

Universidade de São Paulo  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

POLIANNA DELFINO PEREIRA

**CARACTERIZAÇÃO COMPORTAMENTAL, ELETROFISIOLÓGICA E  
CELULAR DO ABRASAMENTO RÁPIDO DA AMÍGDALA E DOS  
TRATAMENTOS COM ESTÍMULOS OLFATÓRIOS E COM HUF-101, UM  
POTENTE ANÁLOGO DO CANABIDIOL**

RIBEIRÃO PRETO

2019



POLIANNA DELFINO PEREIRA

**CARACTERIZAÇÃO COMPORTAMENTAL, ELETROFISIOLÓGICA E  
CELULAR DO ABRASAMENTO RÁPIDO DA AMÍGDALA E DOS  
TRATAMENTOS COM ESTÍMULOS OLFATÓRIOS E COM HUF-101, UM  
POTENTE ANÁLOGO DO CANABIDIOL**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da  
Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutora em  
Ciências.

Área de concentração: Ciências da Saúde

Opção: Neurologia

Orientador: **Prof. Dr. Norberto Garcia-Cairasco**

RIBEIRÃO PRETO

2019

**AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE  
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO, CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO,  
EXCLUSIVAMENTE PARA FINS NÃO COMERCIAIS, DE ESTUDO,  
PESQUISA OU DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA, DESDE QUE CITADA A FONTE.**

## **FICHA CATALOGRÁFICA**

Pereira, Polianna Delfino

Caracterização comportamental, eletrofisiológica e celular do Abrasamento Rápido da Amígdala e dos tratamentos com estímulos olfatórios e com HUF-101, um potente análogo do canabidiol. Ribeirão Preto, 2019.

Páginas: 264.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP- Área de concentração: Ciências da Saúde; Opção: Neurologia.

Orientador: Cairasco, Norberto Garcia.

- |   |                                   |                                  |
|---|-----------------------------------|----------------------------------|
| 1. Epilepsia do Lobo Temporal                   | 2. Abrasamento Rápido da Amígdala |                                  |
| 3. Memória                                      | 4. Medo Inato                     | 5. Medo Condicionado ao Contexto |
| 6. <i>2,5-Dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline</i> | 7. Gato                           | 8. Olfacção                      |
| 9. Canabidiol                                   | 10. HUF-101                       |                                  |

# FOLHA DE APROVAÇÃO

**POLIANNA DELFINO PEREIRA**

**CARACTERIZAÇÃO COMPORTAMENTAL, ELETROFISIOLÓGICA E CELULAR DO ABRASAMENTO RÁPIDO DA AMÍGDALA E DOS TRATAMENTOS COM ESTÍMULOS OLFATÓRIOS E COM HUF-101, UM POTENTE ANÁLOGO DO CANABIDIOL**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Aprovada em: \_\_\_\_\_

## **Banca examinadora**

Prof. Dr. Norberto Garcia-Cairasco (Orientador e Presidente da Banca)

Instituição: FMRP-USP      Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof (a). Dr (a). \_\_\_\_\_

Instituição: PPG Neurologia e Neurociências      Assinatura: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof (a). Dr (a). \_\_\_\_\_

Instituição: USP      Assinatura: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof (a). Dr (a). \_\_\_\_\_

Instituição: Externo      Assinatura: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_



## **DEDICATÓRIA**

*À minha família.*





## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus, por ter me inspirado, protegido, guiado nesta importante e árdua etapa.

À minha família, em especial à minha mãe, pelo amor incondicional, doação e paciência. Sem TODOS vocês, certamente não teria conseguido chegar à conclusão desse sonho. Obrigada por se fazerem presentes em todos os momentos, me apoiando, me dando força que muitas vezes faltava e a coragem para não desistir. Meu amor, gratidão e admiração por TODOS vocês!

Gostaria também de agradecer ao paiadrastro Xavier (*in memoriam*) pelo exemplo de homem e profissionalismo!

Ao Bernardo pelo carinho, compreensão, respeito e pelo incansável apoio ao longo do período de elaboração deste trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Norberto Garcia-Cairasco pela oportunidade em fazer ciência, confiança e conhecimento compartilhado durante o processo de orientação, contribuindo “significativamente” para meu crescimento científico, intelectual e pessoal.

Aos meus colaboradores pela paciência e dedicação para a realização desse trabalho, com auxílios nas técnicas, discussões, sugestões e correções. Certamente a participação de vocês foi decisiva para a conclusão desse trabalho. Em especial aos amigos Victor Rodrigues Santos, Poliana Bertti Dutra e Artur Fernandes. Além dos queridos Daniel Medeiros de Castro, Daniel Moreira Cestari, Eduardo de Lima Umeoka e Ana Luiza Ferreira Donatti. Minha gratidão!

Aos demais membros do LNNE por todo auxílio para a realização desta pesquisa.

Aos meus queridos amigos pelo apoio, pelas conversas inspiradoras e pelo companheirismo essencial nessa etapa!

À Universidade de São Paulo (USP).

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP).

Ao Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento (FMRP-USP), em especial a querida Silvana Lo Turco.

Ao Departamento de Fisiologia (FMRP-USP), em especial ao José Antônio Cortes de Oliveira, Flávio Del Vecchio, Rubens Fernando de Melo, Maria Valci Aparecida dos Santos Silva e ao Leonardo Fidelis que não mediram esforços em me ensinar e ajudar.

Aos Laboratórios coordenados pelo Professor Dr. Sebastião de Sousa Almeida, Professor-Pesquisador Dr. Manoel Jorge Nobre do Espírito Santo (em especial a Franciely Paliarin), Professor Dr. Hélio Zangrossi Júnior e Professor Dr. José Antunes Rodrigues. Aos

Professores Dr. Victor Rodrigues Santos (meu consultor científico) e Dr. Newton Sabino Canteras. Ao Laboratório do Professor Dr. Thiago do Santos Moreira, em especial ao Dr. Leonardo T. Totola. Ao Núcleo de Neurociências (NNC-UFMG), principalmente ao Professor Dr. Márcio Flávio Dutra Moraes e ao Dr. Daniel de Castro Medeiros. Ao grupo do Professor Dr. João Luís Garcia Rosa e ao Me. Daniel Moreira Cestari. E finalmente, ao Dr. Tayllon dos Anjos Garcia e Professor Dr. Norberto Cysne Coimbra.

À Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), em especial aos mestres e à 10ª Turma de Fisioterapia.

Aos grupos *Epilepsies with External Modification of Ictogenesis (EpExMo)* e **Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina (INCT-TM)**.

Finalmente a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste estudo.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Neurofisiologia e Neuroetologia Experimental (LNNE), pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), da Universidade de São Paulo (USP). Com apoio financeiro das seguintes agências de fomento:

**\*Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – PROEX-CAPES;**

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – INCT-CNPq;

Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência – FAEPA;

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – INCT-FAPESP.



INCT  
(FAPESP/CNPQ)



## RESUMO

Cerca de 30% dos pacientes com Epilepsia do Lobo Temporal (ELT) não respondem aos atuais tratamentos e uma possível razão é a compreensão restrita dos mecanismos básicos envolvidos nas Epilepsias. Estudos indicam que a exposição a um estímulo olfatório é capaz de modular a ocorrência das crises epiléticas. Adicionalmente, cresce o uso do Canabidiol (CBD) como tratamento alternativo e complementar nas Epilepsias, entretanto, uma promissora opção é seu derivado sintético fluorado, o HUF-101. Assim, os objetivos deste estudo foram: (Capítulo I) Investigar em modelo animal as Epilepsias e sua repercussão na função cognitiva (aprendizado e memória), associada a potencial neurogênese hipocampal aberrante. (Capítulo II) Avaliar os efeitos do 2,5-Dihidro-2,4,5-trimethylthiazoline (TMT, incluindo nanoemulsão) e da estimulação elétrica hipotalâmica, nas respostas defensivas inatas ou condicionadas, sob uma variedade de condições. (Capítulo III) Verificar os efeitos eletrencefalográficos (EEGráficos) da exposição ao TMT, nas crises límbicas induzidas pelo Abrasamento Rápido da Amígdala (ARA). (Capítulo IV) Avaliar os efeitos da administração aguda de HUF-101, um potente derivado fluorado sintético do CBD, no ARA, um modelo experimental de ELT. Para tanto foram realizados diferentes protocolos: (Capítulo I) Ratos *Wistar-Old* machos (280-300 g) foram submetidos ao procedimento cirúrgico para implante de eletrodos, subsequentemente os animais foram expostos ao protocolo de ARA, que consistiu em 10 estimulações elétricas diárias, durante 2 dias consecutivos. Quarenta e oito horas após foram submetidos ao Labirinto Aquático de Morris (LAM) e seus cérebros foram processados para imunistoquímica de *Duplacortina*, em adição foram realizadas análises comportamentais (Escala de Racine/Pinel & Rovner e para o LAM), EEGráfica e histologia para *Nissl* (CEUA: 133/2015). (Capítulo II) (Protocolo 1) Ratos *Sprague Dawley* machos adultos foram expostos à seguinte sequência de testes: Sobressalto Potencializado pelo Medo, Condicionamento Contextual com Estímulo Olfatório (Acetato de Amila ou TMT ou Veículo Nanoemulsão ou TMT Nanoemulsão), Labirinto em Cruz Elevado, Campo Aberto, extração seriada e dosagem da Corticosterona e dissecação da Glândula Adrenal. (Protocolo 2) Ratos *Wistar-Old* machos adultos receberam 4 preparações (5 µL em cada narina) na seguinte sequência: sem odor (apenas estímulo mecânico), água, nanoemulsão contendo veículo e nanoemulsão contendo TMT, após foi realizado a neuroetologia. (Protocolo 3): Ratos *Wistar-Old* machos adultos após implante dos eletrodos foram submetidos a estimulação elétrica hipotalâmica (intensidade crescente da corrente: 100-1000 µA), ao final foi realizada a análise neuroetológica (CEUA: 20/2019). (Capítulo III) Ratos *Wistar-Old* machos (280-300 g) após estereotaxia, parte dos animais foi exposta a câmara saturada com Água ou TMT, enquanto a outra parte, após o ARA e previamente ao 21º estímulo, foi submetida a exposição olfatória, também com Água ou TMT. A atividade EEGráfica foi avaliada pela ocorrência da 1º e 2º pós descargas e pela Transformada Rápida de Fourier (CEUA: 200/2011). (Capítulo IV) Ratos *Wistar-Old* machos adultos após cirurgia estereotóxica foram submetidos ao ARA, no 3º dia foram injetados com veículo ou HUF-101 (10 mg/kg; i.p). Trinta minutos após o tratamento, os animais foram expostos ao estímulo teste. Respostas comportamentais foram classificadas de acordo com a Escala de Racine/Pinel & Rovner e sequências comportamentais (análise neuroetológica), além disso, foi realizada análise EEGráfica (CEUA: 27/2019). Os resultados indicaram: (Capítulo I) A Epilepsia induzida pelo ARA não interferiu na função cognitiva (aprendizado e memória espacial), associado à ausência da neurogênese hipocampal aberrante. (Capítulo II) O TMT líquido induziu respostas de medo inato, mas não medo condicionado ao contexto, além disso, desencadeou comportamentos tipo ansiosos, sem alterar a atividade locomotora. Adicionalmente, ratos expostos agudamente ao TMT apresentaram aumento da secreção de Corticosterona e do peso das Adrenais. Enquanto o TMT nanoemulsão não interferiu substancialmente nas respostas comportamentais de medo inato. E por último, a estimulação hipotalâmica induziu importantes comportamentos defensivos. (Capítulo III) Avaliações comportamentais e EEGráficas confirmaram que o TMT, um estímulo olfatório com forte relevância biológica (cheiro de predador), reduziu significativamente as crises epileptiformes límbicas. (Capítulo IV) A administração aguda do derivado fluorado sintético do CBD, o HUF-101 (10 mg/kg i.p.) apresentou efeito anticonvulsivante no ARA. Dados adicionais e complementares indicaram efeito neuroprotetor do HUF-101 somente após indução do *Status Epilepticus*, mas não no ARA.

**Palavras-chave:** Epilepsia do Lobo Temporal. Abrasamento Rápido da Amígdala. Memória. Medo Inato. Medo Condicionado ao Contexto. 2,5-Dihidro-2,4,5-trimethylthiazoline. Canabidiol. HUF-101.

## ABSTRACT

About 30% of patients with Temporal Lobe Epilepsy (TLE) do not respond to current treatments and a possible reason is the restricted understanding of the basic mechanisms involved in Epilepsies. Studies indicate that exposure to an olfactory stimulus is capable of modulating the occurrence of epileptic seizures. Additionally, the use of Cannabidiol (CBD) as an alternative and complementary treatment in Epilepsies has grown, however, a promising option is its fluorinated synthetic derivative, HUF-101. Thus, the objectives of this study were: (Chapter I) To investigate in an animal model to Epilepsies its repercussion on cognitive function (learning and memory) potentially associated with aberrant hippocampal neurogenesis. (Chapter II) To evaluate the effects of 2,5-Dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline (TMT, including nanoemulsion) and hypothalamic electrical stimulation, on innate or conditional defensive responses, under a variety of conditions. (Chapter III) To verify the behavioral and electroencephalographic (EEG) effects of TMT in the limbic seizures induced by Amygdala Rapid Kindling (ARK). (Chapter IV) To evaluate the effects of acute administration of HUF-101, a potent synthetic fluorinated derivative of CBD, in ARK, an experimental model of ELT. For this purpose, different protocols were performed: (Chapter I) Male Wistar-Old rats (280-300 g) were submitted to the surgical procedure for electrode implantation, subsequently the animals were exposed to the ARK protocol, which consisted in 10 daily electrical stimuli, during 2 consecutive days. Forty-eight hours later, they were submitted to the Morris Water Maze (MWM) and their brains were processed for immunohistochemistry of Doublecortin, in addition behavioral (Racine/Pinel & Rovner Scale and for MWM), EEG and histology for Nissl analyzes were performed (CEUA: 133/2015). (Chapter II) (Protocol 1) Adult male Sprague Dawley rats were exposed to the following sequence of tests: Fear Potentiated Startle, Contextual Conditioning with Olfactory Stimulation (Amyl Acetate or TMT or Vehicle Nanoemulsion or TMT Nanoemulsion), Elevated Plus Maze, Open Field, serial extraction and Corticosterone dosing and Adrenal Gland dissection. (Protocol 2) Adult male Wistar-Old rats received 4 preparations (5  $\mu$ l in each nostril) in the following sequence: no odor (only mechanical stimulus), water, vehicle-containing nanoemulsion and TMT-containing nanoemulsion after it was realized neuroethology. (Protocol 3): Adult male Wistar-Old rats, after electrode implantation, were submitted to hypothalamic electrical stimulation (increasing intensity of the current: 100-1000  $\mu$ A) and at the end the neuroethological analysis was performed (CEUA: 20/2019). (Chapter III) Male Wistar-Old rats (280-300 g) after stereotactic surgery, part of the animals was exposed to a chamber saturated with water or TMT, while the other part, after ARK and prior to the 21<sup>st</sup> stimulus, underwent olfactory exposure, also with water or TMT. The EEG activity was evaluated by the occurrence of the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> afterdischarges and by the Fast Fourier Transform (CEUA: 200/2011). (Chapter IV) Adult male Wistar-Old rats after stereotactic surgery were submitted to ARK, on the 3<sup>rd</sup> day they were injected with vehicle or HUF-101 (10 mg/kg; i.p). Thirty minutes after the treatment, animals were exposed to the test stimulus. Behavioral responses were classified according to the Racine/Pinel & Rovner Scale and behavioral sequences (neuroethological analysis), in addition, the EEG analysis was performed (CEUA: 27/2019). The results indicated: (Chapter I) ARK-induced epilepsy did not interfere with cognitive function (learning and spatial memory), associated with the absence of aberrant hippocampal neurogenesis. (Chapter II) TMT induced responses of innate fear but not conditioned fear to the context, in addition, triggered anxious-like behaviors, without altering the locomotor activity. Additionally, rats exposed acutely to TMT had increased Corticosterone secretion and Adrenal weight. TMT nanoemulsion did not interfere substantially in the behavioral responses of innate fear. And finally, hypothalamic stimulation induced important defensive behaviors. (Chapter III) EEG assessments confirmed that TMT, an olfactory stimulus with strong biological relevance, significantly reduced limbic epileptiform seizures. (Chapter IV) Acute administration of the synthetic fluorinated derivative of CBD, HUF-101 (10 mg/kg, i.p.) showed anticonvulsant effect. Additional and complementary data indicated neuroprotective effect of the HUF-101 only after induction of Status Epilepticus, but not in ARK.

**Keywords:** Temporal Lobe Epilepsy. Amygdala Rapid Kindling. Memory. Innate Fear. Conditioned Fear to the Context. 2,5-Dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline. Cannabidiol. HUF-101.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**Figura 1.** Delineamento experimental: Epilepsias e suas repercussões na função cognitiva (aprendizagem e memória) associada ao processo de potencial neurogênese hipocampal aberrante. 49

**Figura 2.** Desenho esquemático do rato implantado com os eletrodos após a cirurgia estereotáxica. De fato, esta Figura é meramente ilustrativa, considerando as coordenadas estereotáxicas e os planos sagitais diferentes para as áreas estudadas. 51

**Figura 3.** Classificação comportamental das crises, estímulo a estímulo, durante o Abrasamento Rápido da Amígdala (1°-20° estímulo), para os grupos: Não abrasado (círculo, N= 09) e Abrasado (quadrado, N= 09). No eixo Y, a escala média ( $\pm$ EPM) de acordo com Racine (1972), alcançada ao longo dos estímulos, indicada no eixo X. Os animais do grupo Não abrasado apresentaram Índice de Gravidade para Crises Límbicas no 1° estímulo de  $1,125 \pm 0,2266$ , enquanto no 20° estímulo de  $1,750 \pm 0,2500$ . Em contraste, o grupo Abrasado obteve Índice Límbico  $2,222 \pm 0,6827$  no 1° estímulo e  $4,000 \pm 0,4410$  no 20° estímulo do Abrasamento Rápido da Amígdala. Nosso achado indica um aumento significativo no Índice Límbico ao longo dos estímulos para o grupo Abrasado ( $***p < 0,001$ , Anova *Two-Way* medidas repetidas com pós-teste de *Bonferroni*), com diferenças significativas entre os grupos no 6°, 10° e 13°-20° estímulos ( $**p < 0,01$ , Anova *Two-Way* medidas repetidas com pós-teste de *Bonferroni*). 56

**Figura 4.** Exemplo do registro EEGráfico de um animal do grupo Não abrasado (A, C, E e G) e do grupo Abrasado (B, D, F e H), ilustrando a atividade EEGráfica (mV) no Córtex Piriforme (linha vermelha), Complexo Amigdalóide (linha azul) e Formação Hipocampal (linha verde), antes (PRÉ, linha de base), durante (ESTÍMULO, com saturação do amplificador) e após o estímulo (PÓS), para o 1° (A e B) e 20° estímulos (E e F). A análise espectral do eletrencefalograma (EEG) também mostra a frequência (Hz, eixo Y esquerdo) e intensidade (dB, eixo Y direito), ao longo do tempo (eixo X) (C, D, G e H). É possível observar em G e H (20° estímulo) o aumento da duração da atividade do EEG ao longo do tempo (eixo X), bem como da intensidade do sinal (dB) em relação ao C e D (1° estímulo), particularmente para animais do grupo Abrasado (coluna direita). 57

**Figura 5.** Dados eletrencefalográficos (EEGráficos) durante a progressão do Abrasamento Rápido da Amígdala indicando o aumento da duração da 1° pós descarga no eletrencefalograma (EEG) no 20° estímulo (barra preta) em comparação ao 1° (barra branca), para o grupo Abrasado (coluna direita ou [B] Complexo Amigdalóide, [D] Formação Hipocampal e [F] Córtex

Piriforme) *versus* grupo Não abrasado (coluna da esquerda ou [A] Complexo Amigdalóide, [C] Formação Hipocampal e [E] Córtex Piriforme), particularmente para Complexo Amigdalóide (B) e Formação Hipocampal (D). No eixo esquerdo Y mostra a duração da 1<sup>o</sup> pós descarga no EEG, no 1<sup>o</sup> e 20<sup>o</sup> estímulos (eixo X). Teste de *Wilcoxon*. \*\* $p < 0,01$ . 58

**Figura 6.** Aprendizado e memória espacial no Labirinto Aquático de Morris, para os grupos Controle (N= 15), Não abrasado (N= 09) e Abrasado (N= 09). (A) Latência para encontrar a plataforma. (B) Distância calculada. (C) Velocidade. (D) Média das latências ( $\pm$ EPM) dos animais ao longo dos dias durante treinamento. (E) Distância média calculada ( $\pm$ EPM) dos animais ao longo dos dias durante treinamento. Diferenças observadas: grupos (C\*\*) e tentativas (A\*\*\*, B\*\*\* e C\*\*\*). Anova *Two-Way* medidas repetidas com pós-teste de *Bonferroni*. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . 59

**Figura 7.** Aprendizado e memória espacial no Labirinto Aquático de Morris, para os grupos Controle (N= 15), Não abrasado (N= 09) e Abrasado (N= 09). (A) Tempo gasto em cada quadrante durante a Probe Trial. (B) Ocupação do quadrante alvo. (C) Distância calculada. (D) Velocidade. Diferenças observadas entre: grupos (C\*\*) e entre os grupos Controle *versus* Não abrasado (D\*). Teste de *Kruskal-Wallis*, com pós-teste de *Dunn*. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ . 61

**Figura 8.** Aprendizado e memória espacial no Labirinto Aquático de Morris, para os grupos Controle (N= 15), Não abrasado (N= 09) e Abrasados (N= 09). (A) Latência para encontrar a plataforma. (B) Distância calculada. (C) Velocidade. Teste de *Kruskal-Wallis*, com pós-teste de *Dunn*. \* $p < 0,05$ . 61

**Figura 9.** Número de novos neurônios que expressam *Duplocortina* (*Doublecortina* ou *Doublecortin*,  $DCX^+$ ) no giro denteado, nos grupos (A) Controle (N= 09), (B) Não abrasado (N= 07) e (C) Abrasado (N= 08). (D) Expressão de  $DCX^+$  em todos os grupos para ambos os hemisférios. (A-C) Teste de *Wilcoxon*. (D) Teste de *Kruskal-Wallis*, com pós-teste de *Dunn*.  $p > 0,05$ . 62

**Figura 10.** Imunoistoquímica para  $DCX$  no giro denteado, evidenciando a ausência de diferença significativa entre os grupos analisados: (A) Controle, (B) Não abrasado e (C) Abrasado. No inset (A1, B1 e C1) podemos notar as células  $DCX^+$  pela coloração marrom, com células (incluindo prolongamentos axonais) apontados pelas setas pretas. A proteína endógena  $DCX$  é expressa nos corpos celulares e dendritos de neurônios granulares em maturação e migração pela camada de células granulares. Todos os tecidos foram submetidos à mesma bateria de realização da imunoistoquímica. GCL: camada de célula granular. ML: camada molecular do giro denteado. sgz: zona subgranular. Barra de calibração 130-220  $\mu$ m. 63



**Figura 11.** Desenho experimental para verificar os efeitos comportamentais e neuroendócrinos da exposição olfatória ao TMT utilizando o paradigma de medo condicionado ao contexto. 74

**Figura 12.** Câmara utilizada durante o Protocolo Experimental 2, composta por: sistema de controle e sistema de exaustão (idealizada pelo nosso grupo, LNNE). 81

**Figura 13.** Padrão de calibração para confecção dos Fluxogramas (GARCIA-CAIRASCO et al., 1992). Cada retângulo representa um comportamento. A altura dos retângulos simboliza a frequência de ocorrência, e a base, a duração média do comportamento durante a observação. As setas representam valores estatísticos ( $\chi^2 \geq 3,841$ ;  $\log \chi^2 \geq 0,25$ ;  $p < 0,05$ ) que indicam a probabilidade de um segundo comportamento ocorrer após um dado comportamento. A cor do retângulo tem o objetivo de identificar qualitativamente classes comportamentais diferentes. A cor das setas representa o ponto de partida das mesmas ao acompanhar a cor do retângulo que origina a interação entre pares comportamentais. 82

**Figura 14.** Resposta de Sobressalto Potencializada pelo Medo: após o condicionamento da luz e choque, os animais ao verem a luz se acender e, sequencialmente, ouvir um som intenso (condição luz e som: 90 dB ou 105 dB), apresentaram aumento significativo da amplitude de sobressalto, comparado apenas ao estímulo sonoro (condição só som: 90 dB ou 105 dB). Anova *Two-Way* medidas repetidas com pós-teste de *Bonferroni*. \*\*\* $p < 0,001$ . N= 10 por grupo (com exceção do grupo TMT, N= 12). Barras indicam média±erro padrão da média. 86

**Figura 15.** Parâmetros avaliados no Condicionamento Contextual (exposição [sessão de condicionamento] e reexposição [sessão teste] à câmara com duplo compartimento): (A) Tempo na Toca, (B) *Rearing*, (C) *Head Out*, (D) *Stretch Attent Posture*, (E) Interação com a fonte odorífera e tempo de permanência nos Quadrantes (F) 1, (G) 2 e (H) 3. Dados indicaram que ratos expostos ao TMT (grupo TMT) exibiram respostas comportamentais de medo inato, mas não condicionamento contextual. Anova *Two-Way* medidas repetidas com pós-teste de *Bonferroni*, enquanto para comparação do mesmo grupo entre sessões de condicionamento e teste, utilizamos os testes *Unpaired t* (F, G e H) ou *Mann Whitney* (A e B). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . N= 10 por grupo (com exceção do grupo TMT, N= 12). Barras indicam média±erro padrão da média. 89

