banhos com água deionizada.

No processo de descoloração, os cortes foram submetidos a 1 banho em solução de ferrocianeto de potássio (3 minutos) e em outro de permanganato de potássio (30 segundos), intercalando estes com banhos de água bidestilada. Finalmente os cortes foram banhados com preparações estabilizadoras de tiosulfato de sódio e fixador rápido, permanecendo em água deionizada por 24 horas.

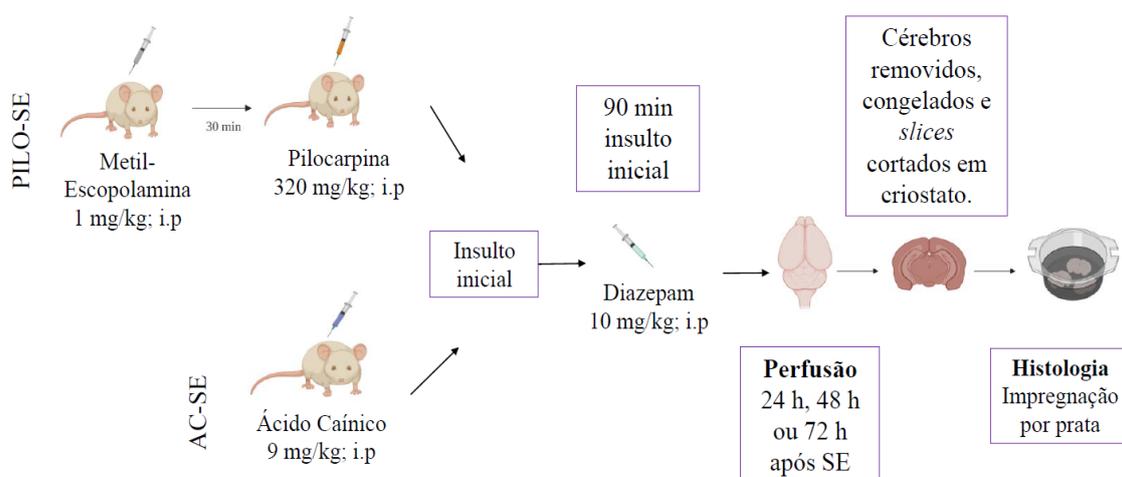


Figura 5. Imagem representativa dos métodos, dosagens e tempos utilizados desde as aplicações dos compostos indutores de SE, passando pelo período de perfusão e o procedimento histológico utilizado, a fim de observar a neurodegeneração.

2.2.6. Aquisição de imagens

A imagens a fim de serem quantificadas para obtenção de resultados, foram obtidas utilizando o microscópio *Olympus BX-61, Scan Scope*, no Departamento de Biologia Celular e Molecular e de Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto no Laboratório Multiusuário de Escaneamento de Lâminas.

2.2.7. Análise quantitativa de neurodegeneração e contagem de células

Para a contagem do número de células marcadas pela técnica de impregnação por prata de De Olmos (1994), a qual nos mostra neurodegeneração a partir das células (neurônios) argirofílicos (Ag^+), foi utilizado o programa *Image J* (Versão 1.52d Wayne Rasband NIH, USA), e o *plug-in cell counter* (Kurt De Vos, 2010) que permitiu a contagem manualmente das células Ag^+ .

Plotagem e análise de dados

Após contagem, os dados foram plotados em uma planilha do *Microsoft Excel®* (Tabelas 2 a 7), onde eram apresentados os dados referentes a cada animal amostrado, neste caso a área do hipocampo em micrômetros quadrados (μm^2) e milímetros quadrados (mm^2), número de neurônios Ag^+ e por fim os dados normalizados (células Ag^+/mm^2). A análise estatística foi estabelecida pela análise de variância de duas vias (*two-way ANOVA*), adotando o nível de significância em $p \leq 0,05$. Análises foram feitas com o auxílio do *GraphPad Prism version 7.00 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA*, assim sendo expresso a média e o erro padrão médio.

2.3. Resultados

2.3.1. Análise morfológica

Pode-se observar que a técnica de impregnação por prata foi eficaz em sua marcação para neurodegeneração, os tecidos passaram por contra coloração de vermelho neutro a fim de ilustrar que há células viáveis, uma vez que o corante vermelho neutro marca os lisossomos de células viáveis (Borenfreund & Puerner, 1984; Fotakis & Timbrell, 2006). Ainda de acordo com De Olmos (1994) os neurônios Ag^+ , apresentam impregnação por todo o corpo celular, axônio, dentritos e ramificações dendríticas. Detalharemos tais observações mais adiante nos resultados.

Há, pela técnica de impregnação por prata, duas regiões cerebrais em que se pode observar com clareza esta marcação: áreas corticais e áreas hipocâmpais.

O neocórtex apresenta 6 camadas (Figura 5), porém nem sempre é possível por meio de técnicas histoquímicas uma perfeita visualização delas separadamente. Assim temos as seguintes camadas segundo (Kandel, 2000):

I- Camada molecular: a mais superficial, não apresenta muitos corpos de neurônios, axônios horizontais;

II- Camada granular externa: são interneurônios do córtex, ramificação dendrítica próxima ao corpo e axônios curtos;

III- Camada de células piramidais ou piramidal externa. Corpo celular com formato triangular, dando nome a tais neurônios, de tamanhos variados

IV- Camada granular interna.

V- Camada piramidal interna (ou ganglionar).

VI- Camada de células fusiformes, multiformes ou pleomórficas: axônio descendente que penetra na substância branca.

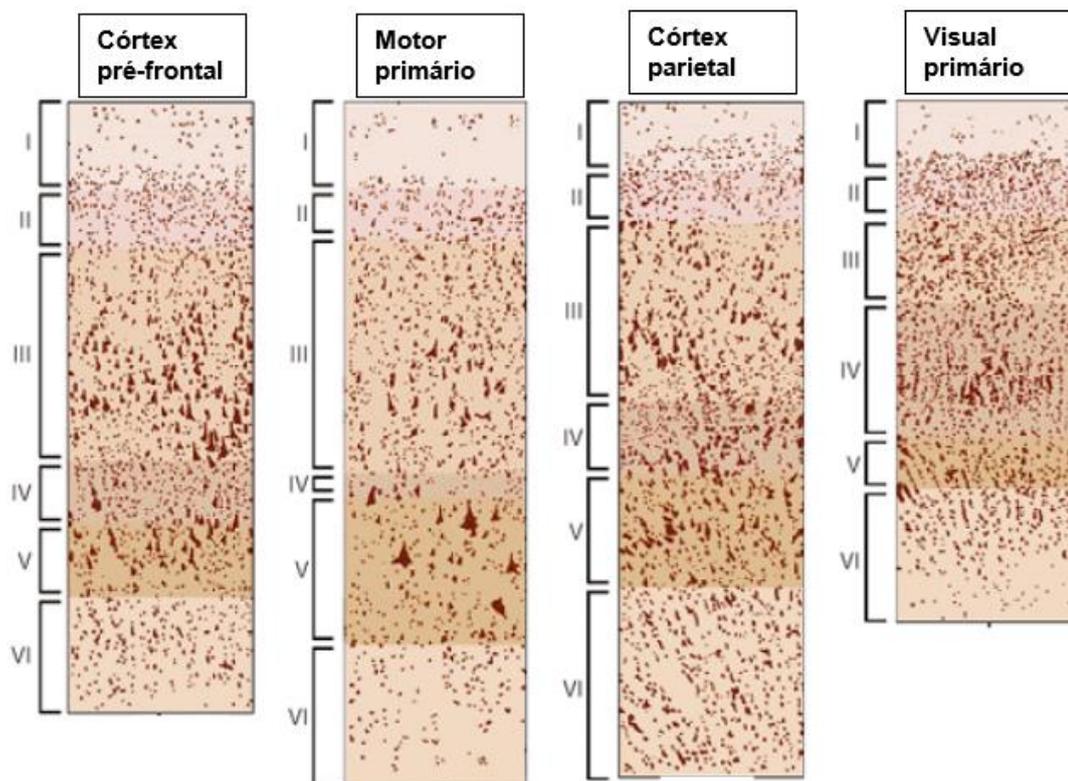


Figura 5. Diferentes lâminas corticais. Em I- Camada molecular, II- Camada granular externa, III- Camada de células piramidais, IV- Camada granular interna, V- Camada piramidal interna, VI- Camada de células fusiformes. Imagem modificada de Kandel (2000). *Principles of Neural Science*.

Ao sofrer danos degenerativos, como a excitotoxicidade glutamatérgica pela indução de SE, os neurônios apresentam alterações patológicas tais como retração, atrofia e necrose, apresentando características como diminuição do volume e núcleo picnótico. Figura (6).

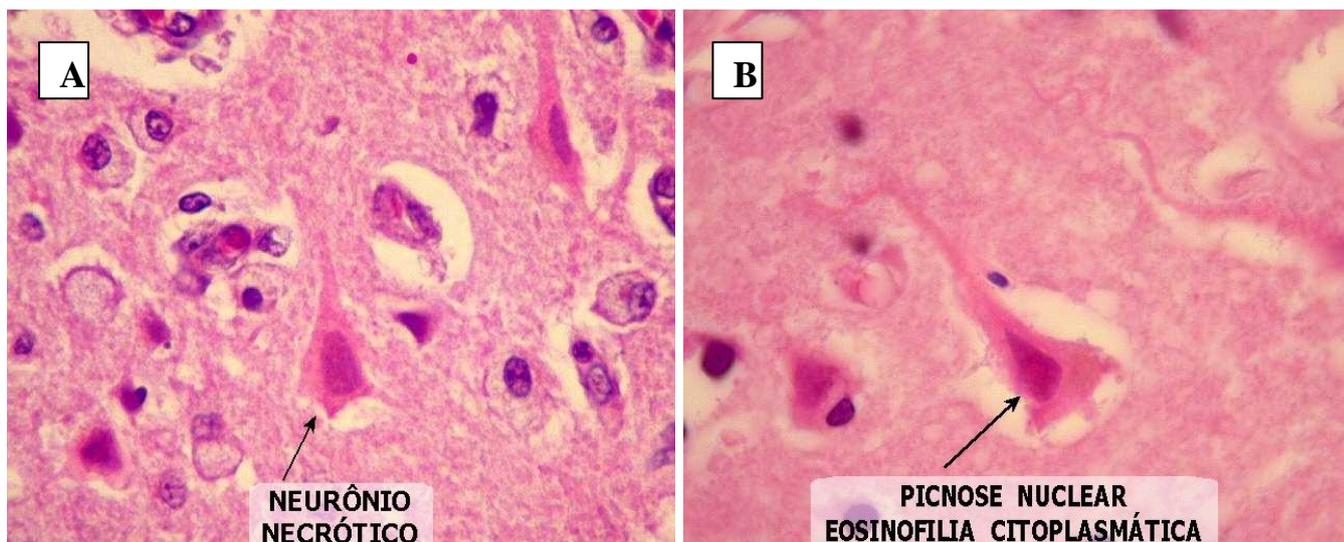
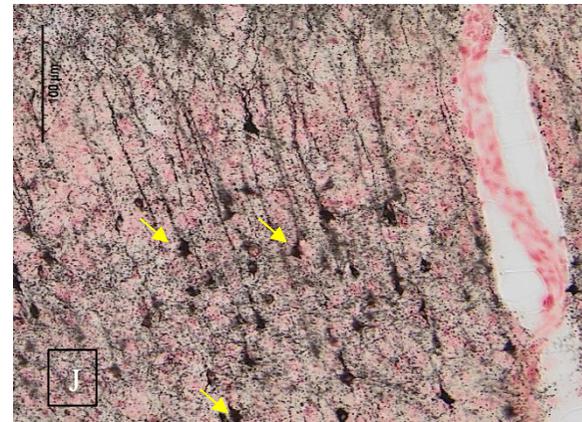
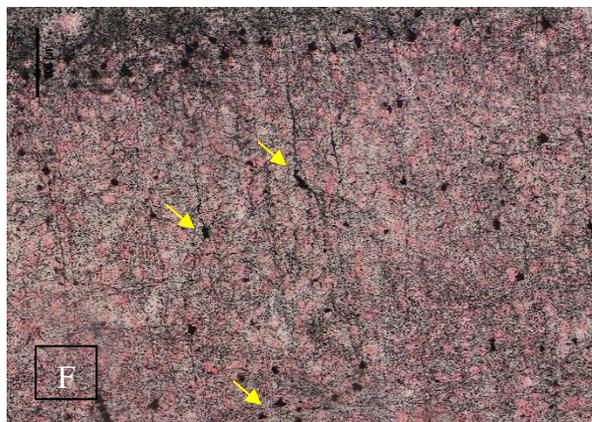
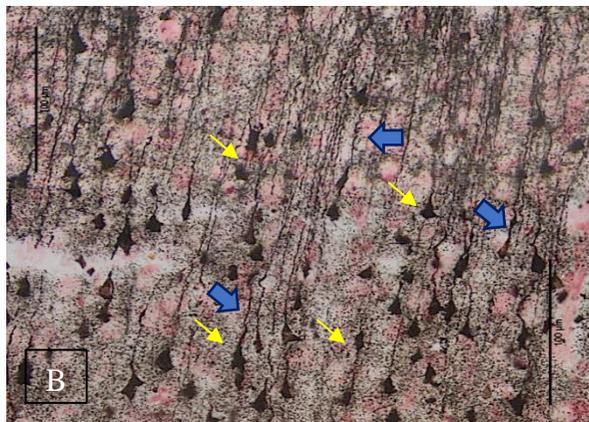


Figura 6. Em A presença de um neurônio necrótico com coloração de Hematoxilina Eosina (HE). Em B a seta apontando para um núcleo picnótico de um neurônio em degeneração, corado por HE. Imagens extraídas do acervo de imagens do site <http://anatpat.unicamp.br/lamneuro3.html>.