**Figura 16.** Parâmetros avaliados no Labirinto em Cruz Elevado: (A) número de entradas nos braços fechados, (B) tempo gasto nos braços fechados, (C) número de entradas nos braços abertos, (D) tempo gasto nos braços abertos e (E) tempo no centro. Dados indicam que ratos expostos ao TMT (grupo TMT) exibiram comportamentos tipo ansiosos, 24 horas após a sessão de condicionamento. (B, C e E) Teste *Unpaired t* ou (A e D) Teste *Mann Whitney*. \* $p < 0,05$ ;

**\*\* $p < 0,01$ .** N= 10 por grupo (com exceção do grupo TMT, N= 12). Barras indicam média±erro padrão da média. 90

**Figura 17.** Distância total no Campo Aberto: realizado imediatamente após o Labirinto em Cruz Elevado (aproximadamente 25 minutos após o início da sessão teste), indica ausência de diferença significativa entre os grupos experimentais. Teste *Unpaired t*.  $p > 0,05$ . N= 10 por grupo (com exceção do grupo TMT, N= 12). Barras indicam média±erro padrão da média. 91

**Figura 18.** Dosagem de Corticosterona por radioimunoensaio: 30 minutos (min) após a sessão de condicionamento (1º dia), além de 30 e 90 min após a reexposição ao contexto (sessão teste, 2º dia), indicando o aumento da secreção da Corticosterona aos 30 min após a sessão de condicionamento (1º dia) e aos 90 min após a sessão teste (2º dia), para os animais do grupo TMT. Teste *Mann Whitney* (1º dia, 30 min). Anova *Two-Way* medidas repetidas com pós-teste de *Bonferroni* (2º dia). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ . N= 10 por grupo (com exceção do grupo TMT, N= 12). Barras indicam média±erro padrão da média. 92

**Figura 19.** Peso das Glândulas Adrenais direita e esquerda: ratos expostos agudamente ao TMT apresentaram aumento do peso das Adrenais, indicando o efeito do tratamento com TMT (teste *Unpaired t*). Além disso, dados indicam efeito da administração, com peso significativamente maior nos animais expostos a câmara saturada com TMT *versus* TMT Nanoemulsão (testes *Unpaired t* [DIREITA] e *Mann Whitney* [ESQUERDA]). \*\*\* $p < 0,001$ . N= 10 por grupo (com exceção do grupo TMT, N= 12). Barras indicam média±erro padrão da média. 93

**Figura 20.** Fluxogramas com a soma dos comportamentos após estímulo mecânico (sem odor, A, ESQUERDA), administração nasal de água (A, DIREITA), nanoemulsão contendo veículo (B, ESQUERDA) e nanoemulsão contendo TMT (B, DIREITA). Período de observação de cinco minutos após a exposição às preparações. Em geral é possível verificar particularmente itens exploratórios e de autolimpeza, além da expressão de algumas respostas de medo inato, especialmente verificados após administração da nanoemulsão contendo TMT (B, DIREITA), incluindo: alerta (ALER), bocejar (BC) e sobressalto (SOB; elipses laranjas). Detalhes de calibração, como retângulos, setas e cores, consulte a Figura 13. Lista completa de siglas na Tabela Suplementar 1. 95

**Figura 21.** Evidências neuroetológicas do efeito da estimulação hipotalâmica nas respostas defensivas. Diferentes respostas comportamentais semelhantes ao medo foram induzidas pela estimulação elétrica (aos 100 e 1000  $\mu A$ ), tais como: alerta (ALER), bocejar (BC), recuar (RE) e sobressalto (SOB; quadrados azuis preenchidos por laranja). Com importante acentuação dos comportamentos defensivos, particularmente durante o estímulo elétrico com intensidade de corrente de 1000  $\mu A$ , indicado pela presença dos seguintes comportamentos: girar à direita

(GID), girar à esquerda (GIE) e pular (PU; quadrados azuis preenchidos em amarelo). Na primeira célula (esquerda) de cada estímulo, o período PRE, com duração de 01 minuto (min) anterior ao estímulo; na segunda célula (meio) o período do ESTÍMULO com 2 segundos, e finalmente na terceira célula (direita), o período PÓS também com duração de 01 min, após o estímulo. Detalhes de calibração, como retângulos, setas e cores, consulte a Figura 13. Lista completa de siglas na Tabela Suplementar 1. 97

**Figura 22.** Esquema das principais áreas ativadas pela exposição direta ao gato (para maiores detalhes ver CANTERAS; PAVESI; CAROBREZ, 2015; GROSS; CANTERAS, 2012). 109

**Figura 23.** Ocorrência da 1º e 2º pós descargas no EEG no 1º e 21º estímulos para os grupos Estímulo e Água (N= 08), e Estímulo e TMT (N= 12). O painel superior (A) ilustra um sinal bruto representativo do 1º estímulo. A inserção descreve uma típica 1º (traço preto) e 2º (cinza traço) pós descargas no EEG. Os gráficos mostram a quantificação da presença e ausência da pós descargas para as seguintes estruturas: Formação Hipocampal (B, E, H e K), Córtex Piriforme (C, F, I e L) e Complexo Amigdalóide (D, G, J e M). Os dados indicam que grupo Estímulo e TMT apresentou maior ausência de pós descarga no 21º estímulo comparado com o 1º estímulo para seguintes as estruturas: Córtex Piriforme (1º pós descarga - C) e Formação Hipocampal (1º e 2º pós descargas - B e H, respectivamente). teste  $\chi^2$ . \* $p < 0,05$ . 120

**Figura 24.** Características espectrais dos grupos Sem Estímulo e Água (Water; N= 08), e Sem Estímulo e TMT (TMT; N= 08), com diferenças estatísticas para as estruturas: Formação Hipocampal (HIP) e Complexo Amigdalóide (AMYG), em diversos parâmetros, tais como: Frequência Mediana (*Median Frequency*), Pico de Potência (*Peak Power*) e Frequência do Pico de Potência (*Frequency of Peak Power*). Teste *Mann-Whitney*.  $p < 0,05$ . 121

**Figura 25.** Características espectrais dos grupos Estímulo e Água (Water; N= 08), e Estímulo e TMT (TMT; N= 12), com diferenças estatísticas para o Pico de Potência (*Peak Power*) em teta (theta) na Formação Hipocampal (HIP). Teste *Mann-Whitney*.  $p < 0,05$ . 122

**Figura 26.** Figura esquemática da modulação das crises epiléptica pela circulação de noradrenalina central (ver texto para maior elaboração). O TMT é um odor capaz de ativar respostas fisiológicas e comportamentais desencadeadas pelo sistema simpatoadrenomedular (SAM), que levam à liberação de moléculas mediadoras, particularmente a noradrenalina. A circulação da noradrenalina ativa os receptores  $\beta$  no Nervo Vago, que por consequência ativa o *Locus Coeruleus* e o Núcleo do Trato Solitário. Enquanto a liberação de noradrenalina pelo *Locus Coeruleus* e o Núcleo do Trato Solitário ativa o Complexo Amigdalóide, com subsequente ativação do Córtex Piriforme, Formação Hipocampal e outras estruturas cerebrais. Assim, a circulação de noradrenalina poderia modular a atividade epiléptica, como

demonstrado por diversos estudos (APPLEGATE; BURCHFIEL; KONKOL, 1986; APPLEGATE; KONKOL; BURCHFIEL, 1987; DAILEY; NARITOKU, 1996; FEINSTEIN; GLEASON; LIBET, 1989; JOBE; BROWNING, 2005). Adaptado de Tank & Lee Wong (2015). 126

**Figura 27.** Padrão de calibração para confecção dos Fluxogramas (GARCIA-CAIRASCO et al., 1992). Cada retângulo representa um comportamento. A altura dos retângulos simboliza a frequência de ocorrência, e a base, a duração média do comportamento durante a observação. As setas representam valores estatísticos ( $\chi^2 \geq 3,841$ ;  $\log \chi^2 \geq 0,25$ ;  $p < 0,05$ ) que indicam a probabilidade de um segundo comportamento ocorrer após um dado comportamento. As cores utilizadas nos retângulos têm o objetivo de identificar qualitativamente classes relacionadas de comportamentos. A cor das setas representa o ponto de partida das mesmas ao acompanhar a cor do retângulo que origina a interação entre pares comportamentais 136

**Figura 28.** Imagem ilustrativa do posicionamento dos eletrodos, nas seguintes áreas: Córtex Piriforme (A), Complexo Amigdalóide (B) e Formação Hipocampal (C), todos no hemisfério esquerdo, evidenciado no *inset* (aumento digital de 4x). Tecido corado com *Nissl*. Todos os tecidos foram submetidos à mesma bateria para realização da histologia. 137

**Figura 29.** Efeitos da administração única de HUF-101 nos parâmetros comportamentais da crise límbica induzida pelo Abrasamento Rápido da Amígdala (ARA): (A) Classificação comportamental observada, estímulo a estímulo, durante a evolução do ARA (1°-20° estímulos, N= 14), para os períodos de estímulo (círculo preenchido,  $p > 0,05$ , Teste de *Friedman*, com pós-teste de *Dunn*) e pós estímulo (quadrado preenchido,  $***p < 0,001$ , Teste de *Friedman*, com pós-teste de *Dunn*). Em eixo Y, média ( $\pm$ EPM) do Índice de Gravidade de Crises Límbicas sugerido por Racine (1972), atingido em cada estímulo (eixo X). (B) Efeito anticonvulsivante do HUF-101 durante o 21° estímulo ( $p > 0,05$ , teste *Mann Whitney*, N= 07/grupo). (C) Efeito anticonvulsivante do HUF-101 após o 21° estímulo (período pós estímulo,  $*p < 0,05$ , teste *Mann Whitney*, N= 07/grupo). 138

**Figura 30.** Fluxogramas das sequências comportamentais do 21° estímulo elétrico dos grupos Veículo (A, N= 05), e HUF-101 (B, N= 05). Para os períodos: (1) pré estímulo elétrico com duração de 5 minutos (min) (PRÉ); (2) estimulação elétrica de 10 segundos (ESTÍMULO) e (3) pós estimulação elétrica, também com duração de 05 min (PÓS). Retângulos, setas e cores (Figura 25), siglas (Tabela Suplementar 1). 140

**Figura 31.** Efeitos de uma única dose de HUF-101 no 21° estímulo elétrico: análise espectral confirma o efeito anticonvulsivante do HUF-101 (B), observado pela menor amplitude do sinal EEGráfico (eixo y direita), duração (eixo X) e distribuição das frequências (presença de

menores frequências, eixo Y esquerda), comparando a um animal controle (grupo Veículo, A), para o mesmo período. 142

**Figura 32.** Histoquímica de Fluoro-Jade C: (A) Hipocampo: coluna da esquerda animais injetados com Veículo e coluna da direita os animais do Grupo HUF-101, (B) Córtex Cerebral: coluna da esquerda animais injetados com Veículo e coluna da direita os animais do Grupo HUF-101. Podemos notar que os animais injetados com HUF-101 tiveram qualitativamente marcação reduzida para neurodegeneração FJC<sup>+</sup> após *Status Epilepticus*, em ambas as áreas: (A) Hipocampo e (B) Córtex Cerebral, evidenciado pela coloração verde (aumento digital de 20 x). Todos os tecidos foram submetidos à mesma bateria de realização da histoquímica. Barra de calibração de 100 µm. As imagens foram adquiridas em microscópio de fluorescência *Leica DMI 600B*, com processamento foi realizado com auxílio do software aberto *Icy Bioimage* (Instituto Pasteur, Paris, França: <http://icy.bioimageanalysis.org/>). 148



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Alterações celulares e moleculares presentes no tecido cerebral de animais submetidos ao modelo de Abrasamento Rápido da Amígdala.	48
<b>Tabela 2.</b> Índice de Gravidade para Crises Límbicas.	54
<b>Tabela 3.</b> Parâmetros frequentemente adotados pela literatura para definição de pós descarga.	54
<b>Tabela 4.</b> Respostas comportamentais observadas durante o medo condicionado ao contexto.	72
<b>Tabela 5.</b> Caracterização histológica e comportamental da estimulação elétrica progressiva hipotalâmica.	99
<b>Tabela 6.</b> Fatores que potencialmente interferem nas respostas defensivas.	103
<b>Tabela 7.</b> Respostas comportamentais e endócrinas inatas induzidas pelo TMT.	105
<b>Tabela 8.</b> Efeitos do TMT na modulação de diferentes estruturas após paradigma de medo inato.	108
<b>Tabela 9.</b> Estudos recentes envolvendo TMT e áreas afins.	111
<b>Tabela 10.</b> Valor- <i>p</i> durante o período pós estímulo, indicando a evolução do Abrasamento Rápido da Amígdala representado na Figura 31.	139
<b>Tabela 11.</b> Efeito do CBD em diferentes modelos animais de epilepsia.	144





## LISTA DE SIGLAS

2-AG: 2-Araquidonoil glicerol;

AEA: Anandamina;

ARA: Abrasamento Rápido da Amígdala;

BLA: Núcleo Basolateral da Amígdala;

CBD: Canabidiol;

CEMIB: Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório;

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais;

cm: Centímetros;

CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal;

dB: Decibéis;

*DCX: Duplocortina ou Doublecortina ou Doublecortin;*

EEG: Eletrencefalograma;

EEGráfico: Eletrencefalográfico;

ELT: Epilepsia do Lobo Temporal;

*EpExMo: Epilepsies with External Modification of Ictogenesis;*

EPM: Erro padrão da média;

*FDA: Food and Drug Administration (FDA);*

*FFT: Fast Fourier Transform;*

FMRP: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto;

g: gramas;

GABA: Ácido gama-aminobutírico;

*GEPR: Genetically Epilepsy-Prone Rat;*

h: Hora;

HPA: Hipotálamo-Pituitária-Adrenal;

HUF-101: 4'-Fluorocanabidiol;

Hz: Hertz;

i.c.v.: Intracerebroventricular;

INCT-TM: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina;

i.p.: Intraperitoneal;  
LAM: Labirinto Aquático de Morris;  
LNNE: Laboratório de Neurofisiologia e Neuroetologia Experimental;  
LTP: *Long-term potentiation*;  
min: Minutos;  
ms: Milisegundo;  
NIH: *The National Institutes of Health*;  
NMDA: N-Metil D-Aspartato;  
PBS: Tampão fosfato-salino;  
PFA: Paraformaldeído;  
PTZ: Pentilenotetrazol;  
s: Segundos;  
SAM: Sistema Simpatoadrenomedular;  
SUDEP: Morte Súbita nas Epilepsias;  
THC:  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol;  
TMT: *2,5-Dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline*;  
USP: Universidade de São Paulo;  
WAR: *Wistar Audiogenic Rat*.

Para lista de siglas referentes aos itens comportamentais apresentados nos Fluxogramas, ver TABELA SUPLEMENTAR 1.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>33</b>
<b>1.1</b>	<b>Epilepsias .....</b>	<b>33</b>
<b>1.2</b>	<b>Contextualização histórica das Epilepsias.....</b>	<b>34</b>
<b>1.3</b>	<b>Modelos animais para crises e Epilepsias: Abrasamento Rápido da Amígdala, Kindling Audiogênico e Status epilepticus .....</b>	<b>35</b>
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>39</b>
<b>3</b>	<b>HIPÓTESES .....</b>	<b>42</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>43</b>
<b>5</b>	<b>CAPÍTULO I: EPILEPSIAS E SUAS REPERCUSSÕES NA FUNÇÃO COGNITIVA E NO PROCESSO DE NEUROGÊNESE HIPOCAMPAL ABERRANTE</b>	<b>45</b>
	<b>45</b>	
<b>5.1</b>	<b>Introdução .....</b>	<b>46</b>
<b>5.2</b>	<b>Objetivo .....</b>	<b>48</b>
<b>5.3</b>	<b>Material e Métodos.....</b>	<b>48</b>
5.3.1	Animais.....	49
5.3.2	Cirurgia estereotáxica: implante de eletrodos .....	49
5.3.3	Abrasamento Rápido da Amígdala: estimulação elétrica.....	51
5.3.4	Labirinto Aquático de Morris: Teste de memória espacial .....	52
5.3.5	Perfusão, preparação de tecidos e imunoistoquímica .....	53
5.3.6	Análise Comportamental: Crises Límbicas .....	53
5.3.7	Análise EEGráfica .....	54
5.3.8	Análise Estatística .....	54
<b>5.4</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>55</b>
5.4.1	Progressão comportamental e EEGráfica durante o Abrasamento Rápido da Amígdala	55
5.4.2	Estimulação elétrica não afeta o aprendizado e a memória espacial.....	59
5.4.3	Estimulação elétrica não contribuiu para a neurogênese hipocampal aberrante	62
<b>5.5</b>	<b>Discussão .....</b>	<b>63</b>
<b>5.6</b>	<b>Considerações Finais .....</b>	<b>68</b>

<b>6</b>	<b>CAPÍTULO II: CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO ODOR DO PREDADOR E DA ESTIMULAÇÃO HIPOTALÂMICA, EM DIFERENTES MODELOS EXPERIMENTAIS .....</b>	<b>69</b>
<b>6.1</b>	<b>Introdução .....</b>	<b>70</b>
<b>6.2</b>	<b>Objetivo .....</b>	<b>73</b>
<b>6.3</b>	<b>Material e Métodos.....</b>	<b>74</b>
6.3.1	PROTOCOLO 1. Efeitos comportamentais e neuroendócrino da exposição olfatória ao TMT utilizando o paradigma de medo condicionado ao contexto.....	74
6.3.2	PROTOCOLO 2. Expressão Comportamental Da Entrega Nasal De Nanoemulsão Contendo TMT Em Ratos <i>Wistar-Old</i> .....	80
6.3.3	PROTOCOLO 3. Caracterização comportamental dos efeitos da estimulação hipotalâmica nas respostas defensivas.....	82
<b>6.4</b>	<b>Análise estatística.....</b>	<b>84</b>
<b>6.5</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>85</b>
6.5.1	PROTOCOLO 1. Efeitos comportamentais e neuroendócrino da exposição olfatória ao TMT utilizando o paradigma de medo condicionado ao contexto.....	85
6.5.2	PROTOCOLO 2. Expressão comportamental da entrega nasal de nanoemulsão contendo TMT em ratos <i>Wistar-Old</i> .....	93
6.5.3	PROTOCOLO 3. Estimulação hipotalâmica induziu respostas defensivas .	96
<b>6.6</b>	<b>Discussão .....</b>	<b>100</b>
<b>6.7</b>	<b>Considerações Finais .....</b>	<b>112</b>
<b>7</b>	<b>CAPÍTULO III: CARACTERIZAÇÃO ELETROFISIOLÓGICA DO EFEITO ANTICONVULSIVANTE DA EXPOSIÇÃO AO ODOR DO PREDADOR EM MODELO EXPERIMENTAL DE EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL.....</b>	<b>113</b>
<b>7.1</b>	<b>Introdução .....</b>	<b>114</b>
<b>7.2</b>	<b>Objetivo .....</b>	<b>115</b>
<b>7.3</b>	<b>Material e Métodos.....</b>	<b>116</b>
7.3.1	PROTOCOLO 1: Efeitos EEGráficos da exposição ao TMT, em ratos <i>Wistar-Old</i> , submetidos ao Abrasamento Rápido da Amígdala.....	116
7.3.2	Análise Estatística .....	119
<b>7.4</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>119</b>
7.4.1	PROTOCOLO 1: Análise EEGráfica confirma o efeito supressor do TMT nas crises límbicas	119
<b>7.5</b>	<b>Discussão .....</b>	<b>123</b>

7.6	Considerações Finais .....	128
8	<b>CAPÍTULO IV: EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DO HUF-101, UM POTENTE DERIVADO DO CANABIDIOL, NO ABRASAMENTO RÁPIDO DA AMÍGDALA .....</b>	<b>129</b>
8.1	<b>Introdução .....</b>	<b>130</b>
8.2	<b>Objetivo .....</b>	<b>132</b>
8.3	<b>Materiais e Métodos .....</b>	<b>132</b>
8.3.1	Cirurgia estereotáxica .....	132
8.3.2	Estimulação elétrica: Abrasamento Rápido da Amígdala .....	133
8.3.3	Perfusão e processamento tecidual .....	134
8.3.4	Registro e análise comportamental .....	135
8.4	<b>Resultados .....</b>	<b>136</b>
8.4.1	Confirmação histológica .....	136
8.4.2	<b>HUF-101 REDUZIU A GRAVIDADE DAS CRISES LÍMBICAS APÓS O 21º ESTÍMULO</b>	<b>137</b>
8.4.3	<b>ANÁLISE NEUROETOLÓGICA (SEQUÊNCIA COMPORTAMENTAL) CONFIRMA O EFEITO SUPRESSOR DO HUF-101 NAS CRISES LÍMBICAS .....</b>	<b>139</b>
8.4.4	<b>ANÁLISE EEGRÁFICA CONFIRMA O EFEITO ANTICONVULSIVANTE DO HUF-101</b>	<b>141</b>
8.5	<b>Discussão .....</b>	<b>142</b>
8.6	<b>Considerações Finais .....</b>	<b>150</b>
9	<b>TABELA SUPLEMENTAR .....</b>	<b>151</b>
10	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>152</b>
11	<b>ANEXOS .....</b>	<b>180</b>
	<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>182</b>
	<b>METHODS.....</b>	<b>184</b>
	<b>Ethics Statement .....</b>	<b>184</b>
	<b>Animals .....</b>	<b>184</b>
	<b>Protocol 1: TOL effect on acute audiogenic seizures .....</b>	<b>185</b>
	<b>Protocol 2: TOL effect in Audiogenic Kindling (AK) .....</b>	<b>185</b>
	<b>Olfactory Exposure .....</b>	<b>185</b>
	<b>TOL.....</b>	<b>185</b>
	<b>Acoustic Stimuli .....</b>	<b>186</b>
	<b>Audiogenic Kindling.....</b>	<b>186</b>

<b>Behavioral Analysis .....</b>	<b>186</b>
<b>Statistical Analysis .....</b>	<b>187</b>
<b>2. RESULTS .....</b>	<b>187</b>
<b>Protocol 1: TOL effect on acute audiogenic seizures .....</b>	<b>187</b>
<b>Protocol 2: TOL effect in AK .....</b>	<b>189</b>
<b>3. DISCUSSION.....</b>	<b>191</b>
<b>4. CONCLUSIONS.....</b>	<b>194</b>
<b>5. REFERENCES .....</b>	<b>195</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>209</b>
<b>OBJECTIVE.....</b>	<b>211</b>
<b>EXPERIMENTAL PROCEDURE .....</b>	<b>211</b>
<b>PROTOCOL 1: CHEMICAL CHARACTERIZATION OF TMT AND NEUROETHOLOGICAL EVALUATION OF ITS EFFECTS IN WISTAR RATS ....</b>	<b>212</b>
<b>Chemical Analysis .....</b>	<b>212</b>
<b>Behavioral Analysis .....</b>	<b>213</b>
<b>PROTOCOL 2: NEUROETHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF THE EFFECTS OF TMT IN ACUTE AUDIOGENIC SEIZURES IN WARS.....</b>	<b>214</b>
<b>Olfactory Exposure .....</b>	<b>214</b>
<b>Sound Stimuli.....</b>	<b>214</b>
<b>BEHAVIORAL ANALYSIS.....</b>	<b>215</b>
<b>STATISTICAL ANALYSIS .....</b>	<b>215</b>
<b>RESULTS.....</b>	<b>216</b>
<b>PROTOCOL 1: CHEMICAL CHARACTERIZATION OF TMT AND NEUROETHOLOGICAL EVALUATION OF ITS EFFECTS IN WISTAR RATS ....</b>	<b>216</b>
<b>CHEMICAL ANALYSIS .....</b>	<b>216</b>
<b>BEHAVIORAL ANALYSIS.....</b>	<b>216</b>
<b>PROTOCOL 2: NEUROETHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF THE EFFECTS OF TMT IN ACUTE AUDIOGENIC SEIZURES IN WARS.....</b>	<b>218</b>
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>219</b>
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>222</b>
<b>CONFLICT OF INTERESTS .....</b>	<b>222</b>
<b>FUNDING .....</b>	<b>222</b>
<b>ACKNOWLEDGEMENTS .....</b>	<b>223</b>
<b>REFERENCES .....</b>	<b>223</b>

<b>FIGURE LEGENDS .....</b>	<b>230</b>
<b>AUTHOR'S CONTRIBUTIONS .....</b>	<b>231</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>232</b>
<b>RESULTS.....</b>	<b>234</b>
<b>TMT decreased the severity of limbic seizures .....</b>	<b>235</b>
<b>Behavioral sequences confirm the suppressive effect of TMT in limbic seizures.....</b>	<b>236</b>
<b>TMT decreased the occurrence of first and second afterdischarges .....</b>	<b>239</b>
<b>EEGraphic activity altered with TMT .....</b>	<b>240</b>
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>240</b>
<b>MATERIALS AND METHODS.....</b>	<b>246</b>
<b>Ethics Statement .....</b>	<b>246</b>
<b>Animals .....</b>	<b>246</b>
<b>Stereotaxic surgery .....</b>	<b>246</b>
<b>Experimental procedure .....</b>	<b>247</b>
<b>Electrical stimulation .....</b>	<b>247</b>
<b>Olfactory stimulation .....</b>	<b>248</b>
<b>Behavior analyses .....</b>	<b>248</b>
<b>EEGraphic Analysis .....</b>	<b>249</b>
<b>Statistical Analyses .....</b>	<b>249</b>
<b>ACKNOWLEDGEMENTS .....</b>	<b>250</b>
<b>CONFLICT OF INTEREST .....</b>	<b>250</b>
<b>REFERENCES .....</b>	<b>250</b>
<b>TABLES .....</b>	<b>257</b>
<b>12 ANOTAÇÕES.....</b>	<b>259</b>





---

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 EPILEPSIAS

Epilepsias são caracterizadas como uma doença neurológica crônica associada à predisposição persistente a crises espontâneas (com a ocorrência de uma das seguintes condições: (1) pelo menos duas crises não provocadas (ou reflexas) ocorrendo com intervalo > 24 horas (h); (2) uma crise não provocada (ou reflexa) com probabilidade ( $\geq 60\%$ ) da ocorrência de outra crise similar nos próximos 10 anos; ou (3) no caso de diagnóstico de síndrome epiléptica; para revisão completa definição ver FISHER et al., 2014), e pelas consequências neurobiológicas, cognitivas, sociais e psicológicas desta condição (FISHER et al., 2005). Enquanto as crises epiléticas são eventos sintomáticos espontâneos, não necessariamente comportamentais, causadas pela atividade excessiva e/ou sincrônica anormal de substratos neurais (FISHER et al., 2005; MCNAMARA, 1994, 1999), normalmente auto limitadas (ENGEL, 1995).

É estimado que aproximadamente 1% da população mundial é afetada por essa doença (ENGEL J, BIRBECK GL, DIOP AG, JAIN S, 2005; MCNAMARA, 1999; WHO, 2017), sendo a Epilepsia do Lobo Temporal (ELT), a síndrome epiléptica mais comum em adultos (BERTRAM, 2007; ENGEL J, BIRBECK GL, DIOP AG, JAIN S, 2005; H. GASTAUT, J. L. GASTAUT; SANCHEZ, 1975; JASEJA, 2008, 2010; WIEBE, 2000). De fato, apesar dos importantes avanços nas abordagens farmacológicas das últimas décadas, cerca de 20-40% dos pacientes com ELT não respondem aos tratamentos farmacológicos atuais (LÖSCHER et al., 2013; NEVALAINEN et al., 2014; PICOT et al., 2008; SIMONATO et al., 2014; WHO, 2010; 2017). Adicionalmente, embora a neurocirurgia ablativa seja uma importante opção para esses pacientes com crises refratárias, os critérios necessários e as sequelas pós-cirúrgicas nem sempre legitimam todos os candidatos (ENGEL et al., 2003; RYVLIN; RHEIMS, 2008; WIEBE et al., 2001). Assim, existe uma crescente preocupação pela identificação de novos agentes terapêuticos no tratamento das Epilepsias (LÖSCHER, 2017). Claramente e por óbvias razões, o uso de modelos animais de crise e para as Epilepsias, têm desempenhado um papel fundamental na descoberta e desenvolvimento de terapias mais eficazes, para pacientes com Epilepsias fármaco resistentes (BIALER; WHITE, 2010; LÖSCHER, 2017).

## 1.2 CONTEXTUALIZAÇÃO HISTÓRICA DAS EPILEPSIAS

O termo Epilepsias foi utilizado pela primeira vez por Avicena (980-1037) no século XI, originada do verbo grego *epilambanein*, que significa ser possuído, dominado ou invadido (YACUBIAN, 2000). Apesar da palavra Epilepsias só ter sido utilizada no século XI, registros da antiguidade, em pedras babilônicas mostram relatos de suas manifestações já nos anos 2000 a.C.: “...se aquando à sua possessão, enquanto ele se encontra sentado, o seu olho esquerdo se mover para esse lado, o lábio franzir, saliva escorrer da sua boca, e a sua mão, perna e tronco do lado esquerdo se contraírem como uma ovelha recentemente abatida, trata-se de *miqtu*...” (EADIE, 1995; LONGRIGG, 2000; WILSON; REYNOLDS, 1990), enquanto na Bíblia descreve a parábola de um jovem que apresentava crises epilépticas generalizadas (“...espuma, range os dentes e fica endurecido...”) e foi levado a Jesus em busca de cura (“...espírito mudo e surdo, eu te ordeno: sai deste menino e não tornes a entrar nele...”) (OWCZAREK; JĘDRZEJCZAK, 2013). A história do “menino lunático” também aparece no evangelho de Mateus (17:14-18) e de Lucas (9:38-42). Além disso, a obra "Transfiguração de Rafael" do pintor Rafael Sanzio (1483-1520), retrata um menino com postura semelhante àquela observada durante as crises epilépticas, incluindo boca semiaberta e membros superiores estendidos.

Historicamente, as Epilepsias têm sido erroneamente conceituadas associadas aos estereótipos negativos e procedimentos exóticos, como demonstrada pela curiosa técnica de trepanação craniana, realizada para libertação dos maus espíritos, descrita desde o período neolítico (GUINTO; GUINTO-NISHIMURA, 2014). Enquanto no Egito, os hieróglifos simbolizavam as crises com pessoas mortas ou com intrusão demoníaca. Já os Hebreus, segundo livros de Moisés, sugerem o caráter hereditário desta doença, com proibição do casamento entre pessoas com Epilepsias. Na mesma época, em determinadas regiões, as Epilepsias também eram referidas como doença impura e contagiosa, tal repúdio era comumente expressado pelo comportamento de cuspir (YACUBIAN, 2000). Já na Grécia antiga, as Epilepsias eram atribuídas à fúria direta dos deuses e não por intermédio de espíritos ou demônios (LONGRIGG, 2000).

Hipócrates de Cós (séc. V-IV a.C., o Pai da Medicina) foi o primeiro pensador da antiguidade a introduzir o conceito neurofisiológico das Epilepsias, contrariando a visão de *doença sagrada* (incluída no *Corpus Hipocraticum*, na obra *Sobre a Doença Sagrada* [REKTOR et al., 2013; TEMKIN O., 1994]), descrevendo as Epilepsias como uma doença cerebral com fleuma em quantidades excessivas (TEMKIN O., 1994), que deveria ser tratada com dietas e drogas, e não com rituais religiosos (REKTOR et al., 2013). Mas somente no final

do século 19, John Hughlings Jackson (conhecido como pai da Epilepsia) descreveu biologicamente as Epilepsias como “uma ocasional, excessiva e desordenada descarga do tecido neural” (HUGHLINGS-JACKSON, 1888; REKTOR et al., 2013). Jackson também foi o primeiro a propor que a manifestação clínica da crise revela a localização cortical do foco epiléptico (HUGHLINGS-JACKSON, 1888; SHORVON, 2014), podendo propagar para diferentes áreas cerebrais (SHORVON, 2014).

### **1.3 MODELOS ANIMAIS PARA CRISES E EPILEPSIAS: ABRASAMENTO RÁPIDO DA AMÍGDALA, *KINDLING* AUDIOGÊNICO E *STATUS EPILEPTICUS***

Crises límbicas induzidas por estimulação elétrica repetida, causam mudança no padrão comportamental e eletrencefalográfico (EEGráfico), com o aumento da frequência, gravidade e duração das crises, somado à esperada ativação de outras estruturas límbicas (diferente da estimulada), com o posterior recrutamento de áreas do tronco cerebral, um fenômeno chamado abrasamento ou *Kindling* (GODDARD, 1967; GODDARD; MCINTYRE; LEECH, 1969). O protocolo de Abrasamento Rápido desenvolvido inicialmente por Lothman e colaboradores (1985), em contraste com o Abrasamento clássico ou convencional, causa crises generalizadas (estado abrasado ou *kindled*) em horas, mas mantém as principais características do Abrasamento (FISHER, 1989; FORESTI et al., 2008; LÖSCHER; BRANDT, 2010; LOTHMAN et al., 1985; MCNAMARA et al., 1980; NOEBELS JL, AVOLI M, ROGAWSKI MA, OLSEN RW, 2012). De fato, este modelo destaca-se por favorecer a identificação das variáveis consideradas essenciais para a ocorrência das crises, como possíveis alvos para intervenções terapêuticas (GODDARD, 1983; KANDRATAVICIUS et al., 2014; LÖSCHER; BRANDT, 2010; SAYIN et al., 2003), também oferece a oportunidade para estudar a progressão das diversas alterações neurobiológicas subjacentes a epileptogênese, com manipulação específica de circuitos (LÖSCHER; BRANDT, 2010), e ainda, permite estudar os mecanismos plásticos envolvidos por exemplo na memória (FISHER, 1989; GODDARD, 1967; GODDARD; MCINTYRE; LEECH, 1969) e emoção/ansiedade, particularmente por incluir componentes do sistema límbico, como Amígdala e Hipocampo (ADAMEC; MORGAN, 1994; ADAMEC; SHALLOW, 2000; MERCERÓN-MARTÍNEZ et al., 2016; UEMATSU et al., 2012).

A linhagem *Wistar Audiogenic Rat* (WAR) foi desenvolvida a partir do cruzamento endogâmico e da seleção genética para o fenótipo de crises tônico-clônicas generalizadas, induzidas por estimulação sonora de alta intensidade (110 decibéis [dB]) e frequência (5000-

20000 Hertz [Hz]) (DORETTO et al., 2003; GARCIA-CAIRASCO et al., 2017), o que fundamenta o nome “crises audiogênicas”. É uma das cinco linhagens de roedores geneticamente predispostas às crises audiogênicas no mundo e única no Brasil, com presença ora de crises agudas ora crônicas (dependendo do protocolo), com importante relevância científica internacional (para revisão recente ver GARCIA-CAIRASCO et al., 2017), por apresentar maior excitabilidade neuronal, alta predisposição às crises epiléticas diante de um segundo *hit*, além de alterações comportamentais associadas às Epilepsias, dentre elas (e somados às anteriormente citadas): comportamento tipo ansioso (GARCIA-CAIRASCO et al., 1998), hiperatividade do eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA; UMEOKA et al., 2011a), comportamento tipo depressivo (CASTRO et al., 2017), *déficit* cognitivo (com perspectivas futuras e concretas da sua validação como modelo para o estudo da Doença de Alzheimer; VILELLA et al., 2016), além de alterações cardiovasculares (FAZAN et al., 2011, 2015) e respiratórias (TOTOLA et al., 2017), que representam potenciais fatores de risco para Morte Súbita nas Epilepsias (SUDEP). Quando somadas, todas estas alterações reforçam a existência de diferentes comorbidades nas Epilepsias, sobretudo neuropsiquiátricas (para maiores detalhes ver GARCIA-CAIRASCO et al., 2017).

De fato, se as crises audiogênicas agudas são originadas no tronco cerebral (DORETTO et al., 2003; DUTRA MORAES; GALVIS-ALONSO; GARCIA-CAIRASCO, 2000; GARCIA-CAIRASCO; TERRA; DORETTO, 1993; TERRA; GARCIA-CAIRASCO, 1992, 1994; TSUTSUI et al., 1992) a repetição delas gera um quadro denominado por Marescaux e colaboradores (1987) de *Kindling* audiogênico, que foi replicado em *Genetically Epilepsy-Prone Rat (GEPR)* por Naritoku e colaboradores (1992) e nos *WARs* por Dutra Moraes e colaboradores (2000), com detecção de alterações comportamentais, EEGráficas e celulares (GALVIS-ALONSO; CORTES DE OLIVEIRA; GARCIA-CAIRASCO, 2004; GARCIA-CAIRASCO et al., 1996; ROMCY-PEREIRA; GARCIA-CAIRASCO, 2003; ROSSETTI et al., 2006).

Além do abrasamento, seja com animais *WARs* ou outros protocolos, destaca-se o uso de modelos não genéticos no estudo das Epilepsias, com fundamental relevância, por permitir contrastar os fenômenos comuns aos vários modelos, que dependem para sua expressão, de redes neurais específicas, em particular o *Status Epilepticus*, caracterizado pela presença ou expressão de crises robustas e duradoras (por no mínimo 5 minutos [min] em humanos ou 30 min em animais [CASTRO et al., 2011; FISHER, 1989; TURSKI et al., 1983]), comumente induzidas com pilocarpina, um agonista muscarínico (CASTRO et al., 2011; CAVALHEIRO, 1995; DO VAL-DA SILVA et al., 2017; FISHER, 1989; FURTADO et al., 2011, 2002;

---

KANDRATAVICIUS et al., 2014; TURSKI et al., 1983), ácido caínico (BEN-ARI et al., 1978; FISHER, 1989; KANDRATAVICIUS et al., 2014) ou estimulação elétrica (FISHER, 1989; KANDRATAVICIUS et al., 2014; TILELLI et al., 2005). Neste modelo, testes com drogas anticonvulsivantes ou antiepilépticas são frequentemente recomendados e realizados, principalmente por permitir avaliar seus efeitos nas crises recorrentes espontâneas. Para uma revisão comparativa entre *Status Epilepticus* por pilocarpina e ácido caínico veja Leite, Garcia-Cairasco & Cavalheiro (2002).

De fato, não existe um modelo experimental que mimetize completamente o quadro de Epilepsia clínica, logo entender as semelhanças e diferenças neurofisiológicas e comportamentais é importante para prever a melhor resposta entre o modelo e o equivalente humano (KANDRATAVICIUS *et al.*, 2014). Assim, o uso apropriado do modelo animal é essencial, interferindo obviamente na escolha, diversos fatores, dentre eles: (1) objetivo do estudo, (2) conveniência e (3) familiaridade com o modelo. Em geral, tais modelos podem diferir *per se*, quanto ao número de estímulos indutores de crises epiléticas (agudo *versus* crônico); além da preparação do tecido (podendo ser *in vivo*, *in vitro* ou *in sílico*), associado aos métodos utilizados para a indução de crises epiléticas, descritos brevemente acima (FISHER, 1989).



## 2 JUSTIFICATIVA

A busca por novas opções terapêuticas é extremamente necessária, diante do cenário complexo e dinâmico das Epilepsias, particularmente porque 20-40% dos pacientes com ELT não respondem aos tratamentos farmacológicos atuais (LÖSCHER et al., 2013; NEVALAINEN et al., 2014; PICOT et al., 2008; SIMONATO et al., 2014; WHO, 2010; 2017). Logo existe a necessidade do desenvolvimento de novos tratamentos alternativos e/ou complementares aos convencionais, capazes de suprimir ou bloquear as crises epiléticas e ainda, estudos básicos que consigam identificar possíveis alterações plásticas (compreendidas durante o período de epileptogênese) fundamentais para o agravamento das crises (LÖSCHER et al., 2013).

De fato, o Abrasamento Rápido da Amígdala (ARA) é um importante modelo animal para estudar os vários processos epileptogênicos subjacentes às crises, particularmente por incluir componentes do sistema límbico, como a Amígdala e o Hipocampo, criticamente implicados nas Epilepsias e em diferentes comorbidades, em especial às neuropsiquiátricas, somado ao fato de possibilitar escolher circuitos neurais específicos para manipulação, dependendo da localização do (s) eletrodo (s) implantados, dentre outros descritos por Bertram (2007). Assim, pretendemos neste estudo também caracterizar os efeitos comportamentais, eletrofisiológicos e celulares do ARA, particularmente na memória, que embora não seja o principal objetivo deste estudo, contribuirá criticamente para o natural subsequente estudo de condicionamento ao contexto (veja Capítulo 2) . Em particular, desejamos entender melhor o papel da neurogênese hipocampal aberrante nas Epilepsias e sua possível associação com déficits cognitivos (CHO et al., 2015).

Outra questão, altamente controversa e relevante para tal estudo, é avaliar se o caimomônio *2,5-Dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline* (TMT) suporta a resposta de medo condicionado ao contexto (FORTES-MARCO et al., 2015; ROSEN, 2004; ROSEN et al., 2008; ROSEN; ASOK; CHAKRABORTY, 2015). Nesse sentido, investigamos o significado biológico do TMT, que poderia ser comparado à exposição direta ao gato vivo, utilizando (para o último) um modelo proposto por Ribeiro-Barbosa e colaboradores (2005), com consistentes efeitos de medo condicionado ao contexto (BINDI; BALDO; CANTERAS, 2018; CEZARIO et al., 2008; MARTINEZ et al., 2011; RIBEIRO-BARBOSA et al., 2005). Além disso, avaliamos os efeitos do TMT (incluindo nanoemulsão) nas respostas defensivas, sob uma variedade de condições, incluindo: protocolo, via de administração e configuração da câmara

teste, que segundo a literatura, ambientes complexos tendem a mimetizar meios mais naturalísticos, podendo produzir um condicionamento mais robusto (ROSEN, 2004; ROSEN et al., 2008; ROSEN; ASOK; CHAKRABORTY, 2015). Adicionalmente, iniciamos a investigação da estimulação elétrica hipotalâmica nas respostas defensivas, através da observação sistemática de todos os comportamentos expressos pelos animais.

A outra parte deste estudo baseia-se em evidências clínicas e experimentais que demonstram que a estimulação olfatória pode influenciar o processo de crise, inibindo (BETTS, 2003; CRUZ et al., 2003; DELFINO-PEREIRA et al., 2018a; EBERT; LÖSCHER, 2000b; EFRON, 1956, 1957, JASEJA, 2008, 2010; LUNARDI et al., 2016; VALENTINE; FREMIT; TESKEY, 2005) ou em outros casos induzindo crises (BOZORG; BENBADIS, 2009; BURKHARD et al., 1999; HUGHES; ANDY, 1979; ILIK; PAZARLI, 2015; LUNARDI et al., 2016; NGUYEN; RYBA, 2012a; RESTREPO; HELLIER; SALCEDO, 2013; SKALLI; SOULAYMANI BENCHEIKH, 2011; SPINELLA, 2001; STAFSTROM, 2007; T. TAKAHASHI, 1975). Nesse sentido, experimentos recentes do nosso grupo confirmaram o efeito anticonvulsivante do tolueno, realizados previamente por Ebert & Löscher (2000, com o modelo de Abrasamento convencional), nas crises audiogênicas agudas e crônicas em animais da linhagem WAR (DELFINO-PEREIRA et al., 2018; artigo anexado), e ainda dados inéditos comportamentais indicaram que o TMT interferiu na expressão das crises epilépticas (DELFINO-PEREIRA et al., 2014, 2016; GARCIA-CAIRASCO et al., 2016, 2017; artigo em preparação anexado).

A sequência do Projeto traz agora, por analogia ao relato de Efron (1956), e aos dados previamente coletados pelo nosso grupo (brevemente citados), associados ao consórcio multinacional *Epilepsies with External Modification of Ictogenesis (EpExMo)*, a caracterização EEGráfica dos efeitos anticonvulsivantes da exposição ao TMT, no ARA. De fato, a nossa proposta sugere que o potente circuito associado com o medo e ativado pelo TMT, estaria competindo ou antagonizando os circuitos ou redes altamente sincronizadas das crises epilépticas. Um natural e subsequente passo, seria utilizar o paradigma de medo condicionado ao contexto, após exposição ao gato na modulação das crises, apenas por evocação da memória contextual aversiva, baseando-se no clássico estudo de Efron (1957). A hipótese para tal efeito (similarmente ao TMT), está apoiada no potencial papel do circuito de defesa hipotalâmico medial (CANTERAS; PAVESI; CAROBREZ, 2015; GROSS; CANTERAS, 2012), como *switch* para crises límbicas.

E finalmente e não menos importante, o Canabidiol (CBD) tem despertado grande interesse pelos importantes efeitos terapêuticos, em um grande número de doenças



neuroológicas, incluindo as epilepsias (CILIO; THIELE; DEVINSKY, 2014; DO VAL-DA SILVA et al., 2017; GOBIRA et al., 2015; HILL et al., 2013; HUSSAIN et al., 2015; JONES et al., 2010; MORTATI; DWORETZKY; DEVINSKY, 2007; PORTER; JACOBSON, 2013; SZAFLARSKI et al., 2017; VILELA et al., 2017). Baseados nestes dados, o nosso **Laboratório de Neurofisiologia e Neurootologia Experimental (LNNE)** após convite do **Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina (INCT-TM)**, tem a tarefa de verificar o potencial efeito anticonvulsivante e eventualmente neuroprotetor da administração aguda do 4'-Fluorocanabidiol (HUF-101), um análogo do CBD, utilizando diferentes modelos animais para as Epilepsias, dentre eles o ARA, um modelo para avaliação de drogas anticonvulsivantes (BIALER; WHITE, 2010; LÖSCHER, 2002, 2011, 2016; LOSCHER; BRANDT, 2010).

Trata-se, portanto de um estudo original, complexo e relevante, com questões desafiadoras, abordando temas controversos e igualmente importantes, que somados poderão acrescentar aos estudos anteriormente realizados pelo nosso grupo, um natural e progressivo conhecimento, particularmente da estimulação sensorial periférica nas crises epiléticas (ver em especial Capítulo 3). De fato, nossos achados sobre estimulação olfatória e do HUF-101 certamente se somarão à literatura existente com potencial impacto translacional, que a longo prazo, poderão ser incorporados como alternativas adicionais e complementares para o tratamento das Epilepsias. Além disso, usaremos ferramentas validadas em diferentes níveis de complexidade (comportamentais, eletrofisiológicas, celulares e/ou endócrina), que contribuirão para aos estudos existentes sobre a neurobiologia do aprendizado/memória, e do medo, e naturalmente das Epilepsias e suas comorbidades neuropsiquiátricas, aumentando o conhecimento nessas áreas.

---

### **3 HIPÓTESES**

1. O ARA induzirá alterações no aprendizado e memória, associado à presença de neurogênese hipocampal aberrante.
2. O TMT em uma câmara teste complexa (dois compartimentos) deverá suportar o condicionamento contextual, com a expressão de comportamentos defensivos. Além disso, ratos expostos ao TMT exibirão comportamentos tipo ansiosos e redução na atividade locomotora. Tais comportamentos deverão ser consistentes com o aumento do nível de Corticosterona, e potencial aumento do peso das Glândulas Adrenais. Além disso, a entrega nasal de nanoemulsão contendo TMT deverá otimizar as respostas semelhantes ao medo inato e condicionado, em relação ao mesmo composto líquido em uma câmara teste saturada. E finalmente, a estimulação elétrica hipotalâmica induzirá importantes comportamentos de defesa.
3. A exposição olfatória ao TMT deverá induzir um aumento do limiar para crises límbicas em animais submetidos ao ARA. Uma natural consequência deste fenômeno será a supressão ou inibição dos efeitos EEGráficos característicos deste modelo, similar aos achados anteriores do nosso grupo com tolueno (DELFINO-PEREIRA et al., 2018; artigo em preparação anexado).
4. O derivado fluorado do CBD, o HUF-101 terá efeito anticonvulsivante e neuroprotetor no ARA, um modelo experimental de ELT.

---

## 4 OBJETIVOS

- I. Investigar em modelo animal as Epilepsias e sua repercussão na função cognitiva (aprendizado e memória), associada a potencial neurogênese hipocampal aberrante.
- II. Avaliar os efeitos do TMT (incluindo nanoemulsão) e da estimulação elétrica hipotalâmica, nas respostas defensivas inatas ou condicionadas, sob uma variedade de condições.
- III. Verificar os efeitos EEGráficos da exposição ao TMT, nas crises límbicas induzidas pelo ARA.
- IV. Avaliar os efeitos da administração aguda de HUF-101, um potente derivado fluorado sintético do CBD, no ARA, um modelo experimental de ELT.



---

**5 CAPÍTULO I: EPILEPSIAS E SUAS REPERCUSSÕES NA  
FUNÇÃO COGNITIVA E NO PROCESSO DE  
NEUROGÊNESE HIPOCAMPAL ABERRANTE**

---

## 5.1 INTRODUÇÃO

Como citado, as Epilepsias são consideradas uma doença cerebral hiperexcitável (FISHER et al., 2014), altamente interativa (sincronia neuronal) em extensas redes neurais (ENGLLOT; BLUMENFELD, 2009; GARCIA-CAIRASCO et al., 2017), associadas a duradoras crises recorrentes (para maiores detalhes, ver FISHER et al., 2014), e por suas consequências neurobiológicas, cognitivas, psicológicas e sociais (FISHER et al., 2005). Tradicionalmente, as Epilepsias são categorizadas como focais ou generalizadas (FISHER et al., 2017), envolvendo estruturas cerebrais distintas com diferentes entidades clínicas, cada uma com seus fenótipos, mecanismos de origem e prognósticos (KROOK-MAGNUSON et al., 2013; para revisão completa ver FISHER et al., 2017). A ELT é muitas vezes refratária ao tratamento farmacológico (BUI et al., 2018; KROOK-MAGNUSON et al., 2013). Uma possível razão para o fracasso dos medicamentos antiepilépticos em deter a doença (apenas controla as crises), pode ser a compreensão restrita dos mecanismos básicos subjacentes ao desenvolvimento das Epilepsias ou epileptogênese (CHO et al., 2015; PITKÄNEN et al., 2015). Em um contexto reducionista, a epileptogênese é o processo crônico envolvido nas alterações plásticas moleculares e celulares, particularmente durante o período entre o insulto epileptogênico e a presença da primeira crise epiléptica, mas atualmente também envolve a progressão da condição epiléptica ou modificação da doença (PITKÄNEN, 2010; PITKÄNEN et al., 2015; PITKÄNEN; LUKASIUK, 2009).

A neurogênese hipocampal normalmente ocorre durante toda a vida, em uma ampla variedade de espécies de mamíferos (CHO et al., 2015; DANZER, 2018), enquanto a morte neuronal está frequentemente relacionada ao desenvolvimento do sistema nervoso (e lesão), ou seja, ambas são respostas fisiológicas, necessárias e benéficas (CHO et al., 2015). Em contraste, as crises epilépticas causam alterações fisiopatológicas, que incluem além das citadas, outras listadas na Tabela 1. A neurogênese hipocampal aberrante promovida pela ELT pode contribuir para a presença de comorbidades comportamentais (comportamento tipo ansioso) e cognitivas (*déficits* no aprendizado e memória espacial [SHETTY, 2014]), essa última classicamente avaliada em roedores, usando o Labirinto Aquático de Morris (LAM, MORRIS, 1984; MORRIS et al., 1982). Botterill e colaboradores (2015) mostraram que alguns desses neurônios recém-nascidos podem migrar ectopicamente para o hilus e desenvolver dendritos basais hilares em células granulares do giro dentado. Estudos mostraram que a inibição (bloqueio) da neurogênese hipocampal adulta antes (CHO et al., 2015) e/ou após crises agudas (JUNG et al., 2004, 2006), reduziu a frequência das crises crônicas. Enquanto Botterill e colaboradores

---

(2015) também sugeriram que o Abrasamento (*kindling*) límbico aumentou a neurogênese hipocampal em associação com a alteração da memória dependente do hipocampo e aumento da proteína BDNF. Interessantemente, Fournier e colaboradores (2013) demonstraram que o Abrasamento da Amígdala, em um protocolo designado como *overkindling*, afetou o recrutamento de novos neurônios em tarefa dependente do Hipocampo (medo condicionado). Em contraste, Pekcec e colaboradores (2011) relataram que a modulação da neurogênese adulta não altera a progressão do Abrasamento da Amígdala. No entanto, o papel desta alteração plástica na Epilepsia permanece incerto.