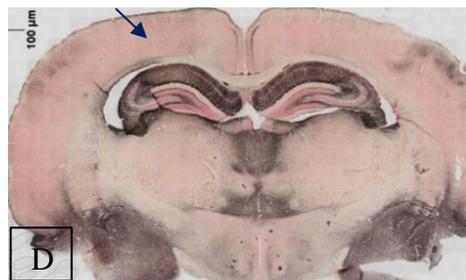
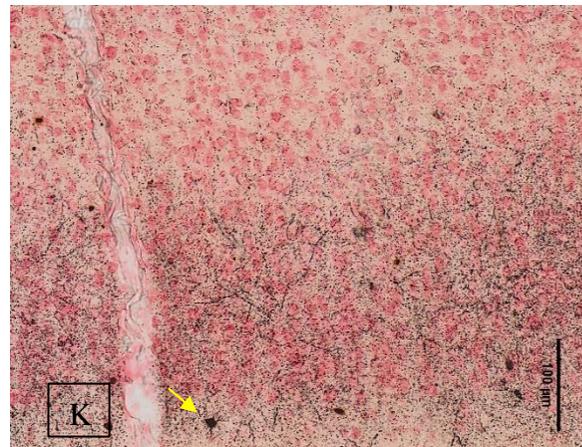
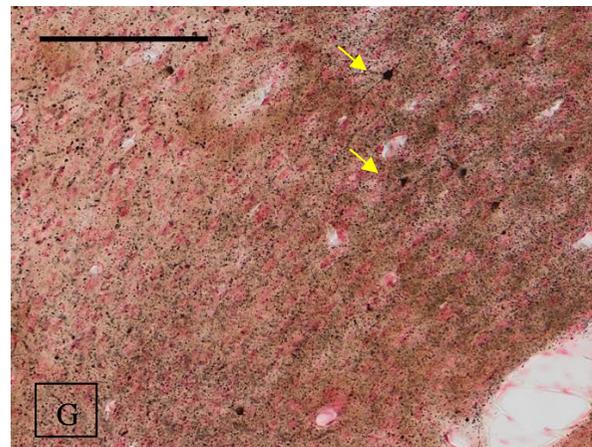
A seguir, pode ser vista em quantidades diferentes, nas 3 janelas temporais 24, 48 e 72 horas presença de neurodegeneração ilustrada pelos neurônios argirofílicos Ag^+ . A citoarquitetura em sua maioria permanece preservada, núcleos densamente marcados, assim como os núcleos picnóticos apresentados anteriormente (Figura 6) e marcação ao longo da extensão do axônio (Figura 7).

Figura 7. Imagens de cortes histológicos que após perfusão passaram pela técnica de impregnação por prata de De Olmos (1994), onde é possível observar os corpos celulares de neurônios em degeneração (seta amarela) e a presença de dendritos apicais (B) em formato de saca-rolha (*corkscrew-like*) (K Ishida, et al., 2004) indicados pela seta azul com núcleos densamente corados. A seta azul em A, D, E, H, I e L indica de qual local as demais imagens sofreram o aumento de 20 vezes. As imagens A, B, E, F, I e J, pertencem ao grupo PILO-SE e as restantes ao grupo AC-SE. Também estão apresentadas as janelas temporais de 24 horas em A, B, C e D, 48 horas em E, F, G e H e 72 horas em I, J, K, e L.

Grupo Pilo-SE



Grupo AC-SE



2.3.2. Morfologia e Quantificação hipocampal

O hipocampo é formado pelos Cornos de Amon CA1, CA2 e CA3 e junto com o giro denteado (GD) e o *subiculum* dão origem à formação hipocampal. A região de hipocampo e a do *subiculum* apresentam, como lâminas celulares, principalmente neurônios com corpo celulares piramidais, enquanto o GD apresenta neurônios com corpos granulares (Figura 8) e ambos os tipos celulares, piramidais e granulares, são glutamatérgicos (Spencer, 2019).

Em todas as janelas temporais e nos dois modelos de indução de SE, pode ser observada a presença de neurônios argirofílicos, indicando a presença de neurodegeneração. Além de uma densa marcação dos corpos celulares em tons quase pretos é possível observar que a técnica de impregnação, assim como nos neurônios corticais, foi capaz de marcar os processos dendríticos. É possível, através da contra coloração (vermelho neutro) observar a presença de neurônios viáveis.

Os achados a partir da quantificação ilustram na evolução temporal que na região CA1 o número de células Ag+ se mantém 72 horas após o SE induzido pelo SE-PILO. Interessantemente, nas demais regiões o número de células Ag+ tende a diminuir após 72 horas de SE, principalmente na região do giro denteado DG. Em contrapartida no modelo de SE-AC, a região de CA1 apresenta diminuição na densidade de células Ag+ correspondentes ao período de 24 horas para 72 horas. Neste modelo também, as demais regiões, CA2, CA3 e GD apresentam menor densidade de células Ag+ e tendem a se manter nesses níveis, nos períodos entre 24 horas e 72 horas após SE-AC (Figura 9).

Assim podemos observar que no modelo em PILO-SE a densidade de células Ag+ em CA1 é semelhante ao AC-SE (PILO=48.7±32.7 vs AC=36.9±5,3) no período de 24 horas após SE. Nas demais janelas temporais 48 horas (PILO=53.6±0 vs AC =20.4±4.5) e 72 horas (PILO=54±0 vs AC =20.4±6.2) a densidade se assemelha para CA1(Figura 10) e presença de células Ag+ ectópicas (figura 11).

A região de hipocampo correspondente a CA 2, apresenta densidade maior em 24 horas (PILO=6.9±0.7 vs AC=0,9±0,9) e semelhante nas janelas temporais 48 horas (PILO=5±0 vs AC=2.7±1.3) e 72 horas (PILO=2.7±0 vs AC=2.4±1.1) (figuras 12 e 13).

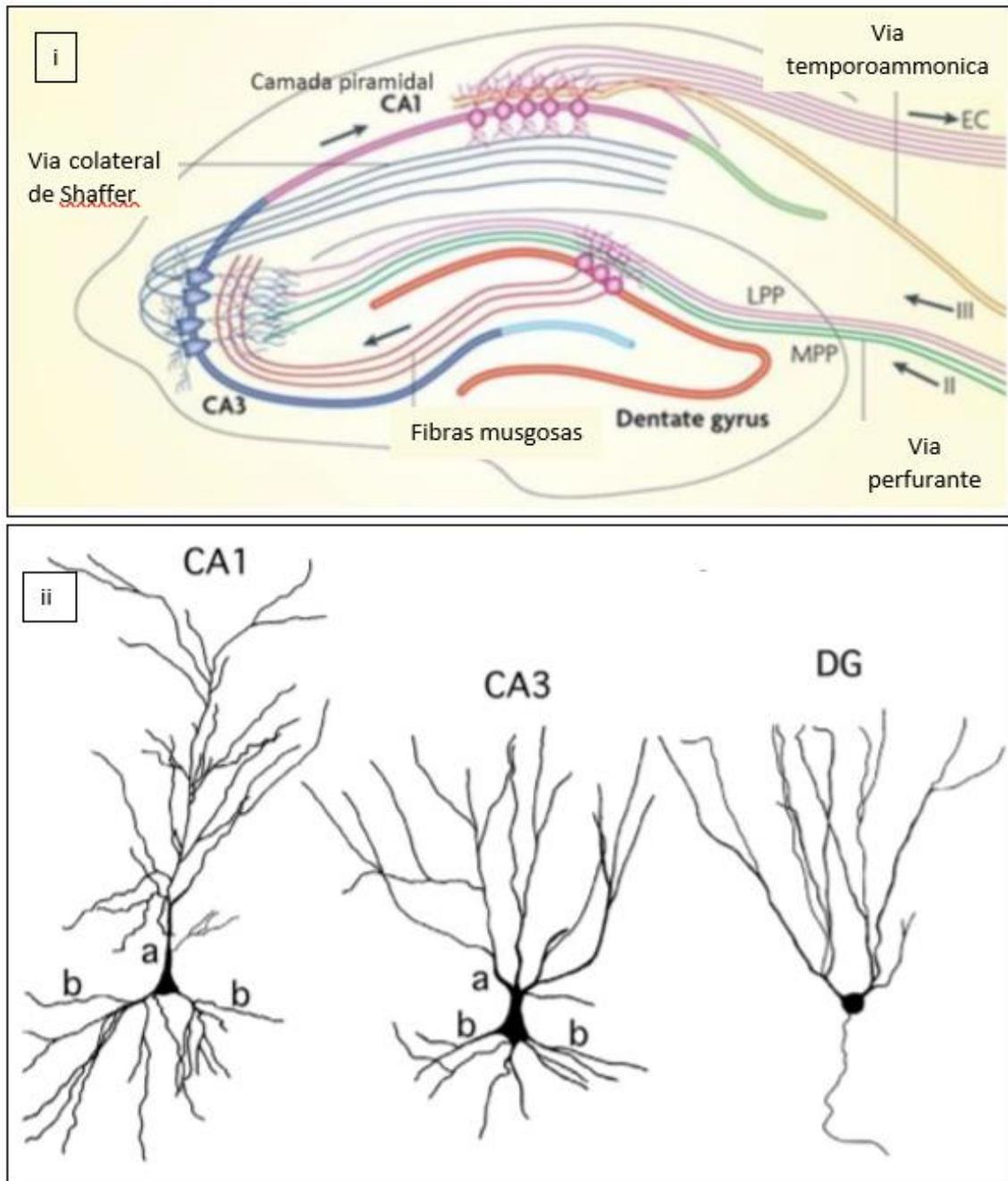


Figura 8. Imagens representativas da formação hipocampal e de neurônios que a compõem. Em (i) imagem representativa das vias de entrada, conexões e saída da formação hipocampal, bem como localização representativa de cada área CA1, CA3, GD. Em (ii) desenho esquemático de neurônios piramidais de CA1 e CA3 e de células granulares do GD, em (a) estão as ramificações dendríticas apicais, em (b) árvore dendrítica basilar (basal). (i) imagem modificada de Deng et al., 2010. (ii) imagem modificada de Spencer (2019).

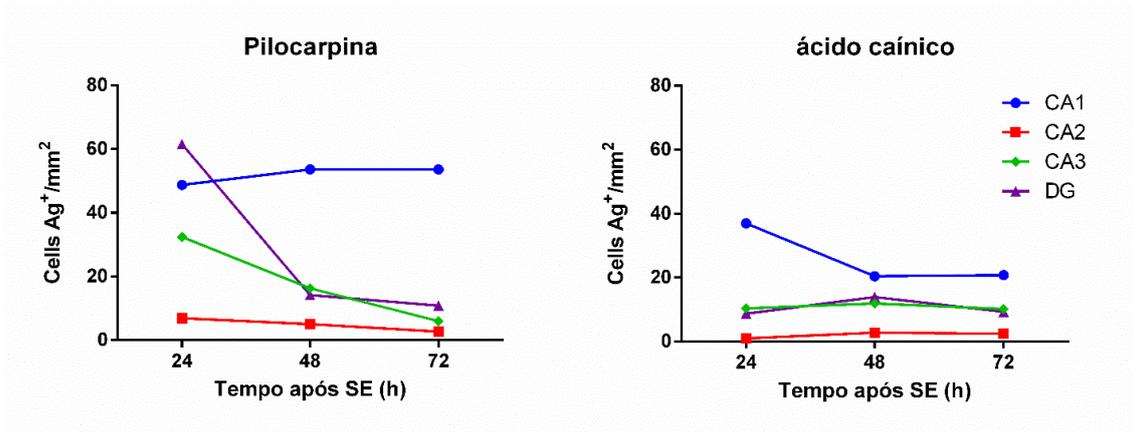


Figura 9. Densidade de células Ag⁺ em função das janelas temporais analisadas de 24, 48 e 72 horas após SE-PILO (esquerda) e SE-AC (direita). (n= PILO-SE= 6; AC-SE= 8)

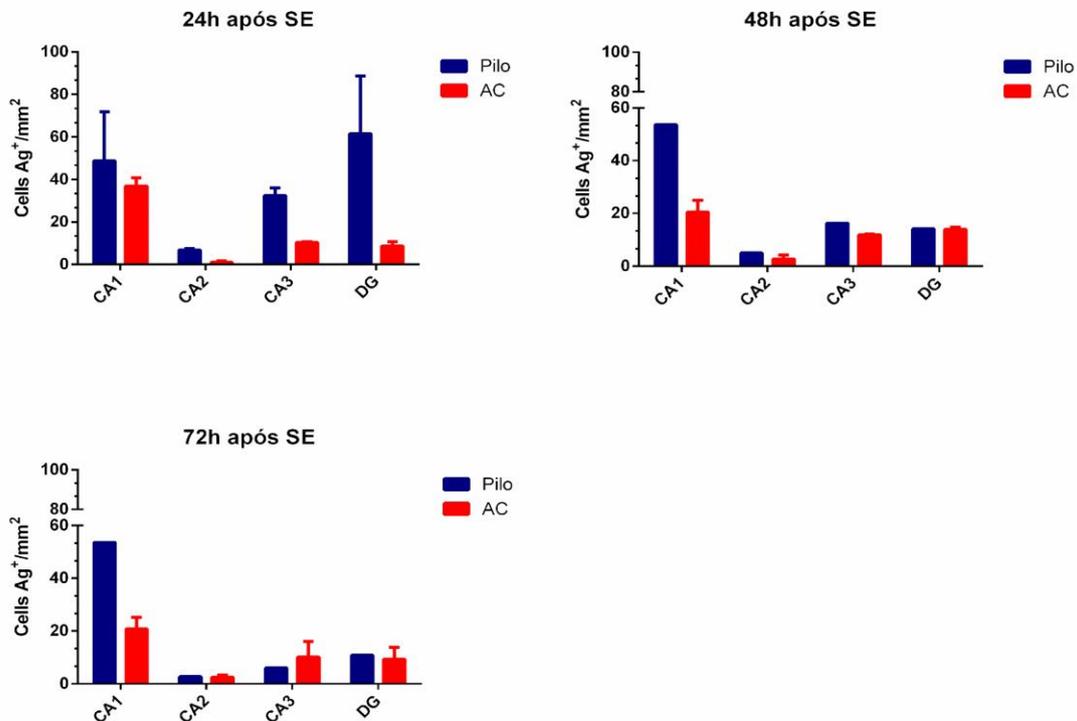


Figura 10. Densidade de células Ag⁺ na região hipocampal de CA1 no período de 24 h após PILO-SE e AC-SE são semelhantes, mas não há variação estatística entre os tempos de tratamento ($F [2,4] = 0,1316$ $p = 0,8804$). Nos períodos de 48 h e 72 h respectivamente o modelo de PILO-SE apresenta maior densidade de Ag⁺ que em AC-SE. Resultados expressos em média \pm SEM, análise *two-way ANOVA*. (n= PILO-SE= 6; AC-SE= 7).

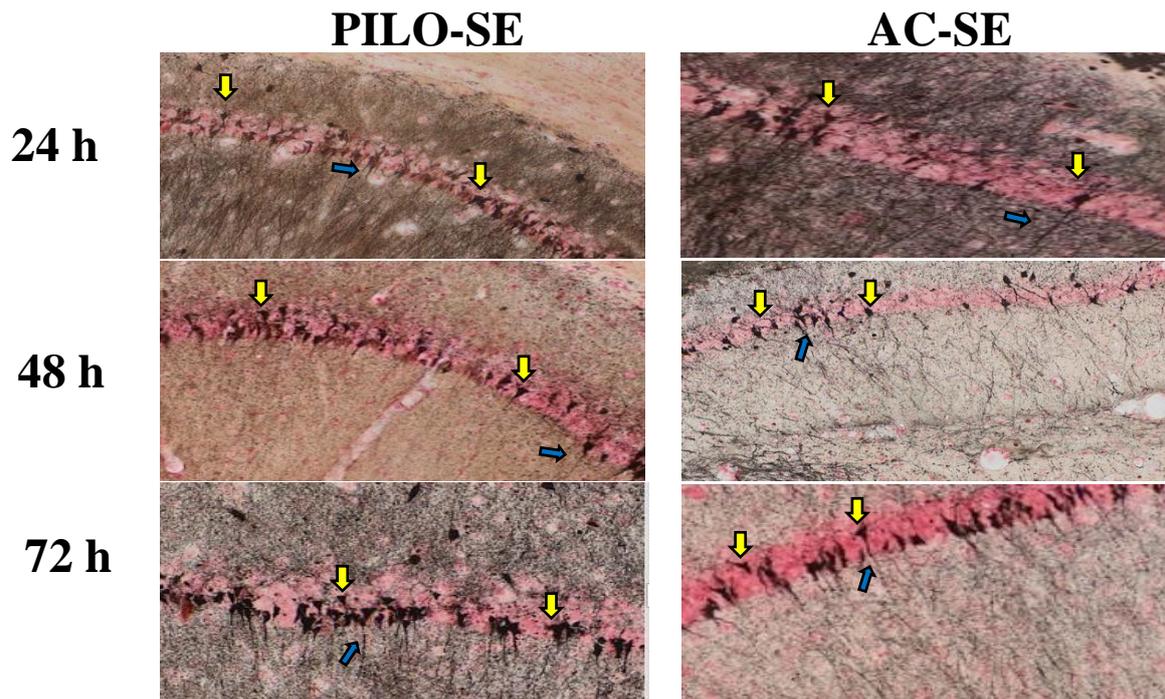


Figura 11. Imagens representativas da região CA1 dos modelos de PILO-SE e AC-SE nas três janelas temporais 24 h, 48 h e 72 h onde é possível ver a morfologia corpuscular dos neurônios degenerados (setas amarelas), bem como alguns prolongamentos dendríticos (seta azul).

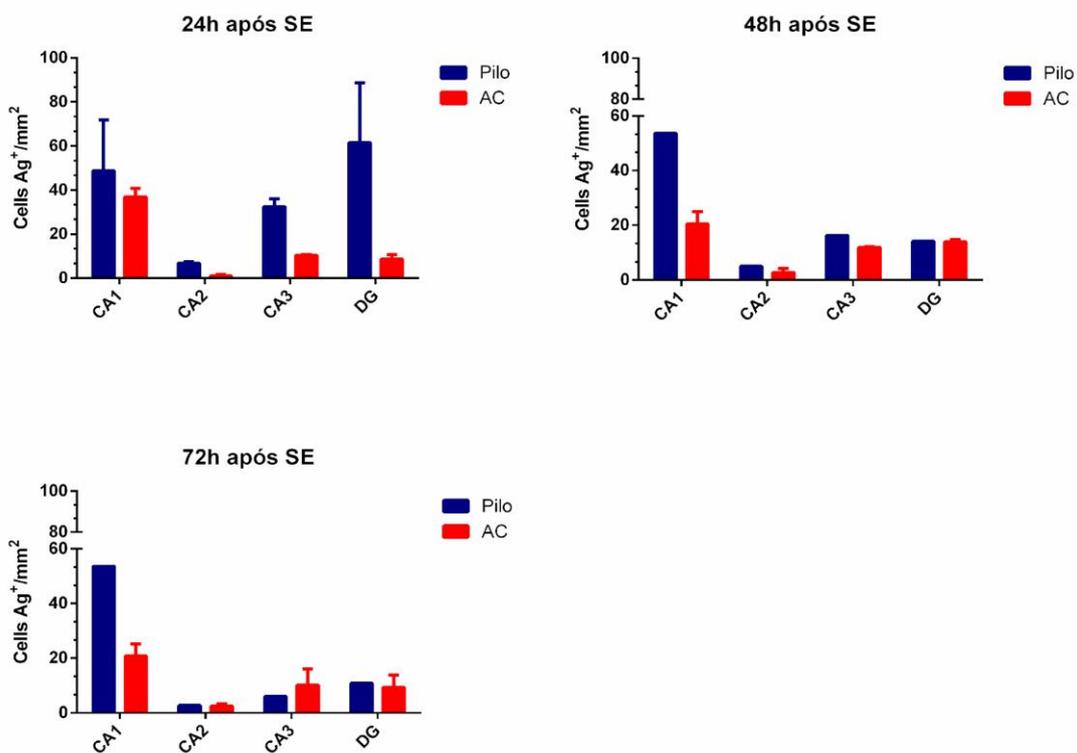


Figura 12. Contagem de células na região CA2. No período de 24 h a densidade de PILO-SE é maior que em AC-SE, enquanto nos períodos de 48 h e 72 h tendem a ser

semelhantes, porém não há variação estatística entre os tempos de tratamento ($F [2,4] = 0,1474$ $p = 0,3315$). Resultados expressos em média \pm SEM, análise *two-way ANOVA*. (n= PILO-SE= 6; AC-SE= 7)

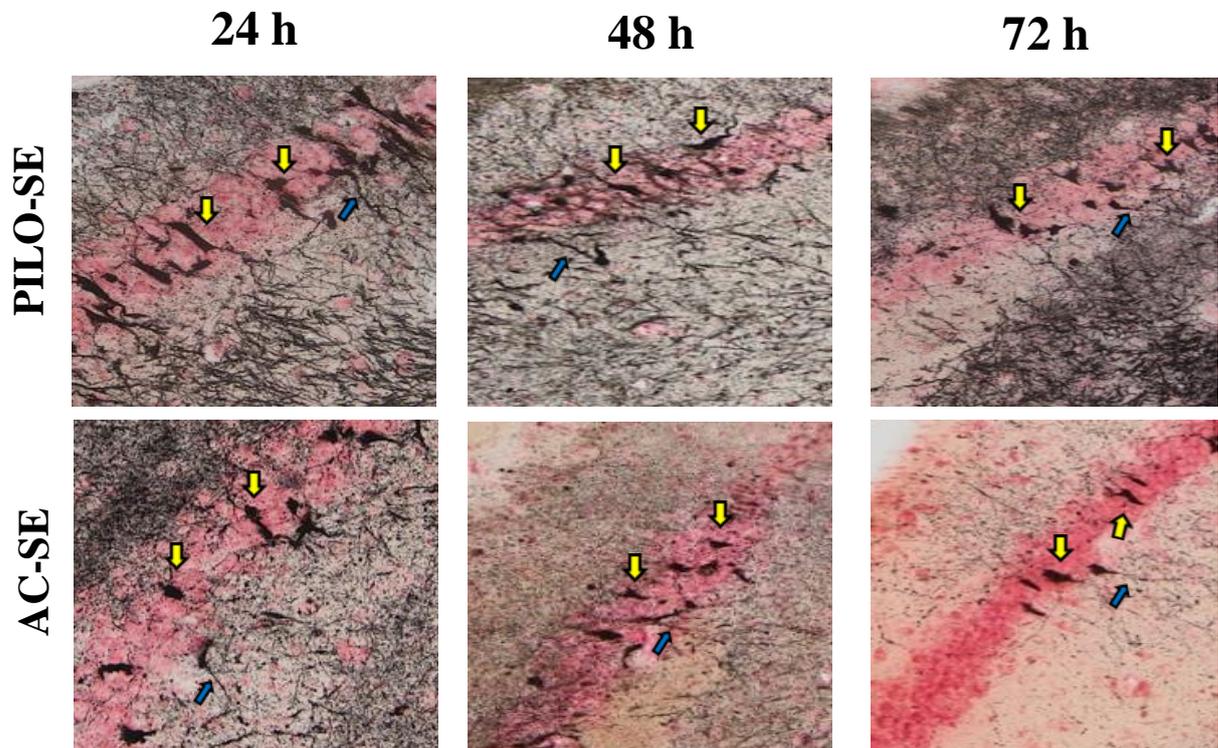


Figura 13. Imagens representativas de CA2 dos modelos PILO-SE e AC-SE nas três janelas temporais 24, 48 e 72 horas, onde é possível observar os corpos celulares (setas amarelas) e alguns prolongamentos de dendritos corados pela impregnação de prata (setas azuis) .

O modelo de PILO-SE em CA3 no período de 24 h mostrou uma densidade de células Ag+ maior que AC-SE (PILO= 32.4 ± 5.2 vs AC = 10.3 ± 0.6), enquanto nas janelas temporais de 48 h e 72 h a densidade é semelhante 48 h (PILO= 16.3 ± 0 vs AC= 11.9 ± 0.1) e 72 h (PILO= 5.9 ± 0 vs AC= 10.1 ± 8.1). (Figuras 14 e 15).

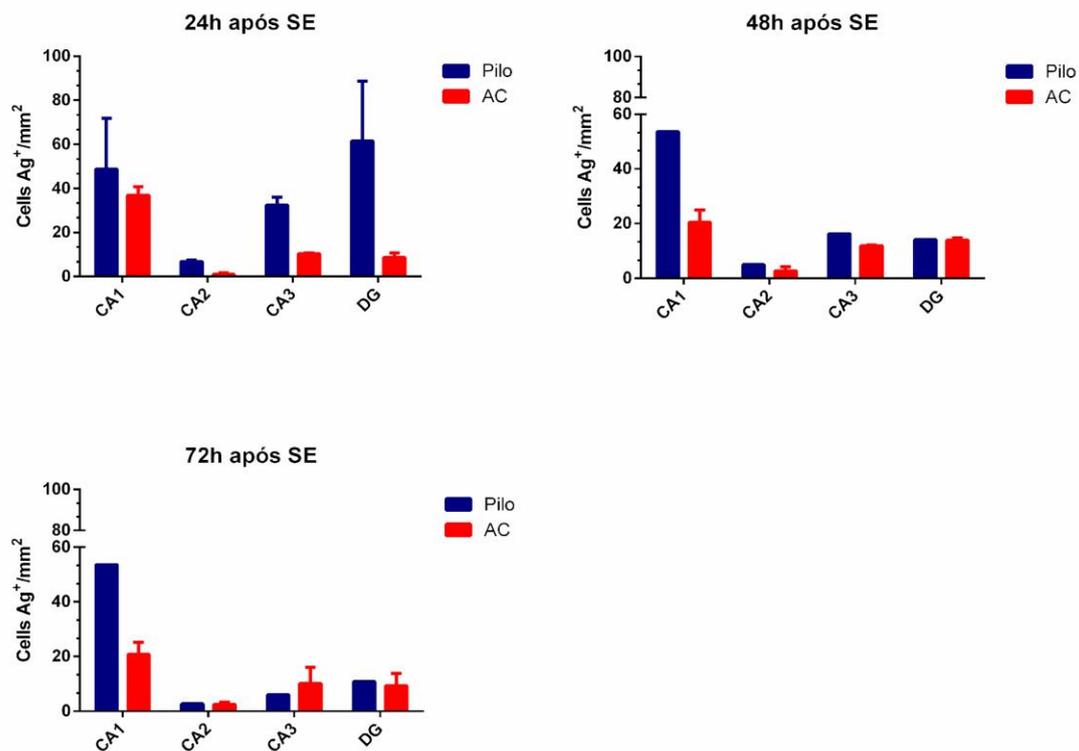


Figura 14. No período de 24 h a densidade de PILO-SE é maior que em AC-SE na região de CA3 enquanto nos períodos de 48 h e 72 h tendem a ser semelhantes, mas não há variação estatística entre os tempos de tratamento ($F [2,4] = 0,6,121$ $p = 0,0607$). Resultados expresso em média \pm SEM, análise *two-way ANOVA*. ($n = \text{PILO-SE} = 6$; $\text{AC-SE} = 7$).