Como mencionado, o ARA é uma alternativa rápida e promissora para o teste de drogas anticonvulsivantes ou para estudar mecanismos de plasticidade ou memória, com excelente validade preditiva (LÖSCHER, 2002). Adicionalmente, este modelo experimental parece induzir alterações plásticas similares às aquelas observadas no tecido cerebral epiléptico, particularmente a neurogênese hipocampal aberrante (além das citadas na Tabela 1, BENGZON et al., 1997; NAKAGAWA et al., 2000; PARENT et al., 1998; SAYIN et al., 2003; SCOTT et al., 1998; SHERAFAT et al., 2013). Assim, o ARA parece ser um importante modelo experimental para estudar os vários processos epileptogênicos subjacentes às alterações comportamentais, particularmente por incluir componentes do sistema límbico, como a Amígdala e o Hipocampo, implicados criticamente na memória (MERCERÓN-MARTÍNEZ et al., 2016; UEMATSU et al., 2012).

**Tabela 1.** Alterações celulares e moleculares presentes no tecido cerebral de animais submetidos ao modelo de Abrasamento Rápido.

(SMITH et al., 2005)	O modelo de ARA por estimulação elétrica induziu aumento na taxa de neurogênese hipocampal, mas não provocou morte neuronal.
(SMITH et al., 2006)	O ARA por estimulação elétrica aumentou o número de novos neurônios que assumiram o fenótipo neuronal e incorporaram nos circuitos envolvidos nas crises.
(RAEDT et al., 2007)	A radiação antes do Abrasamento Rápido do Hipocampo reduz significativamente a neurogênese induzida por crises e aumenta a excitabilidade durante a aquisição do abrasamento.
(KUMAR et al., 2011)	A exposição ao estresse pós-natal precoce resulta em aumento da perda de células hipocampais em CA3 e na neurogênese após o Abrasamento Rápido da Amígdala.
(EBERT; LÖSCHER, 1995)	Ratos submetidos ao ARA tiveram um aumento do brotamento das fibras musgosas no giro dentado.
(MORALES et al., 2014)	O protocolo de ARA induziu hiperexcitabilidade neuronal e astrogliose na ausência de hiperplasia e perda neuronal.
(FOURNIER et al., 2010)	O Abrasamento de curta duração (30 estimulações elétricas) aumentou o número de neurônios imaturos na zona subgranular do giro dentado com menor complexidade dendrítica em comparação com o <i>overkindling</i> (99 estimulações elétricas).
(FORESTI et al., 2008)	O ARA não causou o surgimento de fibras musgosas (Neo-Timm) na camada supragranular do giro dentado e morte neuronal por necrose no hipocampo, observado pela histoquímica com Fluoro-Jade B.
(BENGZON et al., 1997)	Abrasamento rápido causou morte neural por apoptose de específicas camadas de células granulares e de neurônios hilares (região polimórfica) bilateralmente no giro dentado, além de proliferação de neurônios do giro dentado.
	(ARA) Abrasamento Rápido da Amígdala.

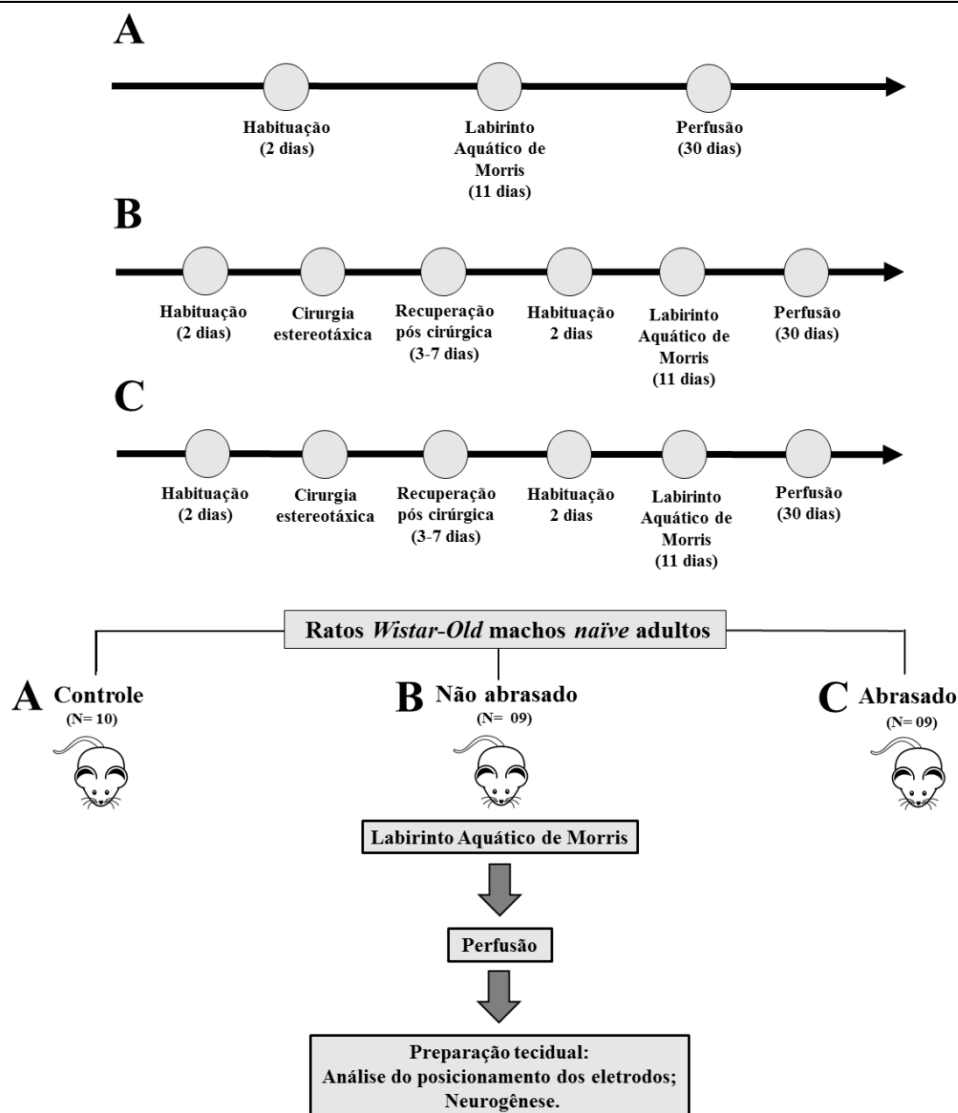
## 5.2 OBJETIVO

Investigar em modelo animal as Epilepsias e sua repercussão na função cognitiva (aprendizado e memória), associada a potencial neurogênese hipocampal aberrante.

## 5.3 MATERIAL E MÉTODOS

Esse protocolo experimental (resumido na Figura 1) foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA, número do protocolo: 133/2015) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), da Universidade de São Paulo (USP) e foram desenhados segundo regras para pesquisa animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).





**Figura 1.** Delineamento experimental: Epilepsias e suas repercussões na função cognitiva (aprendizagem e memória) associada ao processo de potencial neurogênese hipocampal aberrante.

### 5.3.1 ANIMAIS

Ratos *Wistar-Old* machos naïve (280-300 gramas [g]) foram mantidos em gaiolas Plexiglas individuais, com ração e água *ad libitum*, ciclo de 12 h (luzes acesas às 7:00 da manhã) e temperatura controlada ( $23 \pm 2$  °C), no Biotério do Departamento de Fisiologia da FMRP - USP.

### 5.3.2 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA: IMPLANTE DE ELETRODOS

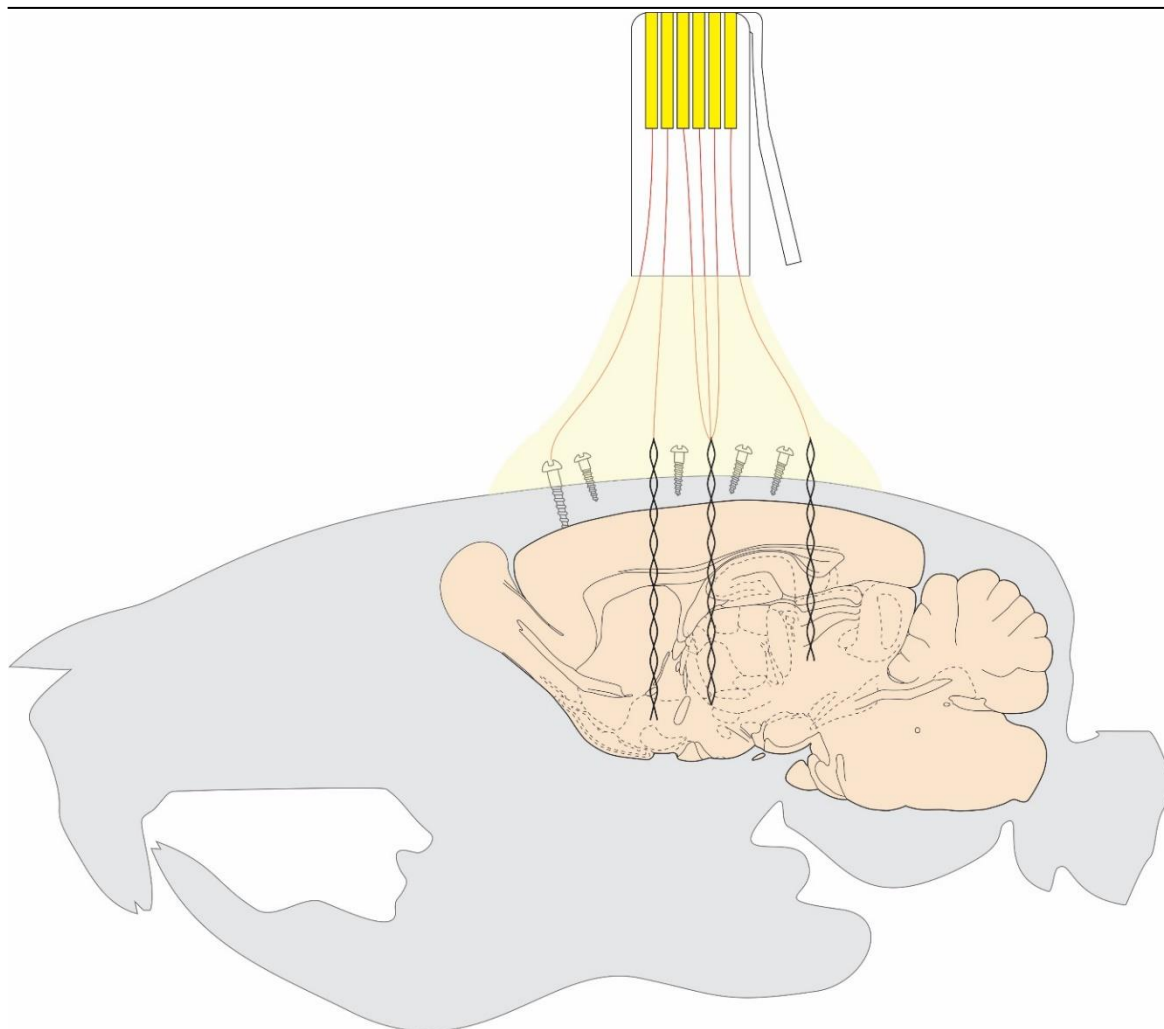
Os animais foram cronicamente implantados com eletrodos bipolares (revestidos de teflon; A-M System, Inc.; diâmetro= 400  $\mu$ m) profundos no Córtex Piriforme (AP: bregma; ML: 5,0 mm; DV: -8,2 mm) e na Formação Hipocampal (AP: -6,3 mm; ML: 4,5 mm; DV: -4,5

---

mm), exceto o eletrodo tripolar no Complexo Amigdalóide (AP: -2,3 mm; ML: 4,7 mm; DV: -7,1 mm), todos no hemisfério esquerdo, seguindo as coordenadas do Paxinos & Watson (2007). Adicionalmente, foram implantados quatro parafusos de aço inoxidável ( $\varnothing$  1.5 mm; *Fine Science Tools, Heidelberg, Germany*) sem coordenadas estereotáxicas definidas que serviram para a fixação do capacete (Figura 2) e um parafuso de aço inoxidável ( $\varnothing$  1.5 mm; *Fine Science Tools, Heidelberg, Germany*), soldado a um pequeno fio para aterramento do animal ao sistema.

Durante a cirurgia, os animais foram anestesiados com Thiopentax – tiopental sódico 4% (30 mg/kg, ip; Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA, Itapira, SP, Brasil) e doses de manutenção (0,1 mL) utilizando a combinação dos anestésicos Ketamina (0,06 mg/kg, ip; Agener União Saúde Animal, Embu-Guaçu, SP, Brasil) e Xilazina (0,04 mg/kg, intraperitoneal [i.p.]; Bayer Saúde Animal, São Paulo, SP, Brasil). O tratamento profilático também foi realizado com uma dose única intramuscular de antibiótico (0,5 mL, i.p., Fort Dodge Saúde Animal LTDA, São Paulo, SP, Brasil). Além disso, os animais foram anestesiados localmente com cloridrato de lidocaína 2% contendo epinefrina na combinação de 1:100.000 (Astra - Naucalpan, México).

Os animais permaneceram em recuperação por um período de 3 a 7 dias.



**Figura 2.** Desenho esquemático do rato implantado com os eletrodos após a cirurgia estereotáxica. De fato, esta Figura é meramente ilustrativa, considerando as coordenadas estereotáxicas e os planos sagitais diferentes, para as áreas estudadas.

### 5.3.3 ABRASAMENTO RÁPIDO DA AMÍGDALA: ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA

O limiar para crises foi determinado por estimulação elétrica da amígdala com corrente inicial de  $100 \mu\text{A}$ , aumentada em intervalos de  $100 \mu\text{A}$ , a cada 5 min, até a presença da primeira pós descarga no eletrencefalograma (EEG). O ARA consistiu em 10 estímulos elétricos diários, durante dois dias consecutivos, com 30 min de intervalo entre os estímulos. Para tanto os ratos foram colocados na gaiola de Faraday e permaneceram nesta câmara durante todo o protocolo. Os parâmetros utilizados para o estímulo foram: trens de ondas quadradas bifásicas, com intensidade constante de  $500 \mu\text{A}$ , pulsos de 60 Hz durante 1 milissegundo (ms) e 10 segundos (s) de estimulação (EBERT; LÖSCHER, 1995; FORESTI et al., 2008). Enquanto, o sinal EEGráfico foi amplificado (2000 vezes ganho), filtrado (passa alta de 0,1 Hz e passa baixa de 1000 Hz) e amostrado a 2000 Hz.

---

### 5.3.4 LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS: TESTE DE MEMÓRIA ESPACIAL

O LAM (MORRIS, 1989) viabilizou a avaliação dos processos de aprendizagem (durante 24 primeiras tentativas) e memória espacial dos animais (verificada na 25ª tentativa e 7 dias após, na 26ª tentativa) após o ARA, em colaboração com o Laboratório coordenado pelo **Prof. Dr. Sebastião de Sousa Almeida**, do **Departamento de Psicologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP**.

O labirinto aquático consistiu em um tanque circular de fibra de vidro pintado em preto, com 150 centímetros (cm) de diâmetro e 39 cm de altura, preenchido com água a uma temperatura controlada de  $25 \pm 1$  °C. O tanque foi dividido em quatro quadrantes imaginários numerados em sentido horário (Q1-Q4). Uma plataforma circular, também na cor preta, com 12 cm de diâmetro e 25 cm de altura foi colocada no centro do quadrante imaginário 1 (Q1, submersa a 1,5 cm).

Em todos os testes, cada rato foi individualmente colocado na água, posicionado de costas para o centro do tanque, em pontos de partida diferentes determinados aleatoriamente em proporções iguais (exceto em Q1). Nesse momento foi permitido ao rato nadar em busca da plataforma por um período de 60 s. O teste foi encerrado quando o rato atingia a plataforma, permanecendo sobre ela durante 30 s, caso o rato não encontrasse a plataforma durante 60 s, o teste era finalizado (abortado), mas o rato era colocado pelo pesquisador na plataforma e deveria permanecer pelos mesmos 30 s. Em seguida, os ratos foram imediatamente recolocados na piscina, até completar os 6 testes ao dia, durante 4 dias.

Na 25ª tentativa, a plataforma foi removida e o animal nadou por um período de 60 s (*Probe Trial*). A *Probe Trial* (25ª tentativa) consistiu em uma tentativa de extinção que possibilitou analisar a efetivação do aprendizado da tarefa, pela precisão da navegação do animal em busca da plataforma. Após 7 dias, cada animal foi novamente testado em uma única tentativa (26ª), colocado no quadrante diagonal da plataforma (Q3) e teve 180 s para encontrar a plataforma submersa, que estava na mesma localização em que permaneceu durante todo o experimento (1ª-24ª tentativa). Essa tentativa permitiu avaliar os processos de retenção, consolidação e evocação da memória.

Os parâmetros avaliados no LAM incluem: latência de fuga, distância navegada, velocidade de natação e ocupação em cada quadrante, utilizando para análise o *software Automatic Tracer Ethovision* (Noldus).

### 5.3.5 PERFUSÃO, PREPARAÇÃO DE TECIDOS E IMUNOISTOQUÍMICA

Os ratos perfundidos 30 dias após o início do ARA para os grupos Não abrasado (animais que não apresentaram crise parcial secundariamente generalizada, N=09) ou Abrasados (animais com crise parcial secundariamente generalizada, N=09), ou ainda 30 dias após o início do LAM, para o grupo Controle (ratos *naïve*, N=10). Todos foram profundamente anestesiados com Thiopentax – tiopental sódico 4% (60 mg/kg; Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA, Itapira, SP, Brasil), e perfundidos com 300 mL de tampão fosfato-salino 0,01M (PBS pH 7,4), seguido por 300 mL de paraformaldeído 4% (PFA - *Acros Organics, New Jersey, USA*). Seus cérebros foram retirados do crânio, pós-fixados, crioprotégidos (20% e 30% de sacarose), congelados e seccionados em 40 µm para Coloração com *Nissl* (afim de verificar a localização dos eletrodos) e *Duplocortina* (ou *Doublecortin* ou *Doublecortina, DCX*, marcador de neurônios imaturos).

Resumidamente para imunoistoquímica para *DCX*, os tempos de diluição e incubação dos anticorpos foram: anticorpo anti-*Doublecortin* policlonal *Guinea Pig* (AB2253; 1:800; *Merck Millipore; USA*), 48 h a 4°C e anticorpo secundário biotilado *Donkey anti-Guinea Pig* (BA-7000; 1:500; *Vector Laboratories, INC; USA*), durante 2 h em câmara úmida à temperatura ambiente. Além disso, foi usada a reação de DAB-peroxidase com o *kit ABC Vector Vectastain Elite* (pk-6100).

A aquisição de imagens foi realizada com auxílio do microscópio *Olympus BX-60 (BX-61VS, Japão)*. Para contagem manual de células utilizamos o *ImageJ* (*Wayne Rasband; Research Services Branch, Bethesda, Maryland, USA*), com uma série de 6 seções contendo o hipocampo inteiro (AP: -1,80 mm a -6,30 mm), de acordo com as coordenadas estereotáticas do Paxinos e Watson. (2007).

### 5.3.6 ANÁLISE COMPORTAMENTAL: CRISES LÍMBICAS

As crises límbicas foram classificadas de acordo com a escala de Racine (1972) modificada por Pinel & Rovner (1978 [Tabela 2]), para os grupos: Não abrasados e Abrasados. Foram considerados abrasados (neste caso apresentaram crise parcial secundariamente generalizada), animais que apresentaram pelo menos duas crises classe 4 ou uma crise classe 5, durante todo o protocolo de ARA (1º- 20º estímulo).

**Tabela 2.** Índice de Gravidade para Crises Límbicas.

Classe 1	Automatismos faciais
Classe 2	Mioclonia de cabeça
Classe 3	Mioclonia de patas anteriores
Classe 4	Elevação
Classe 5	Elevação e queda
Classe 6	Mais de uma classe 5
Classe 7	Corridas e pulos
Classe 8	Crise tônico-clônica generalizada
RACINE (1972) modificada por PINEL & ROVNER (1978).	

### 5.3.7 ANÁLISE EEGRÁFICA

A inspeção visual da pós descarga EEGráfica primária (ver critérios e definições em Tabela 3) foi realizada de acordo com Foresti e colaboradores (2008) e, Pitkänen e colaboradores (2006). Enquanto a análise espectral foi feita através de comparações das amplitudes do sinal sobre a distribuição das frequências, ao longo do tempo, para o 1º e o 20º estímulo (*software LabChart Pro 8.0, ADInstruments*). Para análise da duração da 1º pós descarga no sinal eletrográfico foi empregando uma rotina no *Matlab* (2016), também para o 1º e o 20º estímulo.

**Tabela 3.** Parâmetros frequentemente adotados pela literatura para definição de pós descarga no EEG.

Estudos	Parâmetros
(PITKÄNEN et al., 2006)	Duração da crise > 2 s e frequência mínima de 3 Hz.
(PITKÄNEN, 2010)	Duração mínima da crise > 2 s.
(OLIVEIRA et al., 2014)	Duração da $\geq 2$ s.
(BERGSTROM et al., 2013)	Crise > 5 s.
(LÖSCHER; EBERT, 1996)	Crise $\geq 3$ s.
(JIANG et al., 2015)	Amplitude > 2 vezes a linha basal, duração > 10 s e mudança na faixa de frequência.
(FORESTI, 2008)	Ocorrência imediatamente posterior ao estímulo, com amplitude mínima 2 vezes superior à linha basal e frequência de pelo menos de 1 Hz.
(NOEBELS et al., 2012)	Crise > 10 s.
(EEG) Eletrencefalograma, (Hz) Hertz e (s) segundos.	

### 5.3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O Índice Límbico foi analisado por meio da Anova *Two-Way* medidas repetidas com pós-teste de *Bonferroni* (eficácia do ARA). A duração da pós descarga primária foi analisada com o Teste de *Wilcoxon*, comparando o 1º e o 20º estímulos. Os dados de LAM foram analisados por meio do teste de *Kruskal-Wallis*, com pós-teste de *Dunn* e/ou Anova *Two-Way* medidas repetidas com pós-teste de *Bonferroni*. O número de neurônios recém-nascidos *DCX+* no giro denteado foi analisado com o teste *t* Pareado e Anova *Two-Way* medidas repetidas com pós-teste de *Bonferroni*.

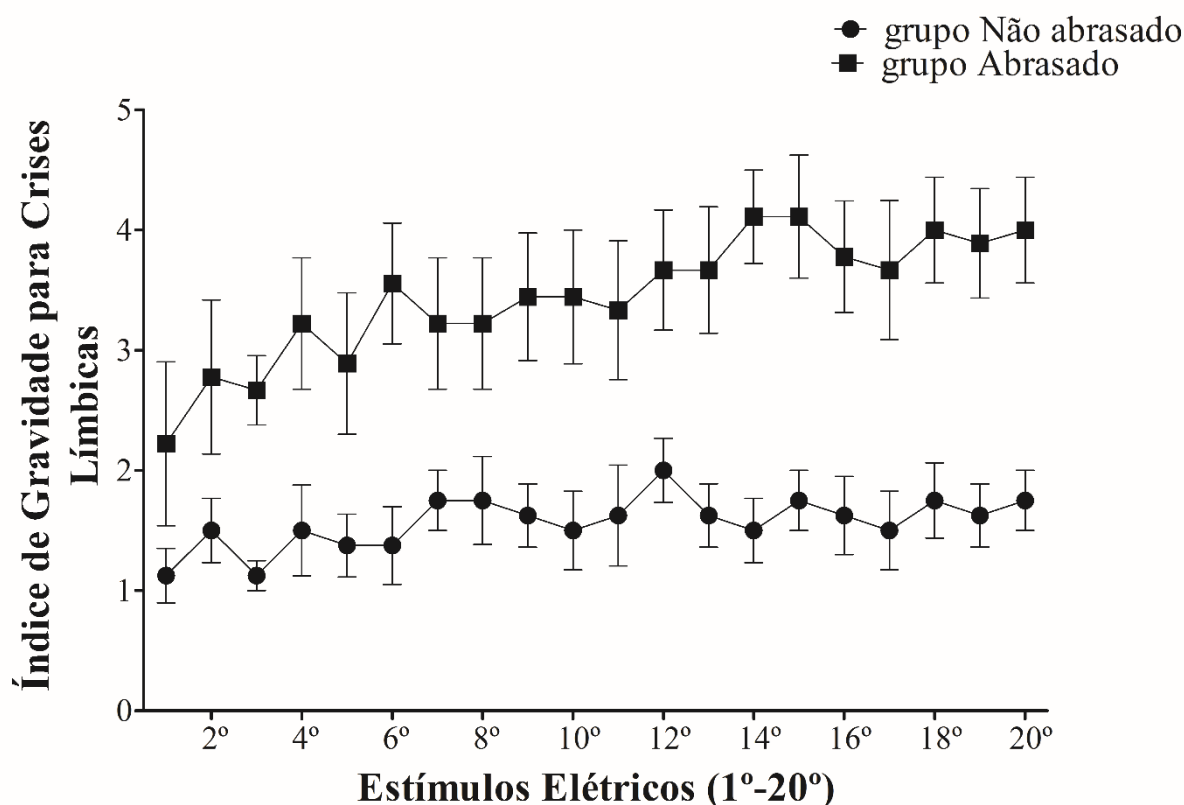
---

Os dados foram analisados estatisticamente e seus gráficos confeccionados utilizando o *GraphPad Prism* versão 8.0 (*GraphPad Software, Inc; USA*). Os valores foram apresentados como média e erro padrão da média ( $\pm$ EPM), sendo considerado estatisticamente significativo, quando as diferenças foram iguais ou inferiores a 0,05 ( $p \leq 0,05$ ).