No período de 24 h a região do GD apresenta maior densidade de Ag⁺ em PILO-SE vs AC-AC 24 horas (PILO=61.5 \pm 38.3 vs AC=8.6 \pm 2.8). Em 48 h (PILO14.1 \pm 0 vs AC=13.9 \pm 0.92) e 72 h (PILO=10.8 \pm 0 vs AC=9.2 \pm 6.4), a densidade de células Ag⁺ apresenta-se semelhante (Figuras 16 e 17).

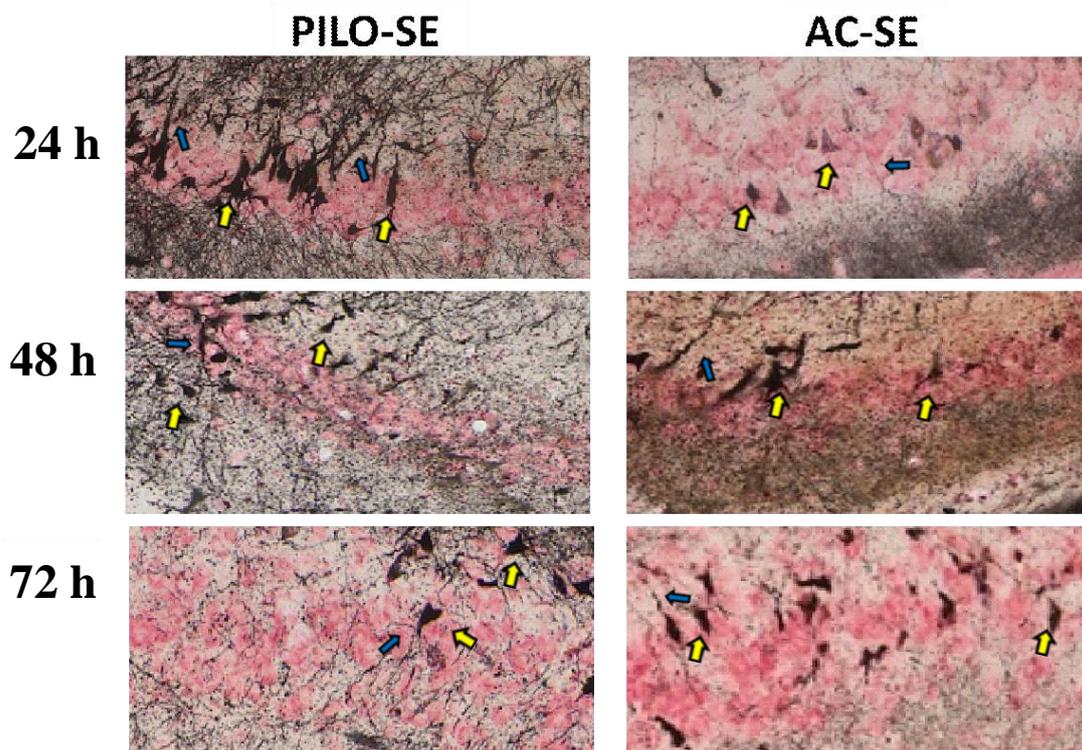


Figura 15. imagens representativas de CA3 dos modelos de PILO-SE e AC-SE nas três janelas temporais 24 h, 48 h e 72 h e em preto a morfologia corpuscular setas amarelas) assim como alguns prolongamentos de seus axônios (setas azuis) dos neurônios degenerados.

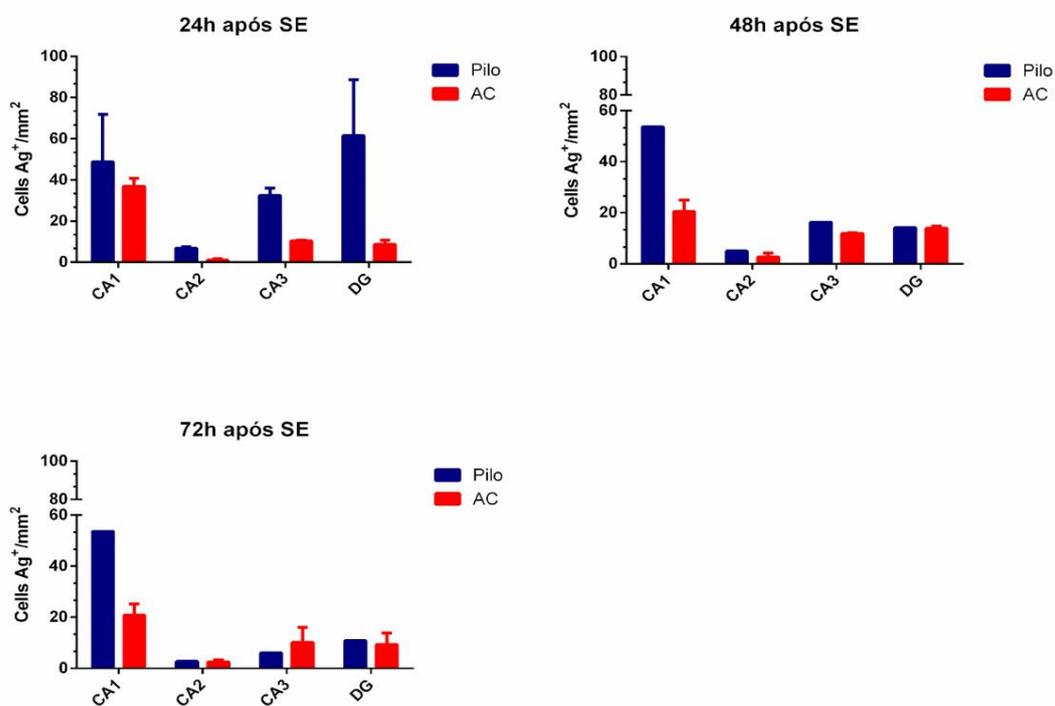


Figura 16. No período de 24 h a densidade de neurônios Ag^+ no PILO-SE é maior que em AC-SE, especificamente na região do GD, enquanto nos períodos de 48 h e 72 h

tendem a ser semelhantes, entretanto não há variação estatística entre os tempos de tratamento ($F [2,4] = 0,1624$ $p = 0,3046$). Resultados expressos em média \pm SEM, análise *two-way ANOVA* ($n = \text{PILO-SE} = 6$; $\text{AC-SE} = 7$).

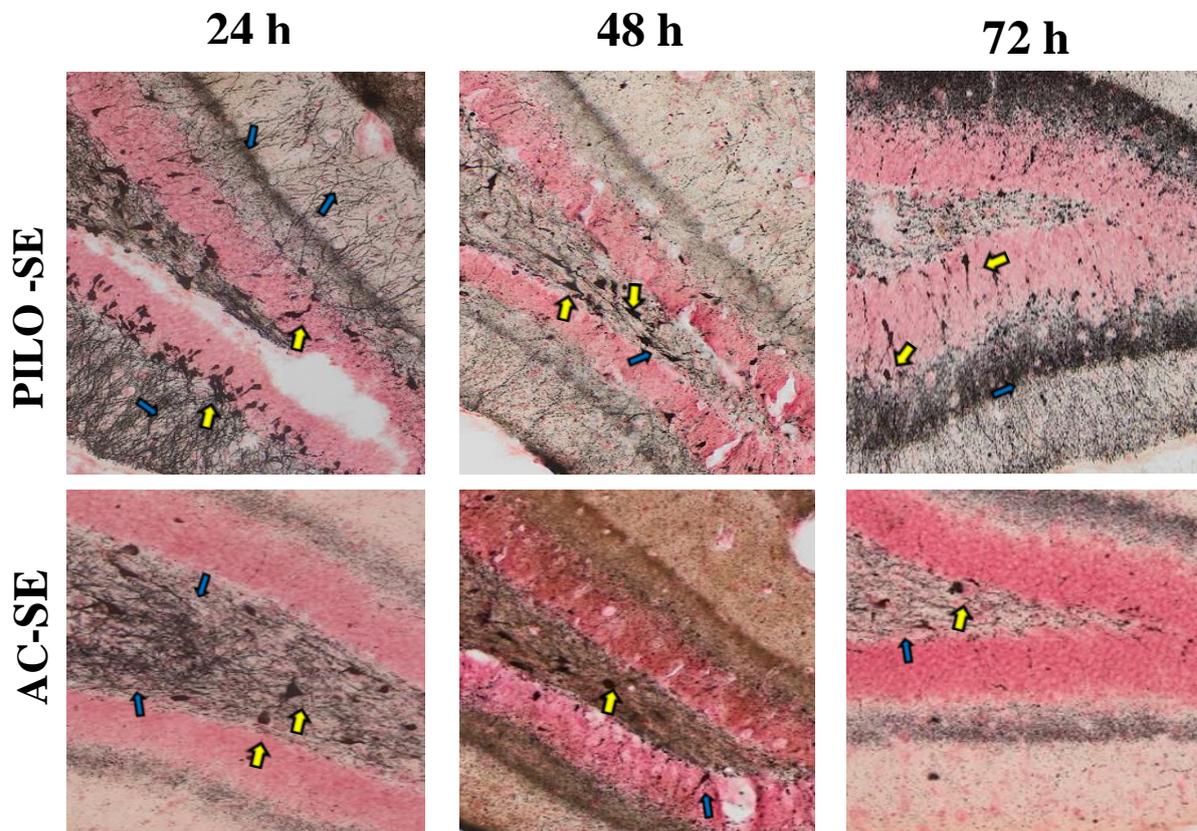


Figura 17. Imagens representativas de GD dos modelos de PILO-SE e AC-SE nas três janelas temporais 24 h, 48 h e 72 h. Notam-se neurônios granulares (setas amarelas) e alguns prolongamentos (setas azuis) de dendritos marcados em sua tonalidade quase preta.

Assim pode-se concluir que a técnica de prata foi eficaz em mostrar a neurodegeneração, neurônios argirofílicos (Ag^+), assim como auxiliou na detecção da morfologia típica neuronal, com marcação conspícua dos somas, processos dendríticos e axonais. Há maior densidade de células Ag^+ em CA1 em PILO-SE versus AC-SE. Por outro lado, as células Ag^+ nas regiões CA2, CA3 e DG às 72 h tendem a ser semelhantes nos dois modelos. Desorganização das camadas celulares, principalmente em CA1 e giro denteado (DG) 24 h após PILO-SE e, em menor extensão, em secções de AC-SE.

Como já supracitado, a técnica utilizada de De Olmos (1994), tem especificidade para neurônios degenerados. Com a especificidade do método nas Figuras 7, 11, 13, 15 e 17 as setas amarelas mostram a marcação pertinente ao **corpo neuronal**, com coloração de um castanho escuro chegando ao quase preto pela concentração de prata (podendo não estar relacionado com a excitotoxicidade, mas ao corte do tecido bem como à sua espessura), com esta marcação de corpo poderia traçar um paralelo com a coloração de HE a qual mostrando os núcleos picnóticos, pela condensação da cromatina (Figura 6) assim a impregnação por prata mostra o corpo e o HE o núcleo. Há a **preservação da morfologia de neuronios piramidal, mantendo seu formato triangular**, bem como nas células granulares do GD e *hilus*, com a citoarquitetura circular. Pode-se notar que a técnica permite uma ótima visualização da arborização dendrítica no hipocampo (setas azuis).

Nas áreas corticais apresentadas na Figura 6, podemos observar a maior marcação em PILO-SE, assim como nos neurônios piramidais do hipocampo, os corpos celulares argirofílicos, assim como a preservação de da citoarquitetura e muito claramente os processos e ramificações dendríticas nas camadas corticais, onde estão presentes os dendritos em formato de *saca-rolha*, devido ao seu formato zigzagueado conferindo-o este formato peculiar (de fato, ilustrativo de neurodegeneração!).

3. Discussão

Numa análise panorâmica dos resultados, certamente parciais constantes neste estudo, podemos concluir que a técnica de prata foi eficaz em mostrar a neurodegeneração, neurônios argirofílicos (Ag^+), assim como permitiu uma descrição muito precisa da morfologia neuronal, com a marcação dos somas, processos dendríticos e axonais. Há maior densidade de células Ag^+ em CA1 no modelo de PILO-SE versus o modelo de AC-SE. Por outro lado, as células Ag^+ nas regiões CA2, CA3 e DG às 72 h tendem a ser semelhantes nos dois modelos. Há uma desorganização das camadas celulares, principalmente em CA1 e giro dentado (DG) 24 h após PILO-SE e, em menor extensão, em secções de AC-SE.

Após análise qualitativa de todo o tecido disponível pode-se observar que os dois modelos induzem neurodegeneração em várias áreas do encéfalo, além daquelas consideradas límbicas, dentre as quais áreas corticais motoras, córtex piriforme, áreas talâmicas e hipotalâmicas. Nossos resultados corroboram achados de Fujikawa (1996)

que mostrou que além das áreas hipocâmpais, áreas talâmicas são afetadas após o PILO-SE assim como a neurodegeneração presente nas áreas CA1, CA3 e GD encontrada por Wang e colaboradores no estudo do AC-SE. Já estudos do nosso grupo, feitos por Castro e colaboradores (2011), com injeções sistêmicas de PILO e comparadas com microinjeções intra-hipocâmpais, observaram neurodegeneração em áreas talâmicas, hipotalâmicas e hipocâmpais, além de áreas corticais, utilizando a técnica de Fluoro-Jade. Embora a morte após 90 minutos de PILO-SE foi praticamente ausente em animais com injeção central, o grau de lesão necrótica (detectada por Fluoro-Jade C) foi ainda significativo.

3.1. AC versus Pilo

Dados mostram que o AC, quando injetado sistemicamente, pode explicar as relações entre a taxa de animais que apresentam SE com a dose administrada e taxas de mortalidade. Um protocolo para diminuir as altas taxas, seria o de aplicar múltiplas doses de até 5 mg/kg (Hellier et al., 1998) por comparação com uma única dose de 15 mg/kg ou mais, com essa modificação de protocolos a taxa de mortalidade e SE passam a ser respectivamente, aproximadamente, 15 e 97% (Leite et al., 2002).

Como consequência da estimulação dos receptores glutamatérgicos, um influxo de Cálcio é gerado nos neurônios (Lipton & Rosenberg, 1994). Já que o AC, como descrito acima, prolonga a ação de tais receptores o influxo de Cálcio é aumentado causando toxicidade neural (Koh, et al.1990) o que leva à morte neuronal por apoptose, particularmente nas áreas CA1 e CA3 assim como no GD, além de levar a respostas inflamatórias e ativação de células da glia, semelhante ao que é descrito nas doenças neurodegenerativas (Wang, et al., 2005). Um estudo feito com diferentes linhagens de camundongos observou outras áreas além do hipocampo como neocórtex dorsal e ventral, córtex piriforme, núcleos talâmicos rostral e ventral, e há diferenças nas linhagens quanto ocorre ou não neurodegeneração e em intensidades diferentes (McLin & Steward, 2006). Um método modificado o método de AC-SE, em que junto com o a injeção de AC administrou-se lorazepam, um benzodiazepínico, fez com que o animal não apresentasse crises, porém não afetou a neurodegeneração e posterior ao período latente as CRS. (Kienzler-Norwood et al., 2017)

A injeção intraperitoneal de PILO, na dose que pode provocar SE em uma aplicação, possui algumas implicações como a taxa de mortalidade no momento da

aplicação que é de cerca de 30-40% (Turski, et al. 1983b), em doses de 200 mg/kg induz crises motoras límbicas de alta gravidade, enquanto 400 mg/kg, dose próxima à utilizada para a indução de PILO-SE, apresenta neurodegeneração intensa em regiões cerebrais susceptíveis 24 h a 72 h (Turski et al., 1983 a) porém em outras pesquisas onde a duração do SE é de 120 minutos, as taxas de mortalidade superaram 40% (Leite, et al., 1990; Fujikawa, et al., 1999, Goffin, et al., 2007). Uma solução possível para diminuir a mortalidade, seria a divisão da dose em duas etapas como proposto por Glien et al., (2001).

Estudos com múltiplas aplicações de PILO feitos pelo grupo de Rashid e colaboradores (2021), para o estudo de um novo composto alcaloide natural antioxidante, o *Zingero*, isolado do gengibre, mostra que a PILO-SE resulta em aumento de espécies reativas de oxigênio, formação periférica de peroxidação lipídica e na diminuição de antioxidantes como o óxido nítrico, catalase e glutatona catalase, além de alterações histológicas. Mostra que o modelo de PILO produz toda uma cascata e vias neuroinflamatórias resultando em neurodegeneração severa (Rashid et al, 2021).

Conclusões e Perspectivas

Os modelos PILO-SE e AC-SE, são essenciais para o estudo de novas DAE's e em cada fase do processo desde o SE, passando pelo período latente e chegando às CRE (Leite, et al., 2002). Com as dificuldades, éticas, técnicas e burocráticas com os que a pesquisa clínica esbarra, as investigações com modelos animais e culturas celulares, garantindo os cuidados éticos de experimentação, são meios de entender a fisiopatologia do SE e ELT. Entretanto não há um modelo que apresente todas as características observadas em humanos (Seinfeld et al.,2016). Outros fatores também são fundamentais, tais tais como custo, tempo e esforço para criar e manusear esses modelos, ambiente e materiais disponíveis e para o estudo das epilepsias a susceptibilidade às crises (Ahmed et al., 2020).

Pela definição atual, SE em humanos tem dois tempos chaves, sendo o tempo 1 o período em que o tratamento deve ser iniciado, sendo este de 5 minutos para a crise inicial de SE, pois provavelmente será duradoura. O tempo 2 refere-se às consequências de longo prazo que podem ocorrer, este tempo é de 30 minutos (Trinka et al., 2015). O tratamento para SE, sempre que possível, deve ser iniciado o quanto antes (Seinfeld et al.,2016), pois como vemos pelos dados preliminares e literatura aqui expostos, os modelos animais apresentam uma alta mortalidade e SE prolongado induz lesões cerebrais extensas.

Entretanto, apesar de serem bons modelos para estudar mecanismos e biomarcadores de epileptogênese ou DAE (Grone & Baraban, 2015) deve ser levado em consideração que os modelos aqui apresentados possuem vias de ativação diferentes como já descrito na seção 1.5. Além do mais, podemos notar que há uma diferença no padrão de degeneração e como Castro e colaboradores (2011) e Fujikawa (1996) mostram uma extensa lesão por todo o encéfalo para o SE-PILO. Ambos os modelos têm limitações quanto às manifestações, sejam comportamentais, na mortalidade (Morimoto, et al., 2004) ou padrão de neurodegeneração e em específico deste último citado, não são aos mesmo observados em pacientes com ELT (Naegele, 2007) os modelos de SE podem acabar não sendo os ideais para a descobertas de tratamentos inovadores (Grone & Baraban, 2015).

Os modelos de PILO-SE e AC-SE, apresentam desvantagens ao tentarem simular as condições de ELT humana. No modelo de PILO, uma dose elevada é necessária para desenvolver SE, entretanto, causa elevada mortalidade dos animais, além de extensa neurodegeneração em todo o cérebro, assim as modificações são necessárias, como o pré-tratamento para aumentar a sobrevida em ratos quando induzir o SE (Nirwan et al., 2017), uma alternativa proposta é a aplicação de cloridrato de lítio 18 horas antes da aplicação de PILO (Fan et al., 2020). O pré-tratamento com Lítio aumenta a sensibilidade a PILO o que leva ao uso de uma menor concentração, reduz o tempo para início do SE, porém, gera os mesmos efeitos do modelo tradicional (Ahmed et al., 2020). Contudo, mesmo as alterações com Lítio, alguns empecilhos permanecem como a morte de vários animais e a ineficácia das DAE em interromper as crises (Ahmed et al., 2020).

Enquanto ao modelo de AC, também mostra extensa perda neuronal extra-hipocampal como no córtex entorrinal, bulbo olfatório, substância nigra, tálamo entre outras (Kienzler-Norwood et al., 2017). SE-AC apresenta alterações na sensibilidade ao modificar a linhagem, idade, sexo e peso dos animais (Hattiany et al., 2011; Nirwan et al., 2017). Na revisão de Lévesque & Avoli (2013) os autores concluem que o modelo de AC, é isomórfico com a epilepsia humana, porém, se irá se assemelhar a ELT ou a SE depende do local da aplicação do AC. Enquanto a injeção intracerebroventricular assemelha-se a ELT pelas suas características focais, a injeção sistêmica se assemelha mais a SE (Lévesque, & Avoli, 2013).

A influência do ciclo circadiano nos padrões de epilepsia humana é uma chave importante e interessante para estudos de novos fármacos ou cronofármacos que atinjam diretamente o início do SE ao invés de conter as CRE (Mizuno et al., 2021) assim, podem

surgir tratamentos individualizados (Loddenkemper et al., 2011). Em humanos foi mostrado que as crises nas ELT frequentemente ocorrem no período de vigília e na fase de sono intermediário, enquanto a epilepsia do lobo frontal apresenta crises durante o sono (Mizuno et al., 2021). Assim, grupos como da Mizuno e colaboradores (2021), estudam os efeitos do AC-SE por meio de Vídeo-EEG de longa duração sobre o ciclo circadiano e acreditam que seus resultados sejam promissores para estudos de cronofármacos que atuem no início do SE. Com o intuito de estudar a influência do ciclo circadiano, Pitsch e colaboradores observam a indução de PILO-SE em camundongos sobre o ciclo circadiano, porém o grupo também observou que a implantação de eletrodos de registro nos camundongos alterou temporariamente o ciclo circadiano. Ambos os resultados de AC-SE e PILO-SE e a influência do ciclo circadiano podem ser uma nova porta para estudo de novos tratamentos.

Considerações Finais

Por todo o exposto, os dois modelos químicos aqui apresentados induzem *SE*, por mecanismos diferentes, porém ambos tendem a resultados semelhantes de neurodegeneração hipocampal e extra-lobo temporal. Uma segunda análise relevante a todo o contexto apresentado é a diferença causada pelos dois compostos para indução de *SE* quanto aos danos neuronais, seja pela neurodegeneração, apresentada, pelos processos exacerbados de inflamação ou pelo aumento de glia. Estudos futuros que complementem o presente, deverão verificar extensamente lesões em outras áreas, além das hipocampais aqui relatadas. Em terceiro lugar, as classificações das epilepsias em humanos, como apresentado na primeira metade desta Dissertação, precisam do consenso entre especialistas, com respeito a uma série de critérios para poder chegar ao diagnóstico correto. Certamente critérios semelhantes devem ser levados em consideração para que a escolha dos modelos de estudo para epilepsia seja validada. Ir mais a fundo nas avaliações dos modelos que temos hoje, é fundamental para que novos modelos e potenciais novos DAEs sejam produzidas e tenhamos uma melhor compreensão melhor da fisiopatologia das epelepsias, sobretudo a ELT (Nirwan el al., 2017). Áreas básicas de pesquisa e a clínica devem e precisam conversar e andarem juntas.

Referências

- Ahmed Juvale, Iman Imtiyaz; Che Has, Ahmad Tarmizi (2020). The evolution of the pilocarpine animal model of status epilepticus. *Heliyon*, 6(7), e04557–. doi:10.1016/j.heliyon.2020.e04557
- Akman O, Demiralp T, Ates N, Onat FY. Electroencephalographic differences between WAG/Rij and GAERS rat models of absence epilepsy. *Epilepsy Res.* 2010;89(2-3):185-193. doi:10.1016/j.eplepsyres.2009.12.005
- Ben-Ari, Y. (1985). Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: Mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience*, 14(2), 375–403. doi:10.1016/0306-4522(85)90299-4
- Ben-Ari Y, Cossart R. Kainate, a double agent that generates seizures: two decades of progress. *Trends Neurosci.* 2000;23(11):580-587. doi:10.1016/s0166-2236(00)01659-3
- Bender RA, Baram TZ. (2007). Epileptogenesis in the developing brain: what can we learn from animal models? *Epilepsia*. 48 Suppl 5:2-6.
- Bettler B, Mulle C (1995) Review: neurotransmitter receptors. II. AMPA and kainate receptors. *Neuropharmacology* 34:123–139
- Borenfreund, E., Puerner, J.A., 1984. A simple quantitative procedure using monolayer culture for toxicity assays. *J. Tissue Cult. Meth.* 9, 7–9.
- BRASIL. PROTOCOLO CLÍNICO E DIRETRIZES TERAPÊUTICAS EPILEPSIA. PORTARIA CONJUNTA Nº 17, DE 21 DE JUNHO DE 2018
- Brigo, F., Trinka, E., Lattanzi, S., Bragazzi, N. L., Nardone, R., & Martini, M. (2018). A brief history of typical absence seizures — Petit mal revisited. *Epilepsy & Behavior*, 80, 346–353. doi:10.1016/j.yebeh.2018.01.007
- Bronen RA, Fulbright RK, Spencer DD, et al. Refractory epilepsy: comparison of MR imaging, CT, and histopathologic findings in 117 patients. *Radiology.* 1996;201(1):97-105. doi:10.1148/radiology.201.1.8816528
- Browning, R. A., and D. K. Nelson. "Variation in threshold and pattern of electroshock-induced seizures in rats depending on site of stimulation." *Life sciences* 37.23 (1985): 2205-2211.
- Castillo, C. G., Mendoza, S., Freed, W. J., & Giordano, M. (2006). Intranigral transplants of immortalized GABAergic cells decrease the expression of kainic acid-induced seizures in the rat. *Behavioural Brain Research*, 171(1), 109–115. doi:10.1016/j.bbr.2006.03.025
- Cavazos JE, Jones SM, Cross DJ. (2004). Sprouting and synaptic reorganization in the subiculum and CA1 region of the hippocampus in acute and chronic models of partial-onset epilepsy. *Neuroscience* 126, 677–88
- Cavalheiro, E.A., Naffah-Mazacoratti, M.G., Mello, L.E., Leite, J.P., 2006. The pilocarpine model of seizures. In: Pitkänen, A., Schwartzkroin, P.A., Moshé, S.L. (Eds.), *Models of Seizures and Epilepsy*. Elsevier, Amsterdam, pp. 433—448.
- Chauvière L. Potential causes of cognitive alterations in temporal lobe epilepsy. *Behav Brain Res.* 2020;378:112310. doi:10.1016/j.bbr.2019.112310