## 5.4 RESULTADOS

### 5.4.1 PROGRESSÃO COMPORTAMENTAL E EEGRÁFICA DURANTE O ABRASAMENTO RÁPIDO DA AMÍGDALA

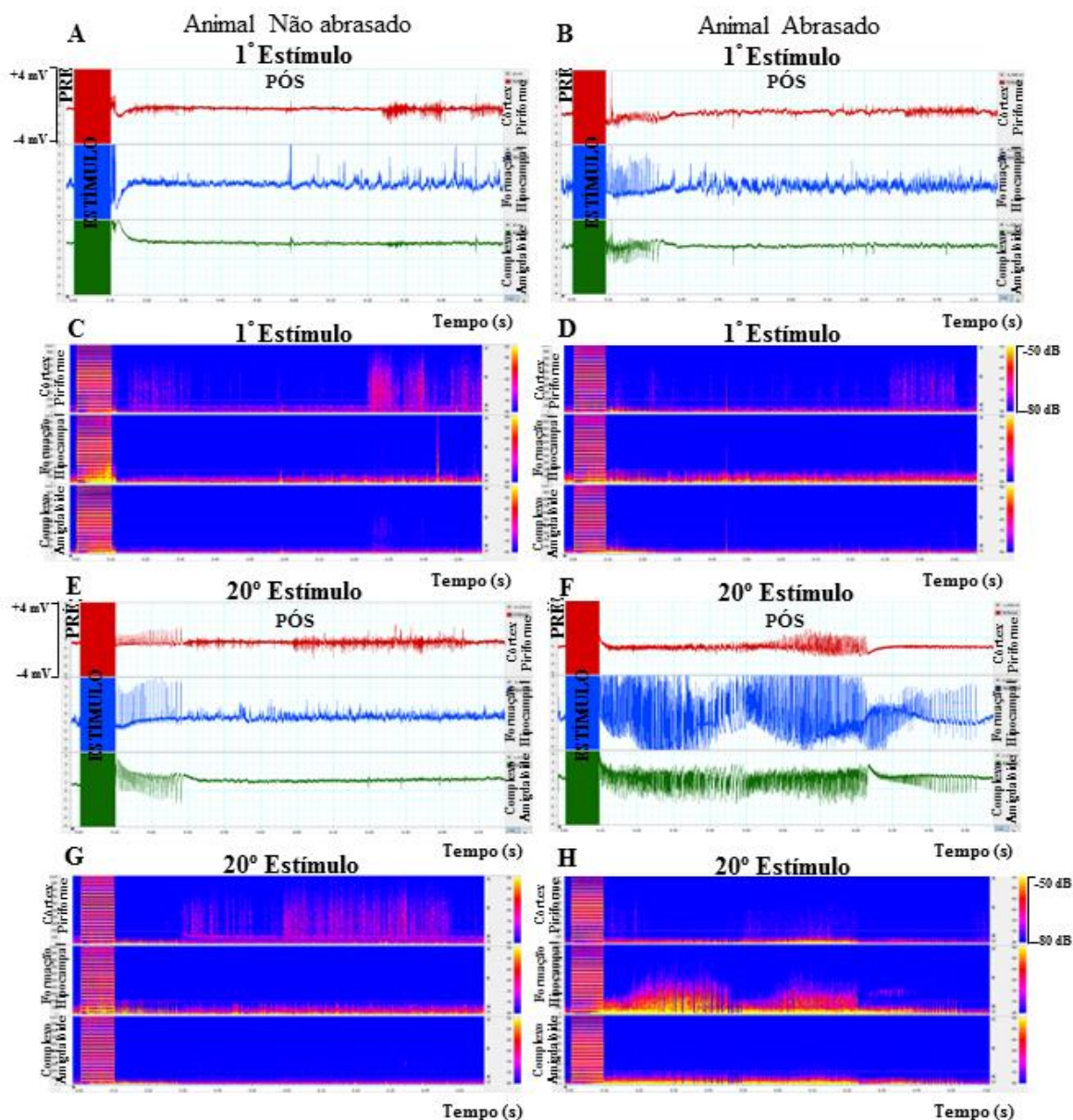
A evolução do ARA (1°-20° estímulos) foi ilustrada na Figura 3, para todos os grupos estimulados, considerando apenas os animais com o correto posicionamento dos eletrodos. Os animais do grupo Não abrasado (N= 09) obtiveram média de 1,125 e EPM de  $\pm 0,2266$  no 1° estímulo, enquanto para o 20° estímulo a média foi de 1,750 e o EPM  $\pm 0,2500$ . Em contrapartida, foi possível observar no grupo Abrasado (N= 09), que o Índice de Gravidade para Crises Límbicas (ou apenas Índice Límbico) foi de  $2,222 \pm 0,6827$  no 1° e de  $4,000 \pm 0,4410$  no 20° estímulo, conforme observações anteriores (TOTOLA et al., 2019; artigo em preparação anexado), confirmando que ratos expostos ao ARA, expressam um aumento natural e progressivo da gravidade das crises. Em conjunto, este achado mostra um aumento significativo no Índice Límbico ao longo dos estímulos para o grupo Abrasado ( $***p < 0,001$ , Anova *Two-Way* medidas repetidas com pós-teste de *Bonferroni*), com diferenças significativas entre os grupos no 6°, 10° e 13°-20° estímulos ( $**p < 0,01$ , Anova *Two-Way* medidas repetidas com pós-teste de *Bonferroni*).



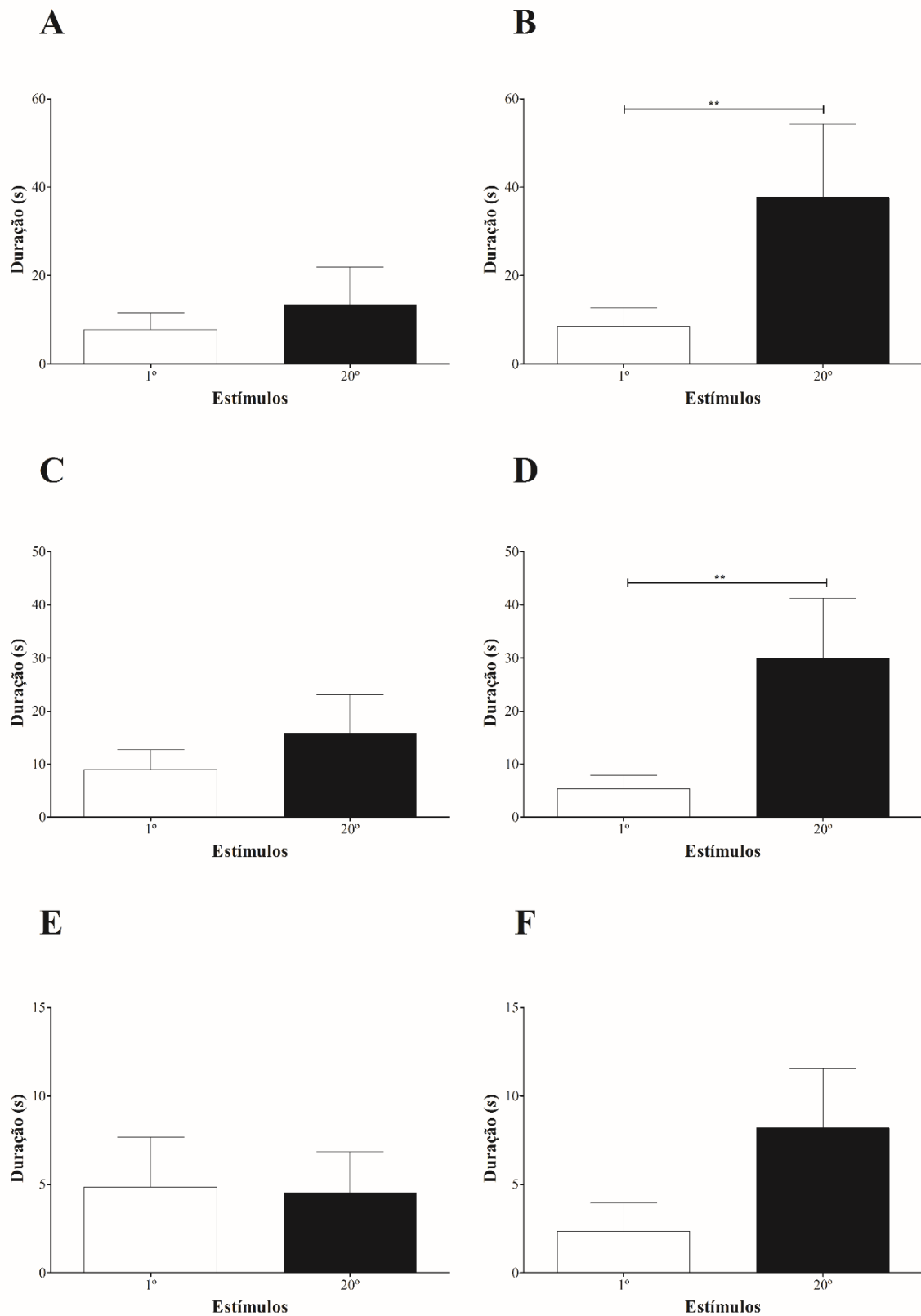
**Figura 3.** Classificação comportamental das crises, estímulo a estímulo, durante o Abrasamento Rápido da Amígdala (1º-20º estímulo), para os grupos: Não abrasado (círculo, N= 09) e Abrasado (quadrado, N= 09). No eixo Y, a escala média ( $\pm$ EPM) de acordo com Racine (1972), alcançada ao longo dos estímulos, indicada no eixo X. Os animais do grupo Não abrasado apresentaram Índice de Gravidade para Crises Límbicas no 1º estímulo de  $1,125 \pm 0,2266$ , enquanto no 20º estímulo de  $1,750 \pm 0,2500$ . Em contraste, o grupo Abrasado obteve Índice Límbico  $2,222 \pm 0,6827$  no 1º estímulo e  $4,000 \pm 0,4410$  no 20º estímulo do Abrasamento Rápido da Amígdala. Nosso achado indica um aumento significativo no Índice Límbico ao longo dos estímulos para o grupo Abrasado ( $***p < 0,001$ , Anova *Two-Way* medidas repetidas com pós-teste de *Bonferroni*), com diferenças significativas entre os grupos no 6º, 10º e 13º-20º estímulos ( $**p < 0,01$ , Anova *Two-Way* medidas repetidas com pós-teste de *Bonferroni*).

Adicionalmente, a análise espectral confirma o efeito do ARA nas crises límbicas, com aumento da atividade epileptogênica, demonstrada por comparações da amplitude do sinal EEGráfico (eixo Y direito), frequências (eixo Y esquerdo), ao longo do tempo (eixo X), com a presença de maiores amplitudes, frequências e duração no 20º estímulo em relação ao mesmo período do 1º estímulo, observado na Figura 4. E ainda, análise quantitativa da duração da pós descarga EEGráfica primária para 1º *versus* 20º estímulo confirma a evolução do ARA, demonstrada na Figura 5.





**Figura 4.** Exemplo do registro eletrencefalográfico (EEGráfico) de um animal do grupo Não abrado (A, C, E e G) e do grupo Abrasado (B, D, F e H), ilustrando a atividade EEGráfica (mV) no Córtex Piriforme (linha vermelha), Complexo Amigdalóide (linha azul) e Formação Hipocampal (linha verde), antes (PRÉ, linha de base), durante (ESTÍMULO, com saturação do amplificador) e após o estímulo (PÓS), para o 1° (A e B) e 20° estímulos (E e F). A análise espectral do eletrencefalograma (EEG) também mostra a frequência (Hz, eixo Y esquerdo) e intensidade (dB, eixo Y direito), ao longo do tempo (eixo X) (C, D, G e H). É possível observar em G e H (20° estímulo) o aumento da duração da atividade do EEG ao longo do tempo (eixo X), bem como da intensidade do sinal (dB) em relação ao C e D (1° estímulo), particularmente para animais do grupo Abrasado (coluna direita).

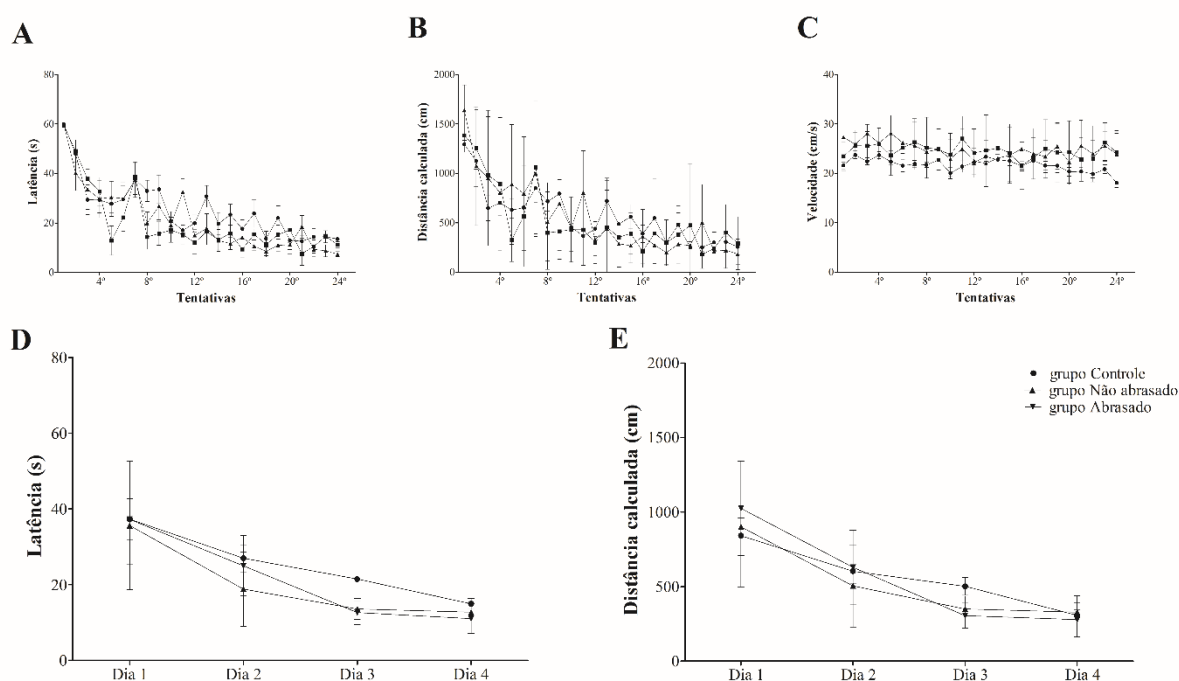


**Figura 5.** Dados eletrencefalográficos durante a progressão do Abrasamento Rápido da Amígdala indicando o aumento da duração da 1º pós descarga no eletrencefalograma no 20º estímulo (barra preta) em comparação ao 1º (barra branca), para o grupo Abrasado (coluna direita ou [B] Complexo Amigdalóide, [D] Formação Hipocampal e [F] Córtex Piriforme) *versus* grupo Não abrasado (coluna da esquerda ou [A] Complexo Amigdalóide, [C] Formação Hipocampal e [E] Córtex Piriforme), particularmente para Complexo Amigdalóide

(B) e Formação Hipocampal (D). No eixo esquerdo Y mostra a duração da 1ª pós descarga no EEG, no 1º e 20º estímulos (eixo X). Teste de *Wilcoxon*.  $**p < 0,01$ .

#### 5.4.2 ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA NÃO AFETA O APRENDIZADO E A MEMÓRIA ESPACIAL

No LAM, a latência para encontrar a plataforma oculta ( $F(2,21) = 22,52$ ;  $p < 0,0001$ ; Anova *Two-Way* medidas repetidas com pós-teste de *Bonferroni*; Figura 6A), distância calculada ( $F(2,21) = 20,52$ ;  $p < 0,0001$ ; Anova *Two-Way* medidas repetidas com pós-teste de *Bonferroni*; Figura 6B) e velocidade ( $F(2,21) = 2,54$ ;  $p < 0,0001$ , Anova *Two-Way* medidas repetidas com pós-teste de *Bonferroni*; Figura 6C) reduziu ao longo das tentativas (1º-24º), durante os quatro dias, com diferença entre os grupos apenas para velocidade ( $F(2,21) = 7,78$ ;  $p < 0,01$ , Anova *Two-Way* medidas repetidas com pós-teste de *Bonferroni*; Figura 6C). Da mesma forma, quando realizamos a *Probe Trial* (25º), sem a plataforma imediatamente após o último teste (24º), verificamos que todos os grupos passaram maior tempo no quadrante alvo ( $p > 0,05$ ; teste de *Kruskal-Wallis*, com pós-teste de *Dunn*; Figura 7B) e ainda, foram observadas diferenças significativas para distância percorrida (entre os grupos,  $p < 0,05$ ; teste de *Kruskal-Wallis*, com pós-teste de *Dunn*; Figura 7C) e velocidade (entre os grupos Controle e Não abrasado;  $p < 0,001$ ; teste de *Kruskal-Wallis*, com pós-teste de *Dunn*; Figura 7D).

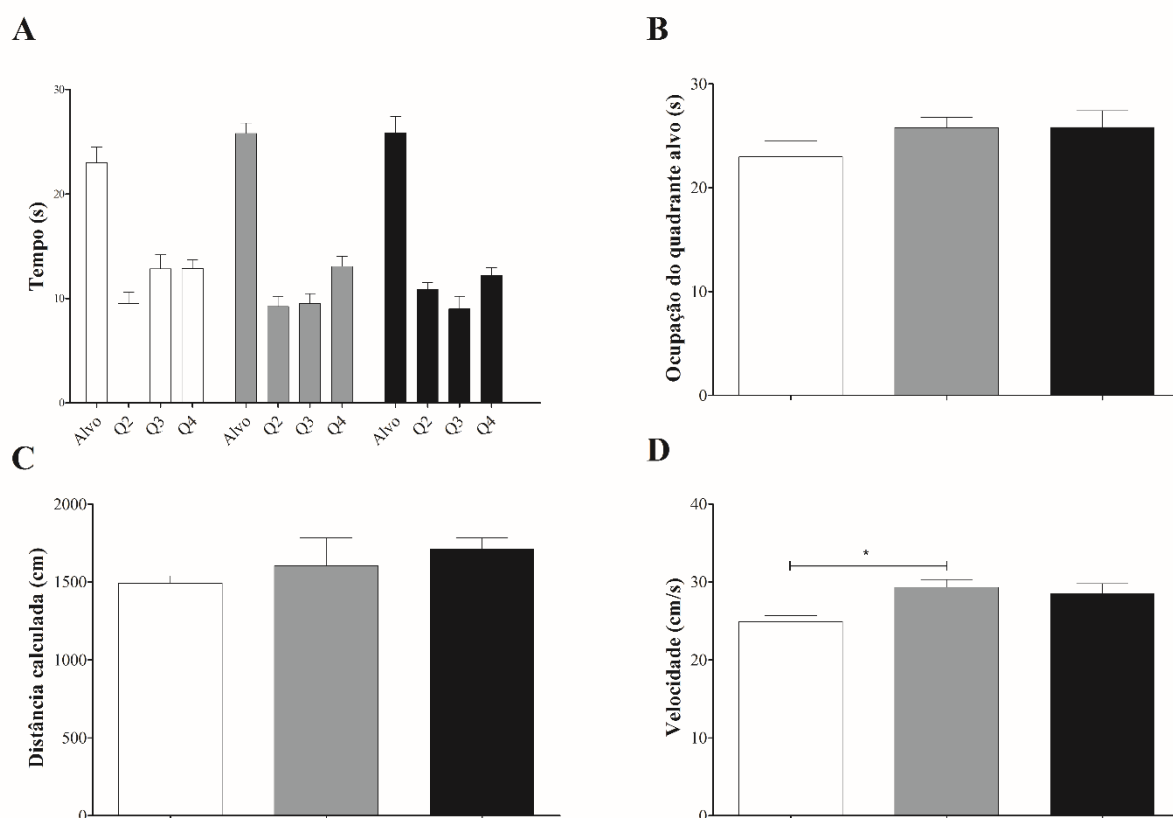


**Figura 6.** Aprendizado e memória espacial no Labirinto Aquático de Morris, para os grupos Controle (N= 15), Não abrasado (N= 09) e Abrasado (N= 09). (A) Latência para encontrar a plataforma. (B) Distância calculada. (C) Velocidade. (D) Média das latências ( $\pm$ EPM) dos animais ao longo dos dias durante treinamento. (E) Distância média calculada ( $\pm$ EPM) dos animais ao longo dos dias durante treinamento. Diferenças observadas: grupos (C $**$ )

---

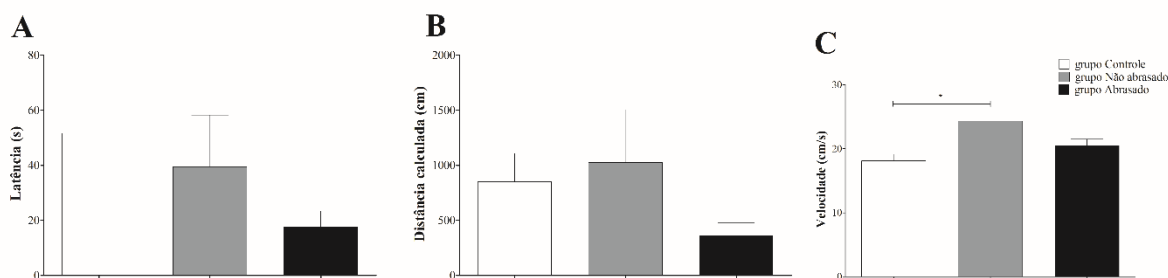
e tentativas (A\*\*\*, B\*\*\* e C\*\*\*). Anova *Two-Way* medidas repetidas com pós-teste de *Bonferroni*. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

No entanto, quando realizamos o reteste 7 dias após o último experimento para identificar a retenção da memória de longo prazo, observamos que apesar do grupo Abrasado ter menor média de latência (Figura 8A) e distância calculada (Figura 8B), não houve diferenças significativas entre os grupos ( $p=0,36$  para ambos; teste de *Kruskal-Wallis*, com pós-teste de *Dunn*). Para o parâmetro velocidade, o grupo Controle apresentou menor valor, seguido pelo grupo Abrasado e Não abrasado (entre os grupos Controle e Não abrasado;  $p < 0,05$ ; teste de *Kruskal-Wallis*, com pós-teste de *Dunn*; Figura 8C). Logo os animais abrasados percorreram uma distância menor com velocidade intermediária, resultando na menor latência observada entre os grupos (Figura 8). E apesar de os animais Não abrasados apresentarem maior velocidade de nado, eles percorreram uma distância intermediária, resultando em um valor de latência considerado “médio” entre os demais grupos (Figura 8). Por fim, os animais Controle apresentaram a maior latência e percorreram uma distância intermediária em relação aos demais grupos, que somado ao parâmetro de menor valor velocidade (comparado aos grupos Não abrasados e Abrasado), sugere que este grupo apresentou um prejuízo embora não significativo da memória de longo prazo, comparado aos demais grupos (Figura 8).



**Figura 7.** Aprendizado e memória espacial no Labirinto Aquático de Morris, para os grupos Controle (N= 15), Não abrasado (N= 09) e Abrasado (N= 09). (A) Tempo gasto em cada quadrante durante a *Probe Trial*. (B) Ocupação do quadrante alvo. (C) Distância calculada. (D) Velocidade. Diferenças observadas entre: grupos (C\*\*) e entre os grupos Controle *versus* Não abrasado (D\*). Teste de *Kruskal-Wallis*, com pós-teste de *Dunn*. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

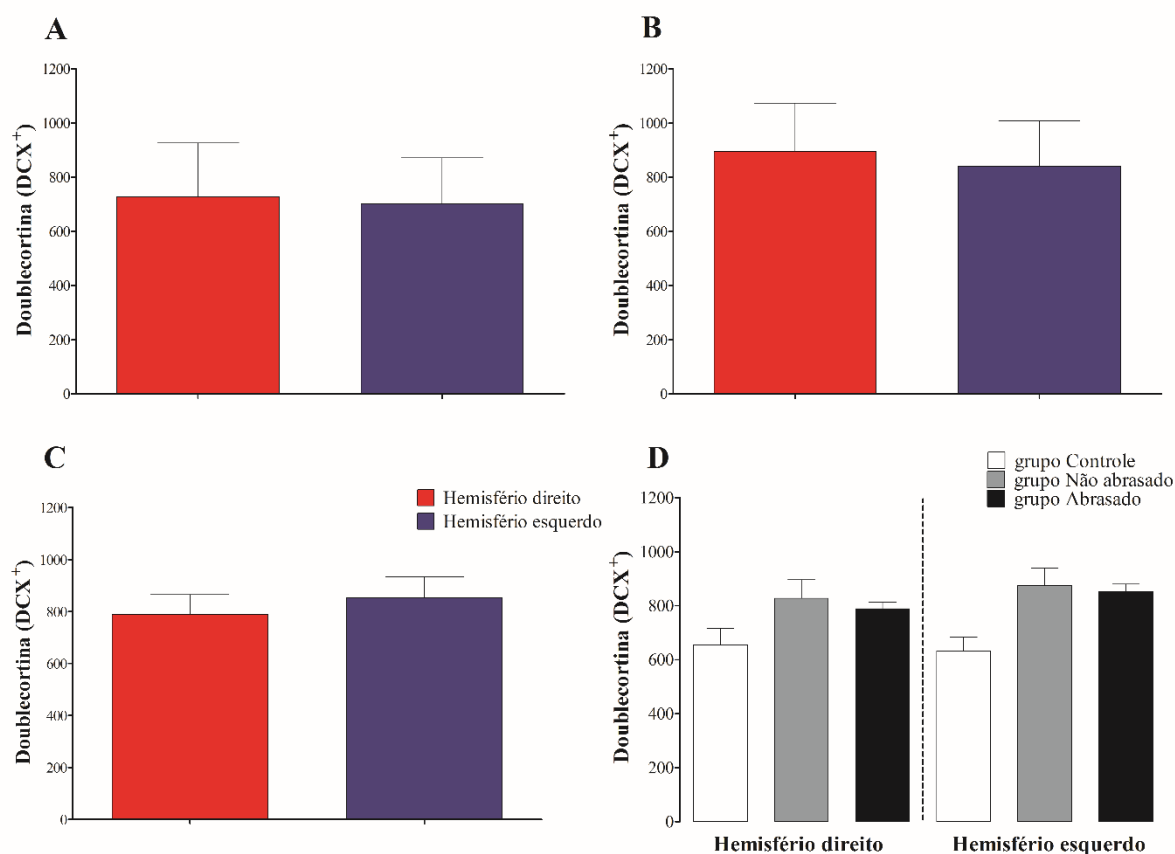
Concluimos que a estimulação elétrica crônica da amígdala durante o protocolo de ARA, não afetou o aprendizado e a memória espacial dos ratos, semelhante ao encontrado por Cunha e colaboradores (2015) após o *Kindling* Audiogênico. Paradoxalmente, a estimulação elétrica parece melhorar a memória de longo prazo.



**Figura 8.** Aprendizado e memória espacial no Labirinto Aquático de Morris, para os grupos Controle (N= 15), Não abrasado (N= 09) e Abrasados (N= 09). (A) Latência para encontrar a plataforma. (B) Distância calculada. (C) Velocidade. Teste de *Kruskal-Wallis*, com pós-teste de *Dunn*. \* $p < 0,05$ .

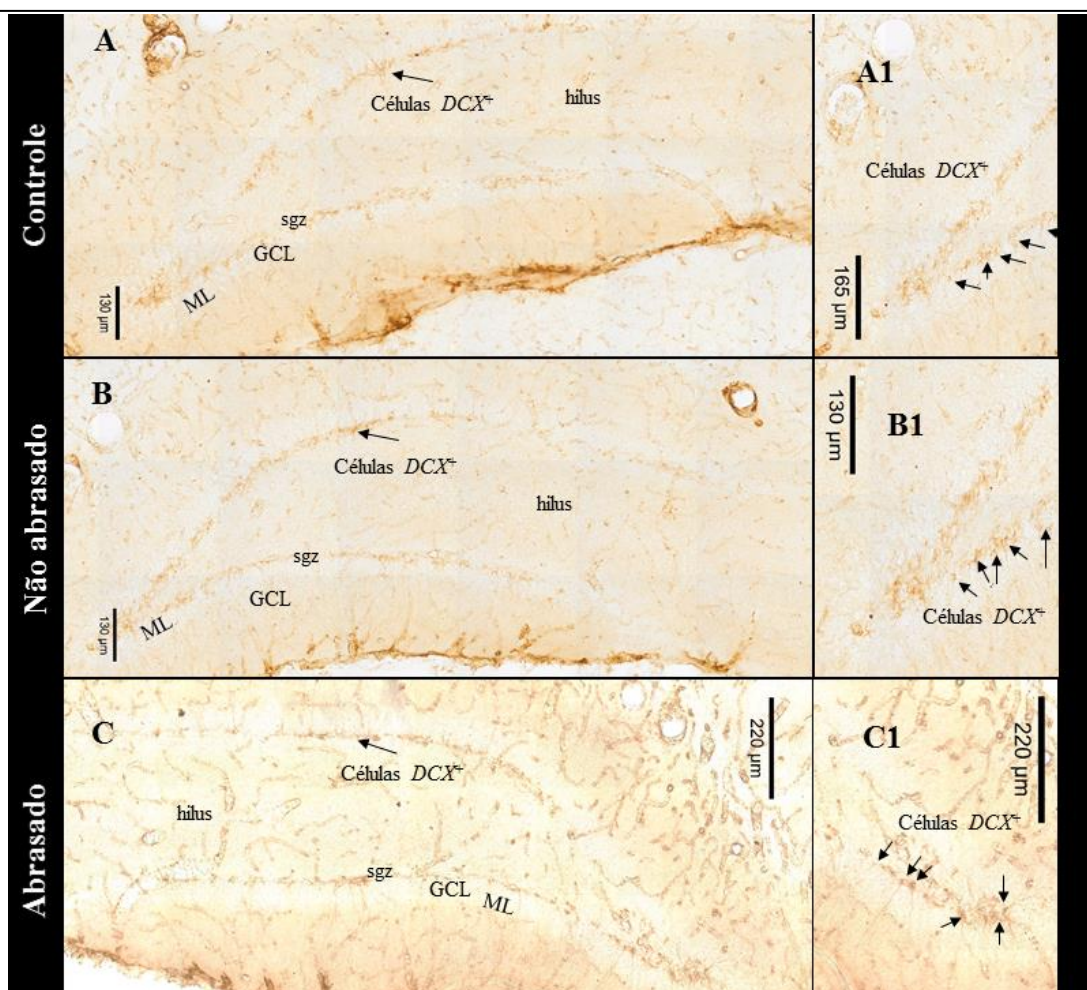
### 5.4.3 ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA NÃO CONTRIBUIU PARA A NEUROGÊNESE HIPOCAMPAL ABERRANTE

Trinta dias após, o Abrasamento não induziu alterações na neurogênese, um mecanismo de epileptogênese, exibido pelo número similar de células  $DCX^+$  no Hipocampo dos animais Abrasados em relação aos grupos Não abrasado e Controle ( $p=0,50$ ; teste de *Kruskal-Wallis*, com pós-teste de *Dunn*; Figura 9D), com imagem representativa da marcação observada nos tecidos em Figura 9. Igualmente, não foram encontradas diferenças significativas entre as regiões ventral e dorsal para o mesmo grupo (Controle  $p=0,73$ ; Não abrasado  $p=0,68$  e Abrasado  $p=0,35$ ; teste de *Wilcoxon*; Figura 9A-C, respectivamente). É importante ressaltar que esta análise se aplica a 4 semanas após o ARA ou LAM (dependente do grupo, ver item 5.3.5), período correspondente à integração de principalmente, novos neurônios granulares nos circuitos hipocampais existentes (FOURNIER et al., 2013).



**Figura 9.** Número de novos neurônios que expressam *Duplocortina* (*Doublecortina* ou *Doublecortin*,  $DCX^+$ ) no giro denteado, nos grupos (A) Controle (N= 09), (B) Não abrasado (N= 07) e (C) Abrasado (N= 08). (D) Expressão de  $DCX^+$  em todos os grupos para ambos os hemisférios. (A-C) Teste de *Wilcoxon*. (D) Teste de *Kruskal-Wallis*, com pós-teste de *Dunn*.  $p>0,05$ .





**Figura 10.** Imunoistoquímica para *DCX* no giro dentado, evidenciando a ausência de diferença significativa entre os grupos analisados: (A) Controle, (B) Não abrasado e (C) Abrasado. No *inset* (A1, B1 e C1) podemos notar as células *DCX*<sup>+</sup> pela coloração marrom, com células (incluindo prolongamentos axonais) apontados pelas setas pretas. A proteína endógena *DCX* é expressa nos corpos celulares e dendritos de neurônios granulares em maturação e migração pela camada de células granulares. Todos os tecidos foram submetidos à mesma bateria de realização da imunoistoquímica. GCL: camada de célula granular. ML: camada molecular do giro dentado. sgz: zona subgranular. Barra de calibração 130-220 µm.

## 5.5 DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstraram que o ARA induziu alteração significativa no fenótipo de crise, com aumento progressivo da atividade epiléptica tanto para parâmetros comportamentais quanto EEGgráficos, mas não afetou o aprendizado e a memória espacial avaliada pelo desempenho no LAM. Tais achados são consistentes com a ausência de neurogênese hipocampal aberrante.

Como esperado, verificamos que o ARA inicialmente induziu uma breve sincronização de rede (crises epilépticas focais) com o comportamento correlacionado, mas com as repetições dos estímulos ocorreu uma progressão gradual das crises (com a presença de crises

---

secundariamente generalizadas), incluindo aumento da gravidade comportamental das crises (Figura 3) e da duração da pós descarga no EEG (Figuras 4 e 5). Como citado, o protocolo de ARA desenvolvido originalmente por Lothman e colaboradores (1985) no Hipocampo e posteriormente padronizado em nosso Laboratório por Foresti e colaboradores (2008) na Amígdala, em contraste com o Abrasamento clássico ou convencional, causa crises generalizadas (estado abrasado) em horas, mas mantém as principais características do modelo (FISHER, 1989; FORESTI et al., 2008; LÖSCHER; BRANDT, 2010; LOTHMAN et al., 1985; MCNAMARA et al., 1980; NOEBELS JL, AVOLI M, ROGAWSKI MA, OLSEN RW, 2012). Este protocolo é conhecido por favorecer a identificação das variáveis consideradas essenciais para a ocorrência de crises, como possíveis alvos para intervenções terapêuticas antiepilépticas (GODDARD, 1983; KANDRATAVICIUS et al., 2014; LÖSCHER; BRANDT, 2010; SAYIN et al., 2003), também oferece a oportunidade de estudar a progressão de diversas alterações neurobiológicas subjacentes à epileptogênese, com manipulação específica de circuitos (LÖSCHER; BRANDT, 2010), e ainda, permite estudar os mecanismos plásticos envolvidos na memória (FISHER, 1989; GODDARD, 1967; GODDARD; MCINTYRE; LEECH, 1969).

Embora o aprendizado e a memória espacial não tenham sido alterados significativamente após o ARA, nossos resultados sugerem que a estimulação elétrica induzida na Amígdala poderia modular particularmente a memória de longo prazo, observada pela tendência à facilitação dessa tarefa cognitiva para o grupo Abrasado (Figura 8). Alguns estudos sugerem que o efeito da estimulação na memória, pode ser específica ao local estimulado, exceto em casos de *overkindling* (CAMMISULI et al., 1997; SUTULA et al., 1995). Adicionalmente, o Abrasamento da Via Perfurante, do Septo, do Córtex Perirrinal ou da Amígdala não alteram a memória espacial (HANNESSON et al., 2005, 2008; MCNAMARA et al., 1992; NIEMINEN SA, SIRVIÖ J, TEITTINEN K, PITKÄNEN A, AIRAKSINEN MM, 1992), enquanto o Abrasamento do Hipocampo Dorsal prejudicou a memória espacial (HANNESSON; MOHAPEL; CORCORAN, 2001). Além disso, como citado anteriormente, os efeitos do Abrasamento da Amígdala parecem depender da extensão do protocolo, sendo mais severos quando for induzido um grande número de crises (HANNESSON et al., 2005, 2008; HANNESSON; MOHAPEL; CORCORAN, 2001; SUTULA et al., 1995).

Nossos achados são consistentes com estudos prévios, que indicaram que o *Kindling* Audiogênico (120 dB, durante um minuto, duas vezes ao dia, por 10 dias), não afetou a função cognitiva no LAM em animais da linhagem WAR, um modelo genético de Epilepsias, apesar de inibir a potenciação de longo prazo (ou *long-term potentiation*, LTP) na via Schaffer-CA1 no Hipocampo (CUNHA et al., 2015). E recentemente, foi observado que um único episódio de



---

estimulação sonora de alta intensidade, também não foi capaz de afetar o aprendizado e a memória espacial no LAM, embora tenha causado redução na LTP (24 h depois; de DEUS et al., 2017). Assim, esses dados confirmam que o AR A, pelo menos usando o número de estímulos convencional (aproximadamente 20), não afeta a função mnemônica espacial e sustenta que os efeitos do Abrasamento na memória parecem ser específicos do local estimulado (abrasado) (Hannesson et al., 2005, 2001, 2008).

Curiosamente, no reteste (26ª tentativa) 7 dias após o *Probe Trial* (25ª tentativa), os ratos Abrasados apresentaram latência e distância mais curtas para encontrar a plataforma (resultado semelhante ao de DEUS et al., 2017), indicando uma melhora não significativa da retenção de memória (memória de longo prazo) após a estimulação da Amígdala, corroborando (ainda que parcialmente) estudos que demonstraram que a estimulação da Amígdala pode melhorar a função cognitiva (MERCERÓN-MARTÍNEZ et al., 2016; SUTHANA et al., 2012). De fato, estudos experimentais sugerem que a estimulação elétrica do núcleo Basolateral da Amígdala (BLA) é capaz de regular a plasticidade neural no giro denteado através de mecanismos relacionados à memória, particularmente a LTP, pelo reforço das sinapses na geração dos potenciais de ação nos neurônios pós-sinápticos (dependendo das características do estímulo; LI & RICHTER-LEVIN, 2012; IKEGAYA, SAITO, & ABE, 1995). Portanto, o ARA poderia ter características que, se mantidas, poderiam causar potencialização sináptica, semelhante à LTP.

Outra linha de explicação para nossos dados negativos no LAM, baseia no estudo de Bui e colaboradores (2018), que demonstra que as células musgosas do giro dentado controlam o aprendizado e memória espacial (particularmente a codificação). No entanto, um estudo anterior do nosso grupo, relatou que o ARA não causou morte neuronal (por necrose, Fluoro-Jade C<sup>+</sup>), incluindo de células musgosas, além de não causar brotamento de fibras musgosas (FORESTI et al., 2008). E extrapolado para o modelo audiogênico de crises crônicas (*Kindling* Audiogênico), foi encontrado neurogênese (BrdU<sup>+</sup>), mas também não foram demonstrados nem morte celular por necrose (Fluoro-Jade C<sup>+</sup>), nem brotamento de fibras musgosas na linhagem WAR (GALVIS-ALONSO; CORTES DE OLIVEIRA; GARCIA-CAIRASCO, 2004; ROMCY-PEREIRA; GARCIA-CAIRASCO, 2003).

E ainda, para a função cognitiva, Lacruz e colaboradores (2010) demonstraram prejuízo na memória apenas quando ambos os hemisférios (Hipocampo) foram simultaneamente estimulados, enquanto Coleshill e colaboradores (2004) demonstraram diferentes tipos de comprometimento, de acordo com o hemisfério estimulado. Entretanto, nossos resultados corroboraram novamente os achados de Nieminen e colaboradores (1992), e Hannesson e

---

colaboradores (2008), indicando que o Abrasamento da Amígdala esquerda não afetou a memória espacial.

Além disso, um experimento adicional foi realizado para demonstrar o efeito do implante de eletrodos, e embora as descrições na literatura indiquem um aumento da suscetibilidade a crises após o implante dos eletrodos, por se assemelharem àquelas lesões cerebrais penetrantes (LÖSCHER, 2002), nós não observamos consequências funcionais desse procedimento em estruturas cerebrais importantes (semelhantes às áreas dos grupos Não abrasado e Abrasado) observadas pelo LAM (grupo *sham*, dados não mostrados). Especulamos que esse resultado possa ocorrer pelas seguintes razões: efeito do implante agudo, preservação anatômica das áreas estudadas (logo de suas funções) e/ou pequeno diâmetro dos eletrodos ou lesão de área.

É bem descrito que a neurogênese é muito afetada na Epilepsia experimental e clínica, desempenhando um importante papel na progressão fisiopatológica dessa doença e em suas comorbidades (PITKÄNEN; LUKASIUK, 2009). Esse processo, em seu sentido mais simples, mas em situações não patológicas, implica o aparecimento de novos neurônios sobretudo em duas regiões cerebrais: a zona subventricular nos Ventrículos Laterais e a zona subgranular no giro denteado do Hipocampo (MING; SONG, 2011). No Hipocampo, essas células precursoras neuronais se diferenciam e se integram ao giro denteado (MING; SONG, 2011), sendo proposto como um mecanismo para aumentar a plasticidade neuronal, exercendo um importante papel na formação e recuperação de novas memórias (TEJADA et al., 2013a). No entanto, nas Epilepsias há um aumento na proliferação de células granulares recém-nascidas, associada à remodelação dendrítica (ARISI; GARCIA-CAIRASCO, 2007; PARENT et al., 1997; PARENT; LOWENSTEIN, 2002; PARENT; MURPHY, 2008) e/ou a localização ectópica (SCHARFMAN; GOODMAN; MCCLOSKEY, 2007). Assim, a neurogênese hipocampal aberrante tem sido descrita como contribuidora da hiperexcitabilidade nas Epilepsias (em especial no Hipocampo) e pode ser um dos fatores que contribui para a sua progressão (PARENT et al., 1997; PARENT; LOWENSTEIN, 2002; PARENT; MURPHY, 2008).

Assim, uma vez que a neurogênese hipocampal adulta está associada a certas formas de aprendizagem e memória dependentes do hipocampo, a neurogênese hipocampal aberrante estaria relacionada ao comprometimento cognitivo (CHO et al., 2015; PARENT; KRON, 2012; PARENT; MURPHY, 2008). Entretanto, não encontramos neurogênese hipocampal aberrante após o ARA, observada pela imunistoquímica para *DCX* (Figuras 9 e 10), além de morte neuronal por necrose utilizando a histoquímica por Fluoro-Jade C (dados não mostrados, consistentes com os achados de [FORESTI et al., 2008]). Uma potencial explicação para esse

---

fenômeno é que a gravidade e a duração das crises podem influenciar os efeitos da neurogênese hipocampal (BOTTERILL et al., 2015). Isso sugere que, em geral, crises mais graves (isto é, pelo menos cinco crises generalizadas consecutivas ou ~30 estimulações elétricas, por exemplo em protocolos de *Status Epilepticus*; ASLA PITKÄNEN ASLA PITKÄNEN PHILIP SCHWARTZKROIN SOLOMON MOSHÉ, 2006; BENGZON et al., 1997; KURAMOTO et al., 2009; PARENT et al., 1998; PARK et al., 2006; SCOTT et al., 1998) provocam maiores aumentos na proliferação de células progenitoras hipocampais adultas. Adicionalmente, a morte neuronal (particularmente perda de neurônios principais e/ou interneurônios positivos ao ácido gama-aminobutírico [GABA]) é outro potencial mecanismo para indução de neurogênese (BENGZON et al., 1997; SHERAFAT et al., 2013; SHETTY, 2014). Interessantemente, estudos anteriores demonstraram que a supressão/ablação da neurogênese parece atenuar as crises associado à melhora do aprendizado e memória (CHO et al., 2015; JESSBERGER et al., 2007; JUNG et al., 2004, 2006).

Em conjunto, nossos achados indicam que o ARA não contribuiu para a neurogênese hipocampal aberrante e que essa alteração parece não ser crítica para o agravamento das crises límbicas associadas à ausência de declínio cognitivo, mas poderia modular o desenvolvimento das Epilepsias ou manutenção do estado abrado (PARENT et al., 1998). É importante ressaltar que observamos (através da quantificação de células que expressam  $DCX^+$ ) que o LAM não aumenta, *per se*, a taxa de neurogênese adulta, logo este teste não é um estímulo modulatório ou pode ser considerado atividade física.

Até agora, nosso grupo mostrou que as crises induzidas pelo ARA são ansiogênicas (JAIMES, 2006) consistentes com os achados de Adamec e colaboradores (ADAMEC; MORGAN, 1994; ADAMEC; SHALLOW, 2000), mas não alteram a cognição. Esta última descoberta é consistente com a ausência de neurogênese hipocampal aberrante após as crises. Assim, nossos resultados somados a outros estudos sugerem uma correlação entre Epilepsias e neurogênese associada a função cognitiva (CHO et al., 2015; JESSBERGER et al., 2007) e indicou a dependência dos efeitos do Abrasamento em relação às variáveis: (1) intensidade, duração, frequência e localização do estímulo, além do (2) número total de estímulos utilizados no protocolo de ARA (HANNESSON et al., 2005, 2008).

Como sugestão para o próximo estudo e por razões óbvias, o uso de ferramentas de modelagem computacional (método determinístico em detrimento do método estocástico; TEJADA et al., 2013) que permitirão testar uma série de hipóteses como a potencial relação entre eventos neurogênicos (e apoptóticos) e déficits cognitivos, além da contribuição individual ou associada das variáveis listadas na Tabela 1, frequentemente observadas nas

---

Epilepsias e/ou na modulação das crises, de forma viável (otimizada), extremamente importante no campo complexo e dinâmico das Epilepsias (TEJADA et al., 2013).

## **5.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

As crises epiléticas induzidas pelo ARA não interferiram na função cognitiva (aprendizado e memória espacial), associado à ausência da neurogênese hipocampal aberrante, sugerindo que este protocolo corresponde a um melhor modelo de ictogênese, do que epileptogênese. Assim, o papel da neurogênese hipocampal após as crises e os déficits cognitivos frequentemente associados continuam sem determinação clara e, portanto, necessitam de maiores investigações.

---

**6 CAPÍTULO II: CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO ODOR DO PREDADOR E DA ESTIMULAÇÃO HIPOTALÂMICA, EM DIFERENTES MODELOS EXPERIMENTAIS**

---

## 6.1 INTRODUÇÃO

Segundo Gross & Canteras (2012) o medo é uma resposta neurobiológica que surge frente a uma ameaça que comprometa a sobrevivência do animal. Sendo classicamente dividido em medo incondicionado e condicionado. O medo incondicionado (ou inato) é descrito como um estímulo intrinsecamente ameaçador, ou seja, existe um mecanismo de reconhecimento, que independe da experiência, logo o repertório comportamental surge na primeira exposição (CANTERAS; PAVESI; CAROBREZ, 2015; GROSS; CANTERAS, 2012). Por outro lado, o medo condicionado ocorre diante do pareamento de estímulos aversivos (odor de predador, choques nas patas e outros) com estímulos neutros, como o contexto ambiental, odor neutro, dentre outros (CANTERAS; PAVESI; CAROBREZ, 2015; GROSS; CANTERAS, 2012).

Pesquisas recentes têm frequentemente utilizado odores provenientes do gato e da raposa vermelha como indutores de medo, por serem considerados etologicamente relevantes e não nocivos. O gato e seus derivados tem sido usados na grande maioria dos estudos envolvendo confronto predador-presa. No entanto, o odor de gato apresenta desvantagem da imprecisão da intensidade, além disso, o sexo, a raça e a dieta dos gatos (por exemplo, a quantidade de carne consumida) são fatores que interferem na intensidade da resposta de medo (FORTES-MARCO et al., 2015). Adicionalmente, os componentes químicos do odor do gato que dão origem às respostas defensivas ainda não são completamente caracterizados (FORTES-MARCO et al., 2015), tornando difícil sua padronização, geralmente apresentado (fonte do estímulo) aos ratos na forma de coleiras usadas por gatos (DIELENBERG; MCGREGOR, 2001; MCGREGOR et al., 2002; STAPLES et al., 2005, 2008; STAPLES; MCGREGOR, 2006), panos impregnados com o odor de gato (ZANGROSSI; FILE, 1992), blocos de madeira deixados na toca/casinha de um gato (BLANCHARD et al., 2003, 2001), fezes e urina de gato (BLANCHARD et al., 2003), além da exposição ao próprio gato (BINDI; BALDO; CANTERAS, 2018; CEZARIO et al., 2008; RIBEIRO-BARBOSA et al., 2005), estando este anestesiado ou não.

Por outro lado, o TMT foi descrito pela primeira vez em 1980, por Vernet-Maury (VERNET-MAURY, 1980; VERNET-MAURY; POLAK; DEMAEL, 1984), como o constituinte das fezes da raposa vermelha que melhor induz respostas de medo (ENDRES; APFELBACH; FENDT, 2005; FENDT et al., 2005; HACQUEMAND; JACQUOT; BRAND, 2010; LASKA et al., 2005). Trata-se de um componente sulfuroso (e isolado) com importância fundamental para indução de comportamentos defensivos, semelhantes aqueles deflagrados pelo odor de gato (STAPLES; MCGREGOR, 2006), porém apresenta algumas vantagens, por se tratar de um (1) composto sintético (2) com propriedades químicas constantes e (3)

---

concentração facilmente controlada (AYERS *et al.*, 2013; FENDT; ENDRES, 2008), além de poder ser (4) adquirido comercialmente. Somado a esses fatores, o TMT ativa o sistema olfatório principal (AYERS *et al.*, 2013; FENDT; ENDRES, 2008; GALLIOT *et al.*, 2012; HACQUEMAND; JACQUOT; BRAND, 2010; KOBAYAKAWA *et al.*, 2007), enquanto o odor de gato ativa o Sistema Olfatório Acessório ou Vomeronasal (DIELENBERG; MCGREGOR, 2001; STAPLES; MCGREGOR, 2006; TAKAHASHI, 2014), ambos projetando para estruturas corticais e subcorticais (via extra-talâmica), que finalizarão o processamento das informações odoríferas pelo cérebro, incluindo: Complexo Amigdalóide, Formação Hipocampal e Substância Cinzenta Periaquedutal. De particular interesse, experimentos demonstraram que a estimulação de núcleos Hipotalâmicos induziu diferentes estratégias defensivas, como comportamentos semelhantes ao medo e ao pânico (LIN *et al.*, 2011; ULLAH *et al.*, 2015, 2017), indicando o envolvimento desta área no sistema cerebral de defesa (CANTERAS; PAVESI; CAROBREZ, 2015; GROSS; CANTERAS, 2012). Logo, a ativação das diversas áreas cerebrais repercute na expressão de diferentes comportamentos, como indicado na Tabela 4.