- Cendes F. Neuroimaging in investigation of patients with epilepsy. *Continuum (Minneapolis)*. 2013;19(3 Epilepsy):623-642. doi:10.1212/01.CON.0000431379.29065.d3
- Chesher, G.B., Jackson, D.M., 1974. Anticonvulsant effects of cannabinoids in mice: drug interactions within cannabinoids and cannabinoid interactions with phenytoin. *Psychopharmacologia* 37, 255–264. <https://doi.org/10.1007/BF00421539>.
- Cunha, A. O. S., Moradi, M., de Deus, J. L., Ceballos, C. C., Benites, N. M., de Barcellos Filho, P. C. G., ... Maurício Leão, R. (2019). Alterations in brainstem auditory processing, the acoustic startle response and sensorimotor gating of startle in Wistar Audiogenic Rats (WAR), an animal model of reflex epilepsies. *Brain Research*, 146570. doi:10.1016/j.brainres.2019.146570
- De Deyn PP, D'Hooge R, Marescau B, Pei YQ. Chemical models of epilepsy with some reference to their applicability in the development of anticonvulsants. *Epilepsy Res.* 1992;12(2):87-110. doi:10.1016/0920-1211(92)90030-w
- DENG, Wei; AIMONE, James B.; GAGE, Fred H. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory?. *Nature reviews neuroscience*, v. 11, n. 5, p. 339-350, 2010.
- Depaulis A, Hamelin S. Animal models for mesiotemporal lobe epilepsy: The end of a misunderstanding?. *Rev Neurol (Paris)*. 2015;171(3):217-226. doi:10.1016/j.neurol.2015.01.558
- Doretto, M. C., et al. "Quantitative study of the response to genetic selection of the Wistar audiogenic rat strain (WAR)." *Behavior genetics* 33.1 (2003): 33-42.
- DUDEK, F. E., CLARK, S., WILLIAMS, P. A., & GRABENSTATTER, H. L. (2006). Kainate-Induced Status Epilepticus: A Chronic Model of Acquired Epilepsy. *Models of Seizures and Epilepsy*, 415–432. doi:10.1016/b978-012088554-1/50036-0
- Eadie, M. (2018). Familial temporal lobe epilepsy in the 19th century. *Seizure*, 54, 7–10. doi:10.1016/j.seizure.2017.11.010
- Epilepsy: a public health imperative. Geneva: World Health Organization; 2019. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Falco-Walter JJ, Scheffer IE, Fisher RS. The new definition and classification of seizures and epilepsy. *Epilepsy Res.* 2018 Jan;139:73-79. doi: 10.1016/j.epilepsyres.2017.11.015. Epub 2017 Nov 28. PMID: 29197668.
- Fan, J., Shan, W., Yang, H., Zhu, F., Liu, X., & Wang, Q. (2020). Neural activities in multiple rat brain regions in lithium-pilocarpine-induced status epilepticus model. *Frontiers in molecular neuroscience*, 12, 323.
- FISHER, Robert S. et al. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*, v. 46, n. 4, p. 470-472, 2005.
- Fisher RS, Cross JH, French JA, Higurashi N, Hirsch E, Jansen FE, et al. Operational classification of seizure types by the international league against epilepsy: position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia* 2017;58:522–30.
- Furtado MA, Castro OW, Del Vecchio F, de Oliveira JA, Garcia-Cairasco N. Study of spontaneous recurrent seizures and morphological alterations after status epilepticus

induced by intrahippocampal injection of pilocarpine. *Epilepsy Behav.* 2011;20(2):257-266. doi:10.1016/j.yebeh.2010.11.024

Frankel WN, Taylor L, Beyer B, Tempel BL, White HS. Electroconvulsive thresholds of inbred mouse strains. *Genomics.* 2001;74(3):306-312. doi:10.1006/geno.2001.6564

Felix R. Insights from mouse models of absence epilepsy into Ca²⁺ channel physiology and disease etiology. *Cell Mol Neurobiol.* 2002;22(2):103-120. doi:10.1023/a:1019807719343

Fujikawa DG, Shinmei SS, Cai B. Lithium-pilocarpine-induced status epilepticus produces necrotic neurons with internucleosomal DNA fragmentation in adult rats. *Eur J Neurosci.* 1999;11(5):1605-1614. doi:10.1046/j.1460-9568.1999.00573.x

Fotakis, G., & Timbrell, J. A. (2006). In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*, 160(2), 171–177. doi:10.1016/j.toxlet.2005.07.001

Garcia-Cairasco N, Umeoka EHL, Cortes de Oliveira JA. The Wistar Audiogenic Rat (WAR) strain and its contributions to epileptology and related comorbidities: History and perspectives. *Epilepsy Behav.* 2017 Jun;71(Pt B):250-273. doi:10.1016/j.yebeh.2017.04.001. Epub 2017 May 11. PMID: 28506440.

García-Morales I, de la Peña Mayor P, Kanner AM. Psychiatric comorbidities in epilepsy: identification and treatment. *Neurologist.* 2008;14(6 Suppl 1):S15-S25. doi:10.1097/01.nrl.0000340788.07672.51

Gastaut H., W.F. Caveness, W. Landolt, A.M. Lorentz de Haas, F.L. McNaughton, O.Magnus, O., Merlis, J.K., Pond, D.A., Radermecker, J., Storm van Leeuwen, W., 1964.A proposed international classification of epileptic seizures. *Epilepsia* 5, 297–306.

GATAUT, H. Clinical and electroencephalographical classification of epileptic seizure. *Epilepsia*, v. 11, p. 1102-113, 1970.

Gataullina, S., Dulac, O., & Bulteau, C. (2015). Temporal lobe epilepsy in infants and children. *Revue Neurologique*, 171(3), 252–258. doi:10.1016/j.neurol.2015.01.559

Glien M, Brandt C, Potschka H, Voigt H, Ebert U, Löscher W. Repeated low-dose treatment of rats with pilocarpine: low mortality but high proportion of rats developing epilepsy. *Epilepsy Res.* 2001;46(2):111-119. doi:10.1016/s0920-1211(01)00272-8

Goddard GV, McIntyre DC, Leech CK. A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. *Exp Neurol.* 1969;25(3):295-330. doi:10.1016/0014-4886(69)90128-9

Goffin, K., Nissinen, J., Van Laere, K., & Pitkänen, A. (2007). Cyclicity of spontaneous recurrent seizures in pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in rat. *Experimental Neurology*, 205(2), 501–505. doi:10.1016/j.expneurol.2007.03.008

GOLDBERG, Ethan M.; COULTER, Douglas A. Mechanisms of epileptogenesis: a convergence on neural circuit dysfunction. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 14, n. 5, p. 337-349, 2013.

Grone, Brian P; Baraban, Scott C (2015). Animal models in epilepsy research: legacies and new directions. *Nature Neuroscience*, 18(3), 339–343. doi:10.1038/nn.3934

GUERREIRO, Carlos AM. Epilepsy: Is there hope?. The Indian journal of medical research, v. 144, n. 5, p. 657, 2016.

Haruhiko Shinozaki; Shiro Konishi (1970). Actions of several anthelmintics and insecticides on rat cortical neurones. , 24(2), 368–371. doi:10.1016/0006-8993(70)90122-8

Hamilton SE, Loose MD, Qi M, et al. Disruption of the m1 receptor gene ablates muscarinic receptor-dependent M current regulation and seizure activity in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(24):13311-13316. doi:10.1073/pnas.94.24.13311

Hattiangady, B., Kuruba, R., and Shetty, A.K. (2011). Acute seizures in old age leads to a greater loss of CA1 pyramidal neurons, an increased propensity for developing chronic TLE and a severe cognitive dysfunction. *Aging Dis.* 2, 1–17.

He XP, Wen R, McNamara JO. Impairment of kindling development in phospholipase C γ 1 heterozygous mice. *Epilepsia*. 2014;55(3):456-463. doi:10.1111/epi.12536

Hellier, J.L., Patrylo, P.R., Buckmaster, P.S., Dudek, F.E., 1998. Recurrent spontaneous motor seizures after repeated low-dose systemic treatment with kainate: assessment of a rat model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 31, 73/84.

Holmes, Gregory L. Types of Epilepsy Syndromes. Epilepsy Foundation end Epilepsy Together, 2013. Disponível em: <https://www.epilepsy.com/learn/types-epilepsy-syndromes#:~:text=An%20epilepsy%20syndrome%20is%20defined,genetic%20information%2C%20and%20much%20more>.

Holmstedt B, Wassén SH, Schultes RE. Jaborandi: an interdisciplinary appraisal. *J Ethnopharmacol.* 1979;1(1):3-21. doi:10.1016/0378-8741(79)90014-x

Hermann B, Conant LL, Cook CJ, et al. Network, clinical and sociodemographic features of cognitive phenotypes in temporal lobe epilepsy [published online ahead of print, 2020 Jul 10]. *Neuroimage Clin.* 2020;27:102341. doi:10.1016/j.nicl.2020.102341

Hesdorffer DC, Logroscino G, Cascino G, Annegers JF, Hauser WA. (1998) Risk of unprovoked seizure after acute symptomatic seizure: effect of status epilepticus. *Annals of Neurology* 44:908–912.

Ho SS, Kuzniecky RI, Gilliam F, Faught E, Bebin M, Morawetz R. Congenital porencephaly: MR features and relationship to hippocampal sclerosis. *AJNR Am J Neuroradiol.* 1998;19(1):135-141.

Holmes GL. The long-term effects of neonatal seizures. *Clin Perinatol.* 2009;36(4):901-viii. doi:10.1016/j.clp.2009.07.012

International League Against Epilepsy. epilepsydiagnosis.org. Acessado em 20 de Julho de 2020.

ILAE - COMMISSION ON CLASSIFICATION AND TERMINOLOGY OF THE INTERNATIONAL LEAGUE AGAINST EPILEPSY. Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. **Epilepsia**, v. 22, n. 4, p. 489-501, 1981.

Janice R. Naegele (2007). Neuroprotective Strategies to Avert Seizure-Induced Neurodegeneration in Epilepsy. , 48(Supplement s2), 107–117. doi:10.1111/j.1528-1167.2007.01071.x

K Ishida; H Shimizu; H Hida; S Urakawa; K Ida; H Nishino (2004). Argrophilic dark neurons represent various states of neuronal damage in brain insults: some come to die and others survive. , 125(3), 0–644. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.02.002

KANDEL E. R, SCHWARTZ J. H, JESSELL T. M. Principles of Neural Science.
New York: McGraw-Hill, 2000, capitulo 17.

Kandratavicius L, Balista PA, Lopes-Aguiar C, et al. Animal models of epilepsy: use and limitations. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2014;10:1693-1705. Published 2014 Sep 9. doi:10.2147/NDT.S50371

Kanner, A. (2008). Common Errors Made in the Diagnosis and Treatment of Epilepsy. *Seminars in Neurology*, 28(03), 364–378. doi:10.1055/s-2008-1079341

Kanner AM, Schachter SC, Barry JJ, et al. Depression and epilepsy: epidemiologic and neurobiologic perspectives that may explain their high comorbid occurrence [published correction appears in *Epilepsy Behav*. 2014 Mar;32:170. Hersdorffer, Dale C [corrected to Hesdorffer, Dale C]; LaFrance, W Curt Jr [added]]. *Epilepsy Behav*. 2012;24(2):156-168. doi:10.1016/j.yebeh.2012.01.007

Karunakaran S, Rollo MJ, Kim K, et al. The interictal mesial temporal lobe epilepsy network. *Epilepsia*. 2018;59(1):244-258. doi:10.1111/epi.13959

Kienzler-Norwood, F., Costard, L., Sadangi, C., Müller, P., Neubert, V., Bauer, S., Rosenow, F., and Norwood, B.A. (2017). A novel animal model of acquired human temporal lobe epilepsy based on the simultaneous administration of kainic acid and lorazepam. *Epilepsia* 58, 222–230.

Koh JY, Goldberg MP, Hartley DM, Choi DW (1990) Non-NMDA receptor-mediated neurotoxicity in cortical culture. *J Neurosci* 10:693–705.