<b>Tabela 4.</b> Respostas comportamentais observadas durante o medo condicionado ao contexto.		
<b>Comportamentos</b>	<b>TMT</b>	<b>Gato/Odor do gato</b>
Congelamento	(ROSEN, 2004; ROSEN et al., 2008)	(BINDI; BALDO; CANTERAS, 2018; BLANCHARD et al., 2003; CEZARIO et al., 2008; RIBEIRO-BARBOSA et al., 2005; TAKAHASHI et al., 2007)
<i>Head-out</i>		(CANTERAS et al., 2008a; DIELENBERG; MCGREGOR, 2001; MCGREGOR et al., 2002; STAPLES et al., 2005; STAPLES; MCGREGOR, 2006)
Atividade locomotora		(BINDI; BALDO; CANTERAS, 2018; BLANCHARD et al., 2003; CEZARIO et al., 2008; DIELENBERG; MCGREGOR, 2001; MCGREGOR et al., 2002; RIBEIRO- BARBOSA et al., 2005)
Ocultação	(ROSEN et al., 2008)	(CANTERAS et al., 2008a; DIELENBERG; MCGREGOR, 2001; STAPLES et al., 2005; STAPLES; MCGREGOR, 2006; TAKAHASHI et al., 2007; ZANGROSSI; FILE, 1992)
Redução da autolimpeza ( <i>grooming</i> )		(CEZARIO et al., 2008; DIELENBERG; MCGREGOR, 2001; MCGREGOR et al., 2002; RIBEIRO-BARBOSA et al., 2005; STAPLES et al., 2008)
<i>Strech back approach</i>		(CEZARIO et al., 2008; DIELENBERG; MCGREGOR, 2001; MCGREGOR et al., 2002; RIBEIRO-BARBOSA et al., 2005)
Elevação ( <i>rearing</i> )		(BLANCHARD et al., 2003; CEZARIO et al., 2008; DIELENBERG; MCGREGOR, 2001; RIBEIRO-BARBOSA et al., 2005; STAPLES et al., 2008)
Contato		(BLANCHARD et al., 2003; CANTERAS et al., 2008a; DIELENBERG; MCGREGOR, 2001; STAPLES et al., 2005, 2008; STAPLES; MCGREGOR, 2006; ZANGROSSI; FILE, 1992)
<i>Avoidance</i>	(FORTES-MARCO et al., 2015; ROSEN et al., 2008)	(BLANCHARD et al., 2003)

(TMT) 2,5-Dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline.

Entretanto, um dos paradigmas atualmente estudado e bastante controverso é se o TMT induz medo condicionado ao contexto (FORTES-MARCO et al., 2015; ROSEN, 2004; ROSEN et al., 2008; ROSEN; ASOK; CHAKRABORTY, 2015; ROSEN; WEST; DONLEY, 2006), em combinação com a expressão de comportamentos de medo inato, ou se é simplesmente uma molécula aversiva (BLANCHARD et al., 2003; MCGREGOR et al., 2002; STAPLES; MCGREGOR, 2006; WALLACE; ROSEN, 2000). A maioria dos estudos indica que as fezes de gato, assim como o TMT são indutores de medo incondicionado, mas não sustentam tais comportamentos quando condicionado. O fato é que as informações espacial e temporal preditivas da presença de predador para tais pistas podem estar reduzidas, considerando que são odores duráveis e que (em sua maioria) indicam que o predador esteve presente (BLANCHARD



---

et al., 2003; BLANCHARD; GRIEBEL; BLANCHARD, 2003; FENDT et al., 2005; MCGREGOR et al., 2002; MORROW; ROTH; ELSWORTH, 2000; WALLACE; ROSEN, 2000). Por outro lado, os odores provenientes do esfregaço/coleira/pêlo ou do próprio animal (anestesiado ou não) sugerem um risco factível, iminente e, portanto real (BLANCHARD et al., 2003, 2001; BLANCHARD; GRIEBEL; BLANCHARD, 2003).

No entanto é importante pontuar que as respostas comportamentais induzidas por odores de predador são influenciadas por diferentes fatores, em especial pela configuração da câmara. Estudos indicam que ambientes complexos, ou seja, câmaras com dois ambientes são indutores de medo condicionado (FORTES-MARCO et al., 2015; ROSEN, 2004; ROSEN et al., 2008; ROSEN; ASOK; CHAKRABORTY, 2015; ROSEN; WEST; DONLEY, 2006), segundo os autores, esses ambientes permitem uma maior expressão comportamental de medo (FENDT et al., 2005; FENDT; ENDRES, 2008; FORTES-MARCO et al., 2015; ROSEN, 2004).

Para testar essa hipótese, examinamos se o TMT induz medo condicionado ao contexto em condições ambientais (aparato com duplo compartimento, compreendendo um aberto e outro fechado, similar a ROSEN et al., 2008) que favoreçam a expressão de comportamentos defensivos (ENDRES; FENDT, 2007; ROSEN, 2004; ROSEN et al., 2008; ROSEN; ASOK; CHAKRABORTY, 2015; ROSEN; WEST; DONLEY, 2006). Adicionalmente, gostaríamos de avaliar se a entrega nasal de nanoemulsão contendo TMT afeta a expressão comportamental e endócrina de ratos *Sprague Dawley*, de forma mais significativa que o composto líquido, utilizando o paradigma de medo condicionado ao contexto. Somado, a potencial efetividade da nanoemulsão contendo TMT, nas respostas comportamentais de medo inato em ratos *Wistar-Old*. E finalmente, desejamos verificar os efeitos comportamentais defensivos da estimulação elétrica nos neurônios da porção Dorsomedial do Hipotálamo Ventromedial, uma área criticamente envolvida no Circuito de Defesa Hipotalâmico Medial (CANTERAS; PAVESI; CAROBREZ, 2015; GROSS; CANTERAS, 2012).

## 6.2 OBJETIVO

Avaliar os efeitos do TMT (incluindo nanoemulsão) e da estimulação elétrica hipotalâmica, nas respostas defensivas inatas ou condicionadas, sob uma variedade de condições.

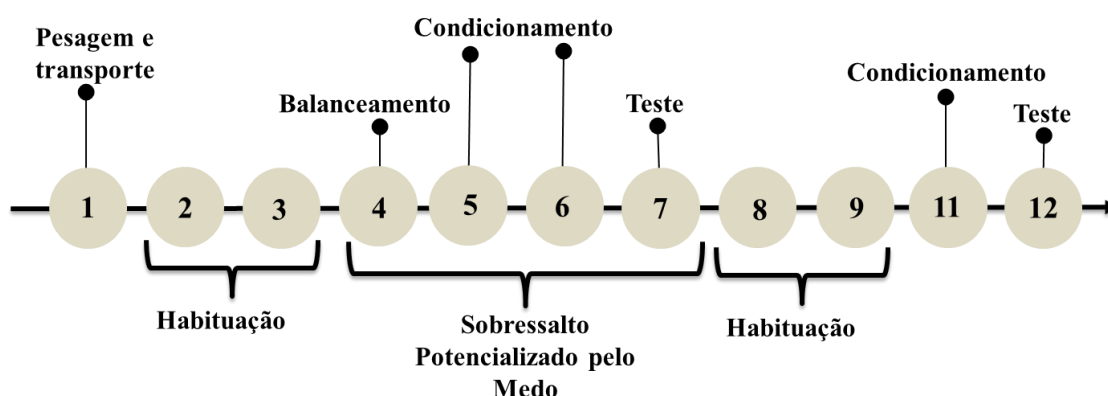
### 6.3 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os protocolos experimentais foram realizados de acordo com as recomendações para experimentação animal do CONCEA e aprovados pelo CEUA da FMRP - USP (número do protocolo: 20/2019). Para tanto foram utilizados ratos *Sprague Dawley* (N= 42, <https://www.taconic.com/rat-model/sprague-dawley>) e *Wistar-Old* (N= 13), ambos machos, *naïve* e adultos, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB – UNICAMP) e do Serviço de Biotério do Campus de Ribeirão Preto - USP, respectivamente.

Os animais foram submetidos a um ciclo claro-escuro de 12/12 h, sob temperatura controlada de  $23\pm 2^\circ$  C, com água e ração *ad libitum*, e armazenados em caixas de polietileno com tampa de ferro cromado (40,5 x 33,5 x 21 cm), em grupos de no máximo 4 ratos por caixa. Após os procedimentos experimentais (descritos abaixo), todos os ratos foram perfundidos (janela temporal de 90 min), seus cérebros crioprotetidos, congelados e armazenados para futuro processamento.

#### 6.3.1 PROTOCOLO 1. EFEITOS COMPORTAMENTAIS E NEUROENDÓCRINO DA EXPOSIÇÃO OLFATÓRIA AO TMT UTILIZANDO O PARADIGMA DE MEDO CONDICIONADO AO CONTEXTO

O delineamento experimental seguiu uma sequência cronológica, afim de verificar os efeitos comportamentais e neuroendócrino da exposição olfatória ao TMT, utilizando o paradigma de medo condicionado ao contexto (Figura 11).



**Figura 11.** Desenho experimental para verificar os efeitos comportamentais e neuroendócrinos da exposição olfatória ao TMT utilizando o paradigma de medo condicionado ao contexto.

---

O teste de Sobressalto Potencializado pelo Medo (ALMADA et al., 2009; ALMADA; COIMBRA; BRANDÃO, 2015; BROWN; KALISH; FARBER, 1951; DAVIS, 1993; SANTOS et al., 2005) foi realizado primariamente em todos os animais, para avaliar a resposta defensiva rápida e estereotipada, diante de estímulos intensos e inesperados de natureza acústica, tátil e visual. Esse teste resultou em um estado de condicionamento ao medo (luz e choque nas patas), que age potencializando a resposta de sobressalto ao som. Trata-se, portanto, de um pareamento aversivo (um tipo de memória associativa emocional dependente principalmente da Amígdala) e não contextual, embora o Hipocampo (particularmente o Ventral) pareça participar da elaboração das respostas defensivas frente a estímulos condicionados em sua totalidade.

Na sequência, realizamos a habituação e o pareamento dos odorantes ao contexto, com escolha aleatória dos animais por grupo (detalhes abaixo) e exposição durante 15 min (sessão de condicionamento), seguindo o protocolo descrito por Rosen e colaboradores (2008).

A. Grupo Acetato de Amila: 10 *Sprague Dawley* foram expostos à câmara saturada com acetato de amila (odor da banana; neutro);

B. Grupo TMT: 12 *Sprague Dawley* foram expostos a câmara saturada com TMT;

C. Grupo Veículo Nanoemulsão: 10 *Sprague Dawley* foram expostos a nanopartícula intranasal contendo veículo;

D. Grupo TMT Nanoemulsão: 10 *Sprague Dawley* foram expostos a nanopartícula intranasal contendo TMT.

Vinte e quatro horas após a exposição ao odor, os animais foram reexpostos ao contexto (sessão teste), afim de determinar a presença do medo condicionado ao contexto, no qual o odor foi anteriormente experimentado.

Imediatamente após os animais foram submetidos ao Labirinto em Cruz Elevado, um clássico modelo amplamente utilizado no estudo da ansiedade, seguido pelo Campo Aberto, para verificar o efeito do TMT (incluindo nanoemulsão) na atividade locomotora. Foram realizadas ainda coletas seriadas de sangue por venosecção da cauda dos animais, para verificar o efeito do TMT nos níveis plasmáticos de Corticosterona, um hormônio tradicionalmente avaliado após situação indutora de estresse e, por conseguinte medo. Ao final, foi realizada a dissecação e pesagem da Glândula Adrenal bilateral, afim de avaliar o efeito da exposição única ao TMT, em um órgão sabidamente sensível ao estresse.

---

### 6.3.1.1 SOBRESSALTO POTENCIALIZADO PELO MEDO

Inicialmente foram realizadas duas sessões de balanceamento (ou *matching*, com intervalo de 24 h), após 5 min de habituação, os animais receberam 30 estímulos com intensidade sonora de 90 dB e randomização dos intervalos entre cada estímulo, permitindo a familiarização dos animais com as caixas experimentais, além de reduzir potenciais variações nas respostas ao sobressalto.

Posteriormente os animais foram colocados nas caixas para sessão de condicionamento, durante os primeiros cinco minutos, foi realizada a habituação. Na sequência foram condicionados à luz (4 s) seguido pelo choque nas patas (1 s de duração, 600  $\mu$ A de intensidade), com um total de 20 estímulos durante duas sessões ou dois dias (com intervalo de 24 h).

Vinte e quatro horas após o treino (sessão de condicionamento), o Sobressalto Potencializado pelo Medo foi avaliado, sem apresentação do choque nas patas. Para tanto, os animais foram submetidos a 40 estímulos sonoros, sendo que 20 apresentações consistiram apenas de estímulo sonoro com intensidade de 90 ou 105 dB (tentativas só som), e foram intercaladas aleatoriamente com outras 20 apresentações de som (intensidade de 90 ou 105 dB) precedido por luz (tentativas luz-som).

As amplitudes das respostas de sobressalto de cada animal foram registradas pelo *software Startle Reflex* (versão 4.10, *Med Associates*, EUA). Todo o protocolo de Sobressalto Potencializado pelo Medo foi realizado em colaboração com o Laboratório coordenado pelo Professor-Pesquisador **Dr. Manoel Jorge Nobre do Espirito Santo**, do **Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia**, da **Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP**.

### 6.3.1.2 ESTIMULAÇÃO OLFATÓRIA

De acordo com parâmetros químicos e comportamentais avaliados previamente (artigo em preparação anexado), 10  $\mu$ L do acetato de amila (odor da banana, gentil doação do **Professor Dr. Antônio de Pádua Carobrez**, da **Universidade Federal de Santa Catarina**; peso molecular: 130,1; <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/#query=isoamyl%20acetate>; *Aldrich Chemical Co.*) ou TMT (peso molecular: 129,2; <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/#query=2%2C5-dihydro-2%2C4%2C5-trimethylthiazoline>; *BioSRQ, Inc.*) foram colocados sob um papel filtro (dimensão: 4,5 x 4,5 cm), após saturação do ambiente interno (30 min, mesmo tempo para dessaturação), o animal foi exposto à câmara teste (vedada hermeticamente), enquanto outra parte dos animais recebeu administração via

---

intranasal (5  $\mu$ L em cada narina) da nanopartícula contendo veículo ou TMT (preparação da nanoemulsão, no item 6.3.2.1.).

### **6.3.1.3 CONDICIONAMENTO CONTEXTUAL**

Fortes-Marco e colaboradores (2015) recentemente demonstraram condicionamento contextual com TMT em uma câmara com duplo compartimento. Enquanto Rosen e colaboradores (2008) também obtiveram sucesso na expressão do medo condicionado ao contexto com TMT, utilizando uma grande câmara (50 cm x 22 cm x 33 cm) com uma pequena caixa ou toca (16 cm x 20 cm x 22 cm). Ambos os estudos são baseados no modelo comportamental desenvolvido por Dielenberg e colaboradores (2001), também usado por McGregor e colaboradores (2002).

No presente estudo, como citado, utilizamos uma câmara com medidas e configurações (arena grande com toca) semelhante a Rosen e colaboradores (2008), além do delineamento experimental, incluindo dois dias de habituação, eliminando o *viés* da novidade, durante 15 min. A câmara teste compreendeu uma arena acrílica quadrangular com paredes brancas (46 cm x 22,5 cm x 42 cm) e piso constituído por 28 barras de aço inox, separadas em 1 cm, além do piso inferior em acrílico dividido em três áreas igualmente dimensionadas (permitindo a distinção das zonas: próxima à fonte de odor, intermediária e distante). Além disso, o segundo compartimento ou caixa de abrigo ou toca (16 cm x 20 cm x 22 cm) tem paredes acrílicas cinza opacas, com entrada de 10,5 cm de diâmetro (e 11 cm de altura), permitindo que os roedores se movam livremente entre os dois ambientes.

No dia seguinte à habituação, os ratos foram expostos individualmente, durante 15 min, à arena poligonal contendo o odor teste (sessão de condicionamento, conforme descrição do 6.3.1.2.). Enquanto que no dia do teste de retenção (sessão teste), os ratos foram reexpostos à câmara sem os odorantes, para avaliar o efeito do condicionamento, também com duração de 15 min.

Os animais foram filmados durante todo o protocolo de condicionamento contextual, para posterior análise comportamental (para detalhes ver item 6.3.1.3.1.). E ainda, para evitar a contaminação cruzada de odores, cada uma das condições de teste foi realizada em dias diferentes. Em qualquer caso, a sala de testes estava longe da sala em que os animais eram mantidos. Após cada teste, a câmara foi completamente limpa, para evitar qualquer odor residual, além disso, a câmara foi colocada em uma sala com exaustor, que efetivamente impediu que os odores se espalhassem pela sala onde o experimento foi realizado.

---

#### 6.3.1.3.1 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL

Segundo a literatura, parece haver uma hierarquia de comportamentos defensivos, expressa em ordem previsível, na qual as respostas de luta ou fuga seriam seguidas pelo comportamento de congelamento ou *freezing*, quando o perigo fosse antecipado novamente. Enquanto, se o congelamento for primariamente gerado, ocorrerão posteriormente, possíveis mudanças na exploração e em outros comportamentos defensivos, como avaliação de risco (ENDRES; FENDT, 2007; ROSEN, 2004). Logo, não é um comportamento específico que é aprendido durante o medo condicionado, mas o estado de medo *per si* (ENDRES; FENDT, 2007).

Assim, durante a exposição e reexposição à câmara com duplo compartimento, os animais foram analisados (*software X-PLO-rat*, 2005) quanto à duração dos seguintes comportamentos:

- I. Respostas de avaliação de risco (*risk assessment*), caracterizadas por:
  - A. *Stretch attend posture*: postura exploratória temerosa;
  - B. *Head out*: postura exploratória com a cabeça frequentemente *scanning* e *sniffing* (a arena grande), mas parcialmente escondido na toca.
- II. Presença na zona protegida: abrigo na toca.
- III. Interação com fonte odorífera: contato ou aproximação da narina com a fonte odorífera.
- IV. Elevação ou *rearing*: movimento vertical, com apoio nas patas posteriores, e anteriores apoiadas ou não nas paredes da câmara teste.
- V. Cruzamentos: travessias ou permanência sobre as diferentes zonas na câmara teste, compreendidas como: (Quadrante 1) zona próxima à fonte de odor, (Quadrante 2) zona intermediária ou (Quadrante 3) zona distante da zona de odor, mas próximo à toca.

#### 6.3.1.4 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO: COMPORTAMENTOS TIPO ANSIOSOS

Imediatamente após a reexposição ao contexto (sem a presença do odorante), os comportamentos tipo ansiosos foram avaliados no Labirinto em Cruz Elevado, que consiste em dois braços fechados (40 cm x 10 cm) e dois abertos (50 cm x 10 cm), elevados 50 cm do chão. Para o teste, cada rato foi colocado no quadrado central do labirinto voltado para o mesmo braço aberto. Durante 5 min, os animais exploraram livremente o labirinto com intensidade luminosa de 60 lux (nos braços abertos). Entradas e tempo nos braços abertos e fechados, além de tempo no centro foram usados para definir os comportamentos tipo ansiosos.

---

### 6.3.1.5 CAMPO ABERTO: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA

O Campo Aberto é outro importante modelo experimental para o estudo do comportamento tipo ansioso, sendo também capaz de detectar alterações no padrão da atividade locomotora. O aparato consiste em um quadrado de madeira (60 cm x 60 cm), com paredes de 30 cm de altura, dividido em quadrantes, de forma que foi contabilizada a distância total percorrida durante 5 min, como medida da atividade locomotora espontânea do animal. Para tanto, os animais foram colocados no centro do aparato, também com luminosidade de 60 lux. Para análise comportamental foi utilizado o *software ANYmaze* (versão 4.96).

### 6.3.1.6 EXTRAÇÃO E DOSAGEM DE CORTICOSTERONA

Foi realizada coleta de sangue por venosecção da cauda do animal, uma vez que tal método permite coletas seriadas de sangue do mesmo animal. Para este estudo foram analisados o nível plasmático da Corticosterona nos seguintes tempos: 30 min após exposição ao odor e contexto, e ao contexto, nas sessões de condicionamento e teste, respectivamente; além de 90 min após a sessão teste, utilizando, portanto, um menor número de animais.

O método de venosecção da cauda consistiu na gentil imobilização do animal, com posterior secção (pequena incisura) da cauda distal, de forma que os vasos sanguíneos localizados nesta região foram lesionados (modificado de SHIRASAKI et al., 2012). No local da incisão, o sangue foi delicadamente estancado com gaze, possibilitando a perda de um pequeno volume de sangue, sem maiores comprometimentos ao animal (SHIRASAKI et al., 2012).

Posteriormente realizamos o radioimunoensaio para quantificação da Corticosterona, seguindo o protocolo descrito anteriormente por Elias e colaboradores (2002) e Umeoka e colaboradores (2011), no **Laboratório de Neuroendocrinologia do Departamento de Fisiologia** da FMRP - USP, coordenado pelo **Prof. Dr. José Antunes Rodrigues**. Todas as amostras foram testadas em duplicata para o mesmo ensaio.

### 6.3.1.7 COLETA DA GLÂNDULA ADRENAL

Para avaliar o impacto da exposição olfatória ao TMT (incluindo nanoemulsão), em órgão sensível ao estresse, após o paradigma de medo condicionado ao contexto, as Glândulas Adrenais foram dissecadas e imediatamente pesadas, similar a Wulsin e colaboradores (2018).

---

### **6.3.2 PROTOCOLO 2. EXPRESSÃO COMPORTAMENTAL DA ENTREGA NASAL DE NANOEMULSÃO CONTENDO TMT EM RATOS *WISTAR-OLD***

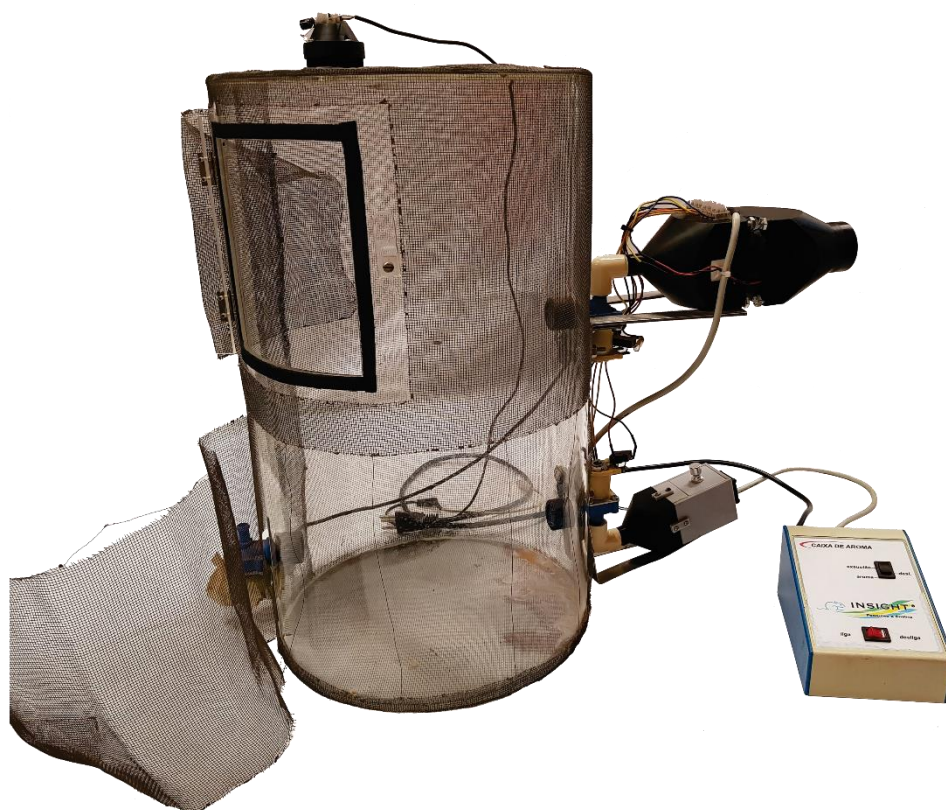
#### **6.3.2.1 PREPARAÇÃO DA NANOEMULSÃO CONTENDO TMT**

A nanoemulsão contendo TMT como composto ativo (TMT Nano) foi obtida pelo processo de emulsificação espontânea (DOEGITO et al., 1994; SANTOS-MAGALHÃES et al., 2000) utilizando uma rotina de três etapas. Resumidamente, os surfactantes (*Epikuron*® 170/*Span*® 80) foram inicialmente dissolvidos durante a solubilização em 10 mL de acetona espectroscópica a 55 °C. O TMT foi previamente dissolvido em *Miglyol*® 812N em (0,05 mg/mL) e adicionado à solução orgânica de fosfolípido para obter a concentração final máxima de TMT puro. A fase aquosa consistiu de 10 mL de PBS pH 7,4 e *Poloxamer* 188 (*Biopolymer*). No passo de emulsificação, a Nanoemulsão foi formada por injeção lenta da fase orgânica na fase aquosa sob agitação magnética (300 rpm por 30 min) a 55 °C. O último passo (extração) consistiu em remover o solvente orgânico por evaporação rotativa de baixa pressão a 60-70 °C. O produto final foi armazenado a 4 °C antes de ser utilizado nos testes.

#### **6.3.2.2 EFEITOS COMPORTAMENTAIS DA NANOEMULSÃO CONTENDO TMT EM RATOS *WISTAR-OLD***

Quatro preparações foram aplicadas em cinco ratos *Wistar-Old* machos e adultos, na seguinte sequência: sem odor (apenas estímulo mecânico), água, nanoemulsão contendo veículo (VEI Nano) e nanoemulsão contendo TMT (TMT Nano). Resumidamente, enquanto o experimentador 1 gentilmente segurou o animal para estabilizar sua região de cabeça e nariz usando uma flanela, o experimentador 2 fez a aplicação com uma pipeta (10 µL). No primeiro dia de manipulação, o experimentador 2 colocou apenas ar diretamente em cada narina (estímulo mecânico ou sem odor). No 2º e 3º dias, foram colocados 5 µL em cada narina de água e nanoemulsão contendo veículo, respectivamente. No dia do experimento, portanto, no 4º dia, o volume de 5 µL de nanoemulsão contendo TMT foi aplicado em cada narina (Figura 12). Após a exposição olfatória, os animais foram registrados por 5 min para análise neuroetológica (ver próximo tópico).