Kwan, P., Sills, G. J., & Brodie, M. J. (2001). The mechanisms of action of commonly used antiepileptic drugs. *Pharmacology & Therapeutics*, 90(1), 21–34. doi:10.1016/s0163-7258(01)00122-x

Kwan, P., & Brodie, M. J. (2010). Definition of refractory epilepsy: defining the indefinable? *The Lancet Neurology*, 9(1), 27–29. doi:10.1016/s1474-4422(09)70304-7

Kuo, F. S., Cleary, C. M., LoTurco, J. J., Chen, X., & Mulkey, D. K. (2019). Disordered breathing in a mouse model of Dravet syndrome. *eLife*, 8, e43387. <https://doi.org/10.7554/eLife.43387>

LaRoche, S. M., & Helmers, S. L. (2004). The new antiepileptic drugs: scientific review. *JAMA*, 291(5), 605–614. <https://doi.org/10.1001/jama.291.5.605>

Lazarini-Lopes, W., Do Val-da Silva, R. A., da Silva-Júnior, R. M. P., Leite, J. P., & Garcia-Cairasco, N. (2020). The anticonvulsant effects of cannabidiol in experimental models of epileptic seizures: from behavior and mechanisms to clinical insights. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. doi:10.1016/j.neubiorev.2020.01.014

Lee, M., Choi, B. Y., & Suh, S. W. (2017). Unexpected Effects of Acetylcholine Precursors on Pilocarpine Seizure- Induced Neuronal Death. *Current Neuropharmacology*, 16(1). doi:10.2174/1570159x15666170518150053

- Leite JP, Bortolotto ZA, Cavalheiro EA. Spontaneous recurrent seizures in rats: an experimental model of partial epilepsy. *Neurosci Biobehav Rev.* 1990;14(4):511-517. doi:10.1016/s0149-7634(05)80076-4
- Leite JP, Garcia-Cairasco N, Cavalheiro EA. New insights from the use of pilocarpine and kainate models. *Epilepsy Res.* 2002;50(1-2):93-103. doi:10.1016/s0920-1211(02)00072-4
- Lévesque, M., & Avoli, M. (2013). The kainic acid model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 37(10), 2887–2899. doi:10.1016/j.neubiorev.2013.10.011
- Li BY, Chen SD. Potential Similarities in Temporal Lobe Epilepsy and Alzheimer's Disease: From Clinic to Pathology. *Am J Alzheimers Dis Other Demen.* 2015;30(8):723-728. doi:10.1177/1533317514537547
- Liga Brasileira de Epilepsia, SBE. Site: <https://epilepsia.org.br/> acessado em 15/10/2020.
- Liga Brasileira de Epilepsia, SBE. Profissionais e centros especializados. <https://epilepsia.org.br/profissionais-e-centros-especializados/> acessado em 15/10/2020.
- Lipton SA, Rosenberg PA. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med.* 1994;330(9):613-622. doi:10.1056/NEJM199403033300907
- Loddenkemper T, Lockley SW, Kaleyias J, Kothare SV. Chronobiology of epilepsy: diagnostic and therapeutic implications of chrono-epileptology. *J Clin Neurophysiol.* 2011 Apr;28(2):146-53. doi: 10.1097/WNP.0b013e31821213d4. PMID: 21399517.
- Löscher, Wolfgang, and Dieter Schmidt. "Which animal models should be used in the search for new antiepileptic drugs? A proposal based on experimental and clinical considerations." *Epilepsy research* 2.3 (1988): 145-181.
- Löscher, W. (1998). New visions in the pharmacology of anticonvulsion. *European Journal of Pharmacology*, 342(1), 1–13. doi:10.1016/s0014-2999(97)01514-8
- Loscher, W., & Brandt, C. (2010). Prevention or Modification of Epileptogenesis after Brain Insults: Experimental Approaches and Translational Research. *Pharmacological Reviews*, 62(4), 668–700. doi:10.1124/pr.110.003046
- Lothman E, Collins R. (1981). Kainic Acid induced limbic seizures: metabolic, behavioral, electroencephalographic and neuropathological correlates. *Brain Res* 218: 299-318.
- Macdonald, R L, and K M Kelly. "Antiepileptic drug mechanisms of action." *Epilepsia* vol. 36 Suppl 2 (1995): S2-12. doi:10.1111/j.1528-1157.1995.tb05996.x
- McIntyre, D. C., Poulter, M. O., & Gilby, K. (2002). *Kindling: some old and some new.* *Epilepsy Research*, 50(1-2), 79–92. doi:10.1016/s0920-1211(02)00071-2
- McLin, J. P., & Steward, O. (2006). Comparison of seizure phenotype and neurodegeneration induced by systemic kainic acid in inbred, outbred, and hybrid mouse strains. *European Journal of Neuroscience*, 24(8), 2191–2202. doi:10.1111/j.1460-9568.2006.05111.x

- Maganti RK, Rutecki P. EEG and epilepsy monitoring. *Continuum (Minneapolis)*. 2013;19(3 Epilepsy):598-622. doi:10.1212/01.CON.0000431378.51935.d8
- Marescaux C, Vergnes M, Kiesmann M, Depaulis A, Micheletti G, Warter JM. Kindling of audiogenic seizures in Wistar rats: an EEG study. *Exp Neurol*. 1987;97(1):160-168. doi:10.1016/0014-4886(87)90290-1
- Marino R Jr, Cukiert A, Pinho E. [Epidemiological aspects of epilepsy in São Paulo: a prevalence study]. *Arq Neuro-Psiquiatr*. 1986; 44: 243-54.
- Michelucci, R., & Nobile, C. (1993). Autosomal Dominant Epilepsy with Auditory Features. In M. P. Adam (Eds.) et. al., *GeneReviews®*. University of Washington, Seattle.
- Mizuno, S., Koneval, Z., Zierath, D. K., Knox, K. M., White, H. S., & Barker-Haliski, M. Diurnal Burden of Spontaneous Seizures in Early Epileptogenesis in the Post-Kainic Acid Rat Model of Epilepsy. *Epilepsia Open*.
- Moran, N. F., Fish, D. R., Kitchen, N., Shorvon, S., Kendall, B. E., & Stevens, J. M. (1999). Supratentorial cavernous haemangiomas and epilepsy: a review of the literature and case series. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 66(5), 561–568. doi:10.1136/jnnp.66.5.561
- Kiyoshi Morimoto; Margaret Fahnestock; Ronald J Racine (2004). Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. , 73(1), 0–60. doi:10.1016/j.pneurobio.2004.03.009
- Mortari, M. R., Cunha, A. O. S., Ferreira, L. B., & dos Santos, W. F. (2007). Neurotoxins from invertebrates as anticonvulsants: From basic research to therapeutic application. *Pharmacology & Therapeutics*, 114(2), 171–183. doi:10.1016/j.pharmthera.2007.01.009
- Nadler, J.V., Perry, B.W., and Cotman, C.W. 1978. Intraventricular kainic acid preferentially destroys hippocampal pyramidal cells. *Nature* 271: 676–677.
- Nadler, J.V., Perry, B.W., and Cotman, C.W. 1980. Selective reinnervation of hippocampal area CA1 and the fascia dentata after destruction of CA3-CA4 afferents with kainic acid. *Brain Res* 182: 1–9
- Nirwan N, Vyas P, Vohora D. Animal models of status epilepticus and temporal lobe epilepsy: a narrative review. *Rev Neurosci* 2018;29:757–70. doi:10.1515/revneuro-2017-0086.
- Noronha AL, Borges MA, Marques LH et al. Prevalence and pattern of epilepsy treatment in different socioeconomic classes in Brazil. *Epilepsia* 2007; 48: 880-5.
- Prayson, R. A., Fong, J., & Najm, I. (2010). Coexistent pathology in chronic epilepsy patients with neoplasms. *Modern Pathology*, 23(8), 1097–1103. doi:10.1038/modpathol.2010.94
- Pack, A. M. (2019). Epilepsy Overview and Revised Classification of Seizures and Epilepsies. *CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology*, 25(2), 306–321. doi:10.1212/con.0000000000000707
- Pearl, P. L. (2018). Epilepsy Syndromes in Childhood. *CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology*, 24, 186–209. doi:10.1212/con.0000000000000568

- Perucca, E., & Tomson, T. (2011). The pharmacological treatment of epilepsy in adults. *The Lancet Neurology*, 10(5), 446–456. doi:10.1016/s1474-4422(11)70047-3
- Perucca, P., Crompton, D. E., Bellows, S. T., McIntosh, A. M., Kalincik, T., Newton, M. R., ... Berkovic, S. F. (2017). Familial mesial temporal lobe epilepsy and the borderland of déjà vu. *Annals of Neurology*, 82(2), 166–176. doi:10.1002/ana.24984
- Pitsch, J., Becker, A. J., Schoch, S., Müller, J. A., de Curtis, M., & Gnatkovsky, V. (2017). Circadian clustering of spontaneous epileptic seizures emerges after pilocarpine-induced status epilepticus. *Epilepsia*, 58(7), 1159-1171.
- Pinel JP, Rovner LI. Experimental epileptogenesis: kindling-induced epilepsy in rats. *Exp Neurol* 1978;15(Suppl 58:2):S190-S202.
- PITKÄNEN, Asla et al. Epileptogenesis in experimental models. *Epilepsia*, v. 48, p. 13-20, 2007.
- Pitkänen, A., & Lukasiuk, K. (2011). Mechanisms of epileptogenesis and potential treatment targets. *The Lancet Neurology*, 10(2), 173–186. doi:10.1016/s1474-4422(10)70310-0
- PITKÄNEN, Asla et al. Epileptogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, v. 5, n. 10, p. a022822, 2015.
- Pitkänen, A., Buckmaster, P., Galanopoulou, A. S., & Moshé, S. L. (Eds.). (2017). *Models of seizures and epilepsy*. Academic Press.
- POLETAEVA, I. I. et al. The Krushinsky-Molodkina rat strain: The study of audiogenic epilepsy for 65 years. *Epilepsy & Behavior*, v. 71, p. 130-141, 2017.
- Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia* 1989;30(4):389–399.
- Olney JW, Rhee V, Ho OL. Kainic acid: a powerful neurotoxic analogue of glutamate. *Brain Res*. 1974;77(3):507-512. doi:10.1016/0006-8993(74)90640-4
- Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1972;32(3):281-294. doi:10.1016/0013-4694(72)90177-0
- Rakhade SN, Jensen FE. Epileptogenesis in the immature brain: emerging mechanisms. *Nat Rev Neurol*. 2009;5(7):380-391. doi:10.1038/nrneuro.2009.80
- RASHID, Summya et al. Zingerone Targets Status Epilepticus by Blocking Hippocampal Neurodegeneration via Regulation of Redox Imbalance, Inflammation and Apoptosis. *Pharmaceuticals*, v. 14, n. 2, p. 146, 2021.
- Rattka, M., Brandt, C., & Löscher, W. (2013). The intrahippocampal kainate model of temporal lobe epilepsy revisited: Epileptogenesis, behavioral and cognitive alterations,

pharmacological response, and hippocampal damage in epileptic rats. *Epilepsy Research*, 103(2-3), 135–152. doi:10.1016/j.eplepsyres.2012.09.015

Ross KC, Coleman JR. Developmental and genetic audiogenic seizure models: behavior and biological substrates. *Neurosci Biobehav Rev*. 2000;24(6):639-653. doi:10.1016/s0149-7634(00)00029-4

Stables, J.P., Bertram, E.H., White, H.S., Coulter, D.A., Dichter, M.A., Jacobs, M.P., Loscher, W., et al. 2002. Models for epilepsy and epileptogenesis: report from the NIH workshop, Bethesda, Maryland. *Epilepsia* 43: 1410–1420.

SCHEFFER, Ingrid E. et al. ILAE classification of the epilepsies: position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. ***Epilepsia***, v. 58, n. 4, p. 512-521, 2017.

SEINFELD, Syndi; GOODKIN, Howard P.; SHINNAR, Shlomo. Status epilepticus. ***Cold Spring Harbor perspectives in medicine***, v. 6, n. 3, p. a022830, 2016.

Shneker, B. F., & Fountain, N. B. (2003). Epilepsy. *Disease-a-Month*, 49(7), 426–478. doi:10.1016/s0011-5029(03)00065-8

Sloan DM, Zhang D, Bertram EH 3rd. Increased GABAergic inhibition in the midline thalamus affects signaling and seizure spread in the hippocampus-prefrontal cortex pathway. *Epilepsia*. 2011;52(3):523-530. doi:10.1111/j.1528-1167.2010.02919.x

Spencer, Robert L. (2019). Stress: Physiology, Biochemistry, and Pathology || Hippocampus and Hippocampal Neurons. , (), 57–68. doi:10.1016/B978-0-12-813146-6.00005-9

Tatum, W. O. (2012). Mesial Temporal Lobe Epilepsy. *Journal of Clinical Neurophysiology*, 29(5), 356–365. doi:10.1097/wnp.0b013e31826b3ab7

Thom M, Martinian L, Catarino C, et al. Bilateral reorganization of the dentate gyrus in hippocampal sclerosis: a postmortem study. *Neurology* 2009;73:1033–1040.

Thom M. Review: Hippocampal sclerosis in epilepsy: a neuropathology review. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2014;40(5):520-543. doi:10.1111/nan.12150

Tyvaert L. Diagnostic positif, syndromique et étiologique d'une épilepsie [Epilepsy diagnosis: diagnostic criteria, syndromic and etiologic evaluation]. *Rev Prat*. 2017 Mar 20;67(3):264-271. French. PMID: 30657286.

Trinka E, Cock H, Hesdorffer D, et al. A definition and classification of status epilepticus—Report of the ILAE Task Force on classification of status epilepticus. *Epilepsia* 2015;56:1515–1523.

Turski WA (A), Czuczwar SJ, Kleinrok Z, Turski L. Cholinomimetics produce seizures and brain damage in rats. *Experientia*. 1983;39(12):1408-1411. doi:10.1007/BF01990130 (A)

- Turski, W. A., Cavalheiro, E. A., Schwarz, M., Czuczwar, S. J., Kleinrok, Z., & Turski, L. (1983). Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: Behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behavioural Brain Research*, 9(3), 315–335. doi:10.1016/0166-4328(83)90136-5
- Turski, L., Ikonomidou, C., Turski, W. A., Bortolotto, Z. A., & Cavalheiro, E. A. (1989). Review: Cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine: A novel experimental model of intractable epilepsy. *Synapse*, 3(2), 154–171. doi:10.1002/syn.890030207
- Turski WA. Pilocarpine-induced seizures in rodents--17 years on. *Pol J Pharmacol*. 2000;52(1):63-65.
- Van Erum J, Van Dam D, De Deyn PP. PTZ-induced seizures in mice require a revised Racine scale. *Epilepsy Behav*. 2019;95:51-55. doi:10.1016/j.yebeh.2019.02.029
- Van Luijtelaar, E. L. J. M., and A. M. L. Coenen. "Two types of electrocortical paroxysms in an inbred strain of rats." *Neuroscience letters* 70.3 (1986): 393-397.
- Velíšek L, Mares P. Hippocampal afterdischarges in rats. I. Effects of antiepileptics. *Physiol Res*. 2004;53(4):453-461.
- Vincent, P., & Mulle, C. (2009). Kainate receptors in epilepsy and excitotoxicity. *Neuroscience*, 158(1), 309–323. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.02.066
- Vidaurre J, Herbst J. Nuevos fármacos antiepilépticos [New antiepileptic drugs]. *Medicina (B Aires)*. 2019;79 Suppl 3:48-53. Spanish. PMID: 31603844.
- Wang M, Tihan T, Rojiani AM, et al. Monomorphous angiocentric glioma: a distinctive epileptogenic neoplasm with features of infiltrating astrocytoma and ependymoma. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2005;64(10):875-881. doi:10.1097/01.jnen.0000182981.02355.10
- Weber, Y. G., Biskup, S., Helbig, K. L., Von Spiczak, S., & Lerche, H. (2017). The role of genetic testing in epilepsy diagnosis and management. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 17(8), 739–750. doi:10.1080/14737159.2017.1335598
- Wolf, P. (2017). Reflex epileptic mechanisms in humans: Lessons about natural ictogenesis. *Epilepsy & Behavior*, 71, 118–123. doi:10.1016/j.yebeh.2015.01.009
- World Health Organization. (2019, June 20). *A report about health*. Retirado de <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy>.
- Yilmazer-Hanke D, O'Loughlin E, McDermott K. Contribution of amygdala pathology to comorbid emotional disturbances in temporal lobe epilepsy. *J Neurosci Res*. 2016;94(6):486-503. doi:10.1002/jnr.236897

Suporte financeiro FAEPA, CAPES, INCT (FAPESP: 2014/50891-1/ CNPq: 465458/2014-9), CNPq (132000/2018-0).

Anexo

A Tabela 1 foi obtida a partir de informações do site da Liga Brasileira de epilepsia, a fim de expressar a quantidade de profissionais e centros especializados em epilepsia no país, dividindo-a nas regiões brasileiras com seus respectivos Estados, contendo o número total de pessoas atuantes em epilepsia. Por fim é feita a divisão do número total (profissionais e centros especializados) de cada região pelo número de Estados contidos em cada região, obtendo a média por região de atuantes e locais especializados.

Tabela 1. Número de profissionais e centros especializados em epilepsia por região e Estado.

Região	Estado	número de profissionais e centros especializados	número total/região	média por região
Norte	Acre	2	26	3,71428571
	Amapá	2		
	Amazonas	6		
	Pará	9		
	Rondônia	2		
	Roraima	2		
	Tocantins	3		
Nordeste	Alagoas	6	79	8,77777778
	Bahia	19		
	Ceará	16		
	Maranhão	6		
	Paraíba	5		
	Pernambuco	12		
	Piauí	3		
	Sergipe	4		
Rio Grande do Norte	8			
Centro-Oeste	Distrito Federal	17	49	12,25
	Goiás	13		
	Mato Grosso	10		
	Mato Grosso do Sul	9		

	Espírito Santo	7		
Sudeste	Minas Gerais	28	195	48,75
	Rio de Janeiro	44		
	São Paulo	116		
	Paraná	26		
Sul	Rio Grande do Sul	20	59	19,6666667
	Santa Catarina	13		

Apêndice.

Apêndice A. Delimitação de área hipocampal de cada animal (rato) contido em cada lâmina (seção de hipocampo do animal), área em μm^2 e em mm^2 , contagem de neurônios Ag^+ e posterior normalização pela área do seu hipocampo correspondente.

Tabela 2. Dados de área, contagem e normalização de neurônios Ag^+/mm^2 após 24 h da indução de PILO-SE.

Pilocarpina 24 horas												
rato	lâmina	área		Contagem neurônios Ag^+				Neurônios Ag^+/mm^2				
		μm^2	mm^2	CA1	CA2	CA3	GD	CA1	CA2	CA3	GD	
4	15	2297248	2,297248	137	20	131	405	59,63657	8,706069	57,02475	176,2979	
4	15	3170388,5	3,170388	350	23	150	329	110,3966	7,254631	47,31281	103,7728	
4	14	3735742,1	3,735742	359	25	85	261	96,09871	6,692111	22,75318	69,86564	
4	16	2056355,8	2,056356	106	30	97	301	51,5475	14,58891	47,17082	146,3754	
4	19	4858468	4,858468	373		113	67	76,77317	0	23,25836	13,79036	
4	19'	3509634,9	3,509635	332	30	100	314	94,59674	8,547898	28,49299	89,468	
								média	81,50821	7,631604	37,66882	99,92835
8	83	1679614,2	1,679614	10	13	49	38	5,953748	7,739873	29,17337	22,62424	
8	83	1879795,6	1,879796	58	8	50	42	30,85442	4,255782	26,59864	22,34286	
8	83	1914866,9	1,914867	23	16	26	23	12,01128	8,355672	13,57797	12,01128	
8	84	1368190,1	1,36819	21	6	54	49	15,34874	4,385356	39,4682	35,81374	
								média	16,04205	6,184171	27,20454	23,19803

Tabela 3. Dados de área, contagem e normalização de Neurônios Ag⁺/mm² após 48h de injeção de Pilo para indução de SE.

Pilocarpina 48 horas												
rato	lâmina	área		Contagem neurônios Ag ⁺				Neurônios Ag ⁺ /mm ²				
		μm ²	mm ²	CA1	CA2	CA3	GD	CA1	CA2	CA3	GD	
2	31	3406627,7	3,406628	2	0	0	3	0,587091	0	0	0,880636	
2	31	3410543,1	3,410543	1	0	0	5	0,293208	0	0	1,466042	
2	31	3687926	3,687926	1	0	1	3	0,271155	0	0,271155	0,813465	
								média	0,287864	0	0,150897	0,790036
3	26	2224841,6	2,224842	0	0	0	0	0	0	0	0	
3	26	2421793,9	2,421794	1	1	0	4	0,412917	0,412917	0	1,651668	
								média	0,206459	0,206459	0	0,825834
10	72	2391435,7	2,391436	22	-	30	20	9,199495	-	12,54477	8,363177	
10	74	1926771,4	1,926771	39	11	36	36	20,24111	5,709032	18,68411	18,68411	
10	74	2081469,8	2,08147	28	9	37	32	13,45203	4,323868	17,7759	15,37375	
								média	14,29755	5,01645	16,33492	14,14034

Tabela 4. Dados de área, contagem e normalização de Neurônios Ag⁺/mm² obtidos após 72h da injeção de pilocarpina para desencadeamento de SE.

Pilocarpina 72 horas												
rato	lâmina	área		Contagem neurônios Ag ⁺				Neurônios Ag ⁺ /mm ²				
		μm ²	mm ²	CA1	CA2	CA3	GD	CA1	CA2	CA3	GD	
6	23	4401106,1	4,401106	229	17	-	23	52,03237	3,862665	-	5,225959	
6	24	3358851,5	3,358852	157	7	17	40	46,74217	2,084046	5,061254	11,90883	
								média	53,62913	2,718389	5,98134	10,86466

Tabela 5. Dados de área, contagem e normalização de neurônios Ag⁺/mm² de injeção AC após 24 h da indução de SE.

Ácido Caínico 24 horas												
rato	lâmina	área		Contagem neurônios Ag ⁺				Neurônios Ag ⁺ /mm ²				
		μm ²	mm ²	CA1	CA2	CA3	GD	CA1	CA2	CA3	GD	
3	4	3185479	3,185479	274	3	22	15	86,01532	0,941774	6,90634	4,708868	
3	6	2992916,1	2,992916	5	3	1	4	1,670611	1,002367	0,334122	1,336489	
3	6	3326065,3	3,326065	175	11	30	35	52,61472	3,307211	9,019667	10,52294	
3	7	2227111,3	2,227111	65	6	62	15	29,18579	2,694073	27,83875	6,735182	
								média	42,37161	1,986356	11,02472	5,825871
13	96	2100491,7	2,100492	56	0	29	24	26,66042	0	13,80629	11,4259	
13	97	2324757,6	2,324758	85	0	13	27	36,56295	0	5,591981	11,61411	
								média	31,61169	0	9,699136	11,52001

Tabela 6. Dados de área, contagem e normalização de neurônios Ag⁺/mm² obtidos após 48 h da injeção de AC para desencadeamento de SE.

Ácido Caínico 48 horas												
rato	lâmina	área		Contagem neurônios Ag ⁺				Neurônios Ag ⁺ /mm ²				
		μm ²	mm ²	CA1	CA2	CA3	GD	CA1	CA2	CA3	GD	
7	64	1565168,3	1,565168	49	15	23	35	31,30654	9,583634	14,69491	22,36181	
7	65	2818191	2,818191	81	8	24	30	28,74184	2,8387	8,516101	10,64513	
								média	24,95294	4,140778	11,81524	14,86591
11	92	3174753,4	3,174753	66	2	7	14	20,78902	0,62997	2,204896	4,409791	
11	93	2953331,2	2,953331	8	0	9	4	2,708806		3,047406	1,354403	
11	93	2360077	2,360077	59	0	46	56	24,99918		19,49089	23,72804	
11	93	2308092,5	2,308092	35	5	54	52	15,16404	2,166291	23,39594	22,52943	
								média	15,91526	1,398131	12,03478	13,00542
12	78	1325552,1	1,325552	0	2	12	22	0	1,508805	9,052832	16,59686	
12	80	2371966,6	2,371967	31	1	23	37	13,06932	0,421591	9,696595	15,59887	
12	80	2866170,5	2,866171	149	14	14	43	51,98574	4,884566	4,884566	15,0026	
								média	21,68502	2,271654	7,877998	15,73278

Tabela 7. Dados de área, contagem e normalização de neurônios Ag⁺/mm² obtidos após 72 h da injeção de AC para desencadeamento de SE.

Ácido Caínico 72 horas												
rato	lâmina	área		Contagem neurônios Ag ⁺				Neurônios Ag ⁺ /mm ²				
		μm ²	mm ²	CA1	CA2	CA3	GD	CA1	CA2	CA3	GD	
2	67	1462057,2	1,462057	28	0	36	19	19,1511	0	24,62284	12,99539	
2	68	2447117,2	2,447117	35	9	61	17	14,30254	3,677797	24,92729	6,94695	
2	68	2102307,1	2,102307	20	9	26	20	9,513358	4,281011	12,36737	9,513358	
								média	14,48818	3,581937	18,38286	10,26741
4	56	4516186,4	4,516186	122	6	9	13	27,01394	1,328555	1,992832	2,878535	
								média	27,01394	1,328555	1,992832	2,878535

Apêndice B. Dados estatísticos definidos pela média, erro padrão da média/*standard error of the mean* (SEM) e N número de animais. Obtido pelo software *GraphPad Prisma*.

Tabela 8. Após PILO-SE as áreas hipocâmpais CA1, CA2, CA3 e DG, nos tempos de 24 h, 48 h e 72 h

PILO												
TEMPO PÓS SE EM HORAS	CA1			CA2			CA3			DG		
	média	SEM +/-	N	média	SEM +/-	N	média	SEM +/-	N	média	SEM +/-	N
24	48,77	32,73	2	6,905	0,725	2	32,43	5,23	2	61,555	38,365	2
48	53,62	0	1	5,01	0	1	16,33	0	1	14,14	0	1
72	53,62	0	1	2,71	0	1	5,98	0	1	10,86	0	1

Tabela 9. Após AC-SE as áreas hipocâmpais CA1, CA2, CA3 e DG, nos tempos de 24 h, 48 h e 72 h.

ÁCIDO CAÍNICO												
TEMPO PÓS SE EM HORAS	CA1			CA2			CA3			DG		
	média	SEM +/-	N	média	SEM +/-	N	média	SEM +/-	N	média	SEM +/-	N
24	36,99	5,38	2	0,99	0,99	2	10,355	0,665	2	8,67	2,85	2
48	20,43	4,52	2	2,765	1,375	2	11,92	0,11	2	13,93	0,93	2
72	20,745	6,265	2	2,45	1,13	2	10,185	8,195	2	9,3	6,43	2