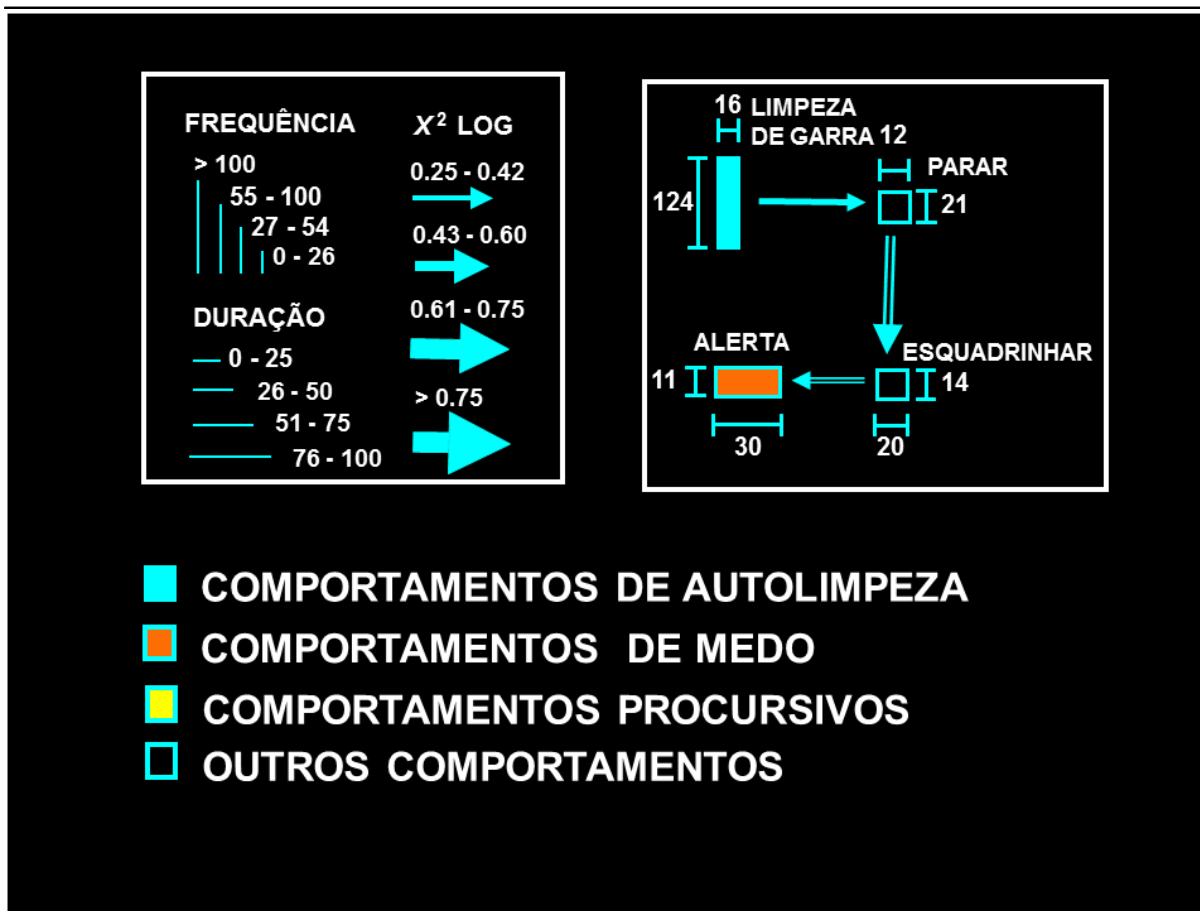




**Figura 12.** Câmara utilizada durante o Protocolo Experimental 2, composta por: sistema de controle e sistema de exaustão (idealizada pelo nosso grupo, Laboratório de Neurofisiologia e Neuroetologia Experimental).

#### 6.3.2.2.1 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL

A análise comportamental foi realizada por meio da abordagem neuroetológica, que é baseada em uma análise detalhada, segundo a segundo, de todos os itens comportamentais, apresentados pelo animal durante o período de observação (5 min/cada). Após o registro, os dados coletados foram analisados pelo programa estatístico *ETHOMATIC* (GARCIA-CAIRASCO et al., 1992). Ao final, os comportamentos foram representados graficamente no programa *Power Point 2010 (Microsoft)* sob a forma de Fluxogramas, seguindo o padrão de calibração representado na Figura 13. No Fluxograma, cada retângulo representa um comportamento, a duração é simbolizada pela base, enquanto a frequência de ocorrência de cada item comportamental é representada pela altura. As setas indicam a probabilidade de um segundo comportamento ocorrer após um determinado comportamento.



**Figura 13.** Padrão de calibração para confecção dos Fluxogramas (GARCIA-CAIRASCO et al., 1992). Cada retângulo representa um comportamento. A altura dos retângulos simboliza a frequência de ocorrência, e a base, a duração média do comportamento durante a observação. As setas representam valores estatísticos ( $\chi^2 \geq 3,841$ ;  $\log \chi^2 \geq 0,25$ ;  $p < 0,05$ ) que indicam a probabilidade de um segundo comportamento ocorrer após um dado comportamento. A cor do retângulo tem o objetivo de identificar qualitativamente classes comportamentais diferentes. A cor das setas representa o ponto de partida das mesmas ao acompanhar a cor do retângulo que origina a interação entre pares comportamentais.

### 6.3.3 PROTOCOLO 3. CARACTERIZAÇÃO COMPORTAMENTAL DOS EFEITOS DA ESTIMULAÇÃO HIPOTALÂMICA NAS RESPOSTAS DEFENSIVAS

#### 6.3.3.1 ANIMAIS E CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

Brevemente, sob anestesia com Thiopentax – tiopental sódico 4% (30 mg/kg; i.p.; Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA, Itapira, SP, Brasil) associado a doses de manutenção (0,1 mL) utilizando da combinação dos anestésicos Ketamina 3% (0,6 mg/kg; i.p.; Agener União Saúde Animal – Embu-Guaçu, SP, Brasil) e Xilazina 0,02% (0,4 mg/kg; i.p.; Bayer Saúde Animal – São Paulo, SP, Brasil), 8 ratos *Wistar-Old naïve*, machos, pesando entre 280-305 g, foram implantados estereotaxicamente com eletrodos bipolares de aço inoxidável revestidos de teflon (A-M System, Inc.; diâmetro= 400  $\mu\text{m}$ ), para registro no BLA esquerda (AP= -2,3 mm; ML= -4,7 mm; AP= -7,1 mm) e Córtex Parietal Esquerdo, além de um eletrodo para estímulo e registro no Hipotálamo Ventromedial região Dorsomedial esquerdo (AP= -1,92

mm; ML= -0,3 mm; AP= -8,5 mm), usando como referência o atlas Paxinos & Watson (1998). Em adição, um parafuso foi posicionado sobre o córtex frontal para aterramento do sinal. Os eletrodos foram então soldados a um conector (macho de seis pinos *RJ11*), que por sua vez foi fixado na calota craniana do rato com acrílico dental (similar a Figura 2).

Após a cirurgia, os animais receberam dose única de Pentabiótico (0,15 mL; i.p.; FORT DODGE Saúde Animal LTDA – São Paulo, SP, Brasil), para prevenção de infecções e permaneceram em recuperação no Biotério durante 7 dias, sendo realizada a habituação nos últimos 3 dias (intervalos de 24 h, 5 min/cada), afim de reduzir o estresse da novidade.

### **6.3.3.2 ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA**

Os animais foram estimulados individualmente, com uma corrente inicial de 100  $\mu$ A e aumentos progressivos de 100  $\mu$ A, a cada 5 min até atingir 1000  $\mu$ A. Os estímulos consistiram em trens de ondas quadradas bifásicas, com frequência de 60 Hz, pulsos de 1 ms e 2 s de estimulação (EBERT; LÖSCHER, 1995; FORESTI et al., 2008). Enquanto para o registro, os parâmetros foram ajustados em: ganho de 1 x, passa banda de 0,1-1000 Hz, frequência de amostragem de 2000 Hertz e *notch filter* em 60 Hz. Todos os animais foram monitorados por vídeo- EEG, e suas análises EEGráficas serão realizadas posteriormente.

### **6.3.3.3 PERFUSÃO, CRIOPROTEÇÃO, CONGELAMENTO E CORTE**

Noventa min após o último estímulo elétrico, os animais foram eutanasiados (Thiopentax – tiopental sódico; 60 mg/kg; i.p., Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA, Itapira, SP, Brasil) e imediatamente submetidos à perfusão transcardíaca com solução de PBS (0,1M; pH 7,4), seguido por PFA (4% em PBS 0,1M, pH 7,4).

Após os cérebros foram removidos da calota craniana e mantidos na solução de perfusão (pós fixação), na sequência foram crioprotetidos por imersão em solução de sacarose a 30% em PBS, congelados (isopentano 99% [Vetec Química Fina LTDA, Rio de Janeiro, Brasil] resfriado em gelo seco [-65° C]) e cortados em 40  $\mu$ m no plano coronal, em criostato (*Micron HM-550-E, Walldorf, Germany*) com temperatura variando de -18° a -20° C.

#### **6.3.3.3.1 HISTOQUÍMICA COM AZUL DE TOLUIDINA**

A coloração por Azul de Toluidina permite verificar não apenas a qualidade do tecido, mas também a localização dos eletrodos, usando como referência as pranchas do Atlas de Paxinos & Watson (1997). Para a realização da técnica, os tecidos já fixados às lâminas foram hidratados com banhos decrescentes de álcool (100%, 95%, 90% e 70%), durante 3 min/cada, na sequência permaneceram 10 min no banho em água e então foram colocados no corante

---

(Azul de toluidina ou Cloreto de Tolônio 0,5%) por aproximadamente 20 s, após lavados em água corrente (10 min) e em seguida desidratados com etanol em concentrações crescentes (70%, 90%, 95% e 100%), passando pelo processo de diafanização com banhos de xilol (I e II) e cobertos por lamínulas usando *Entellan* (Merck Indústria Química Rio de Janeiro, Brasil) como meio de montagem. Os cortes histológicos foram analisados e as imagens adquiridas com o microscópio *Olympus Scan Scope (BX-61VS, Japão)*.

#### **6.3.3.4 ANÁLISE COMPORTAMENTAL**

Foi realizada análise comportamental detalhada (similar ao Protocolo descrito em 6.3.2.2.1.), através da neuroetologia, que compreende a representação gráfica, construída através da avaliação de todos os itens comportamentais expressos pelos animais, segundo a segundo, de acordo com a sequência temporal, baseando em um dicionário comportamental. Após, cada comportamento recebeu um código que foi inserido no programa estatístico *ETHOMATIC* (GARCIA-CAIRASCO et al., 1992, 1996). Tal programa permite tanto a análise de um único animal ou parâmetro, quanto à da soma de animais de um determinado grupo, fornecendo a frequência de ocorrência de cada item, sua duração média e as interações entre comportamentos, calculadas pelo  $\chi^2$ , sendo as interações consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ ;  $\log \chi^2 \geq 0,25$ . Ao final, os dados obtidos foram representados graficamente no programa *Power Point 2010 (Microsoft)*, sob a forma de Fluxogramas, seguindo o padrão de calibração da Figura 13 (GARCIA-CAIRASCO et al., 1992, 1996).

#### **6.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Para o Sobressalto Potencializado pelo Medo utilizamos o Anova *Two-Way* medidas repetidas com pós-teste de *Bonferroni*. Enquanto para a resposta comportamental durante o Condicionamento Contextual, também empregamos *Anova Two-Way* medidas repetidas com pós-teste de *Bonferroni*, enquanto para comparação do mesmo grupo entre sessões de condicionamento e teste, utilizamos o teste *Unpaired t* ou teste de *Mann Whitney*, de acordo com a normalidade dos dados. Para as análises do Labirinto em Cruz Elevado e peso das glândulas adrenais usamos o teste *Unpaired t* ou teste de *Mann Whitney*, também de acordo com a normalidade dos dados. Já para o Campo Aberto utilizamos o teste *Unpaired t*. E finalmente para os níveis de Corticosterona empregamos o teste de *Mann Whitney* (1º dia, 30 min) e *Anova Two-Way medidas repetidas com pós-teste de Bonferroni* (2º dia).

---

A análise neuroetológica realizada nos Protocolos 2 e 3, forneceu a associação entre itens pela análise do  $\chi^2$ , sendo consideradas interações estatisticamente significativas quando  $\chi^2 \geq 3.84$ ,  $\log \chi^2 \geq 0.25$ ;  $p < 0,05$ .

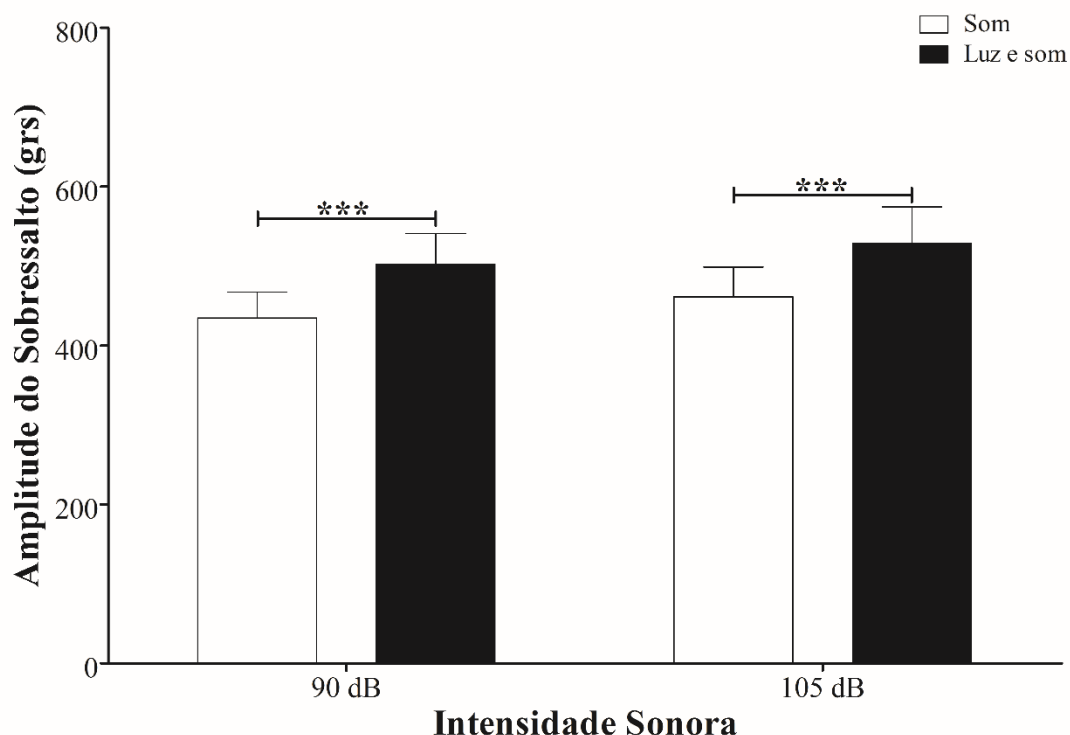
Todos os dados foram analisados estatisticamente e seus gráficos confeccionados com o *GraphPad Prism* (8.0, *GraphPad Software, Inc; USA*). Os valores foram apresentados como média $\pm$ EPM. Nível de significância foi estabelecido em  $p \leq 0,05$ .

## **6.5 RESULTADOS**

### **6.5.1 PROTOCOLO 1. EFEITOS COMPORTAMENTAIS E NEUROENDÓCRINO DA EXPOSIÇÃO OLFATÓRIA AO TMT UTILIZANDO O PARADIGMA DE MEDO CONDICIONADO AO CONTEXTO**

#### **6.5.1.1 SOBRESSALTO POTENCIALIZADO PELO MEDO**

As respostas defensivas condicionadas observadas no Sobressalto Potencializado pelo Medo indicam aumento significativo da amplitude da resposta ao sobressalto após condicionamento Pavloviano, para as duas intensidades sonoras ([90 dB] som [434,6 $\pm$ 32,79] *versus* luz e som [502,6 $\pm$ 38,64]; e [105 dB] som [461,5 $\pm$ 37,23] *versus* luz e som [529,3 $\pm$ 45,11]; Anova *Two-Way* medidas repetidas com pós-teste de *Bonferroni*,  $p < 0,001$ ), como indicado na Figura 14.



**Figura 14.** Resposta de Sobressalto Potencializada pelo Medo: após o condicionamento da luz e choque, os animais ao verem a luz se acender e, sequencialmente, ouvir um som intenso (condição luz e som: 90 dB ou 105 dB), apresentaram aumento significativo da amplitude de sobressalto, comparado apenas ao estímulo sonoro (condição só som: 90 dB ou 105 dB). Anova *Two-Way* medidas repetidas com pós-teste de *Bonferroni*, \*\*\* $p < 0,001$ .  $N = 10$  por grupo (com exceção do grupo TMT,  $N = 12$ ). Barras indicam média  $\pm$  erro padrão da média.

#### 6.5.1.2 TMT NÃO APRESENTOU O CONDICIONAMENTO CONTEXTUAL

A avaliação comportamental indicou que os animais do grupo TMT permaneceram maior tempo na Toca (Figura 15A) comparado aos animais expostos ao Acetato de Amila durante a sessão de condicionamento ( $650,1 \pm 26,59$  versus  $807,4 \pm 12,67$ , para os grupos Acetato de Amila e TMT, respectivamente) e sessão teste ( $624,3 \pm 31,47$  versus  $744,6 \pm 16,31$ , para os grupos Acetato de Amila e TMT, respectivamente), além disso, observamos o efeito da administração do TMT (TMT versus TMT Nanoemulsão), também para sessão de condicionamento ( $807,4 \pm 12,67$  versus  $684,0 \pm 53,97$ , para os grupos TMT e TMT Nanoemulsão, respectivamente) e sessão teste ( $744,6 \pm 16,31$  versus  $625,5 \pm 45,39$ , para os grupos TMT e TMT Nanoemulsão, respectivamente), entretanto a permanência na Toca não se mantém durante o 2º dia, dada a diferença significativa para o grupo TMT, entre os dois dias ( $807,4 \pm 12,67$  versus  $744,6 \pm 16,31$ , para sessão de condicionamento e sessão teste, ambos para o grupo TMT).

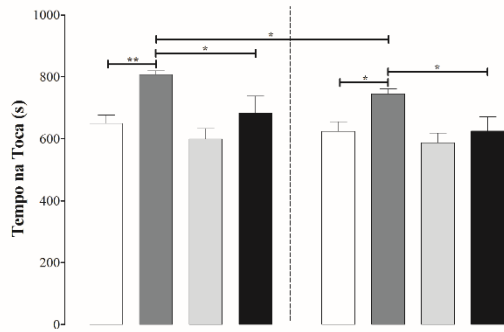
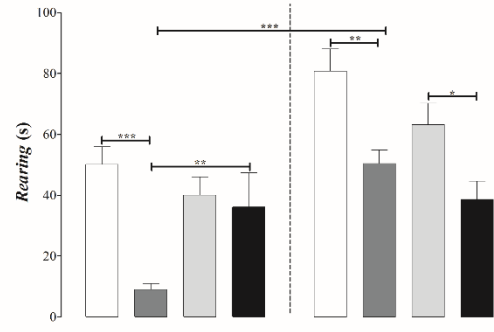
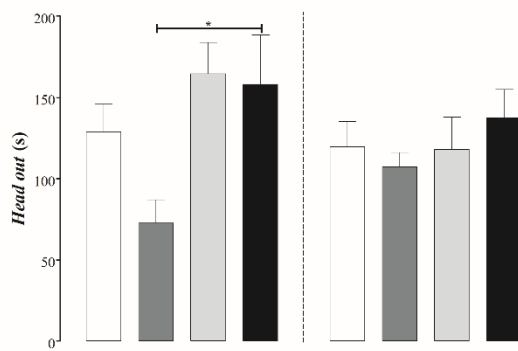
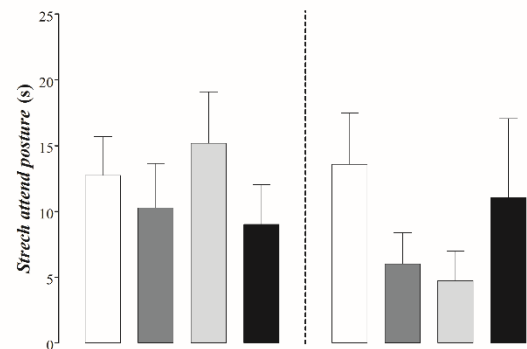
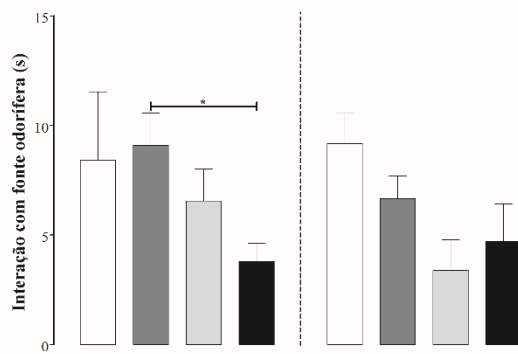
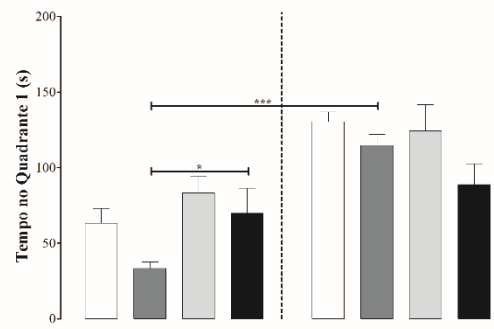
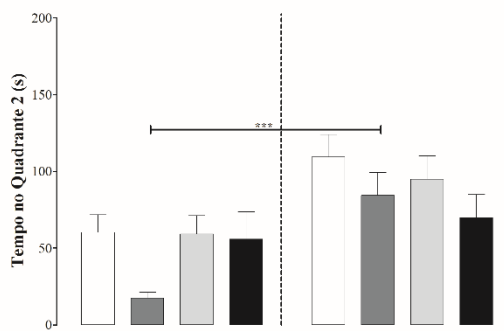
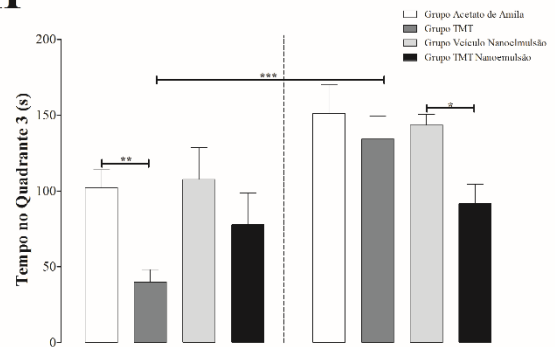
Resultados semelhantes foram observados para o comportamento de *Rearing* (Figura 15B), onde os animais TMT apresentaram menores valores em relação aos grupos Acetato de Amila (sessões de condicionamento [Acetato de Amila:  $50,21 \pm 5,80$  e TMT:  $9,082 \pm 1,94$ ] e teste

[Acetato de Amila:  $80,85 \pm 7,30$  e TMT:  $50,42 \pm 4,53$ ] e TMT Nanoemulsão (sessão de condicionamento [TMT:  $9,082 \pm 1,94$  e TMT Nanoemulsão:  $36,22 \pm 11,14$ ]). Houve efeito do tratamento também entre os grupos Veículo Nanoemulsão ( $63,20 \pm 6,98$ ) e TMT Nanoemulsão ( $38,69 \pm 5,97$ ) apenas para a sessão teste. Além disso, verificamos diferença significativa quando comparamos os resultados entre os dois dias ( $9,082 \pm 1,94$  versus  $50,42 \pm 4,53$ , para sessões de condicionamento e teste, respectivamente), para os animais do grupo TMT, indicando a ineficácia no condicionamento contextual.

Adicionalmente observamos menor tempo da expressão comportamental de *Head out* (Figura 15B) para os animais expostos à câmara saturada com TMT, com diferença significativa somente para o efeito da administração entre os grupos TMT ( $72,62 \pm 14,42$ ) versus TMT Nanoemulsão ( $158,2 \pm 30,41$ ), no dia do condicionamento. Enquanto para *Stretch attend posture* (Figura 15D) não observamos qualquer diferença entre os grupos, possivelmente pela importante dispersão dos dados. Para a variável Interação com a fonte odorífera (Figura 15E), observamos que na sessão de condicionamento os animais do grupo TMT Nanoemulsão ( $3,795 \pm 0,82$ ) tiveram menores valores, em relação aos animais expostos à câmara saturada com TMT ( $9,084 \pm 1,46$ ).

Os animais do grupo TMT também permaneceram menor tempo em todos os Quadrantes (Figura 15F-H), particularmente na sessão de condicionamento comparado ao grupo TMT Nanoemulsão (TMT:  $33,36 \pm 4,38$  versus TMT Nanoemulsão:  $69,86 \pm 16,47$ ), para a variável ocupação no Quadrante 1 (zona próxima à fonte de odor, Figura 15F). Adicionalmente, observamos diferença significativa entre os animais expostos ao Acetato de Amila ( $102,0 \pm 11,95$ ) versus TMT ( $39,77 \pm 8,26$ ), para ocupação no Quadrante 3 (zona próxima à toca, Figura 15H), durante a sessão de condicionamento. Tais dados indicam uma potencial correlação com os achados para o tempo de permanência na Toca, e juntos sugerem redução da atividade locomotora, durante a sessão de condicionamento.

Em resumo, nossos achados indicaram que o TMT induziu comportamentos defensivos durante a sessão de condicionamento. Diante disso, a sequência óbvia da hierarquia dos comportamentos segundo a literatura, é a ausência da expressão comportamental de medo condicionado, o que de fato observamos, indicando que o TMT não gera respostas defensivas, utilizando o paradigma de medo condicionado ao contexto (Figura 15).

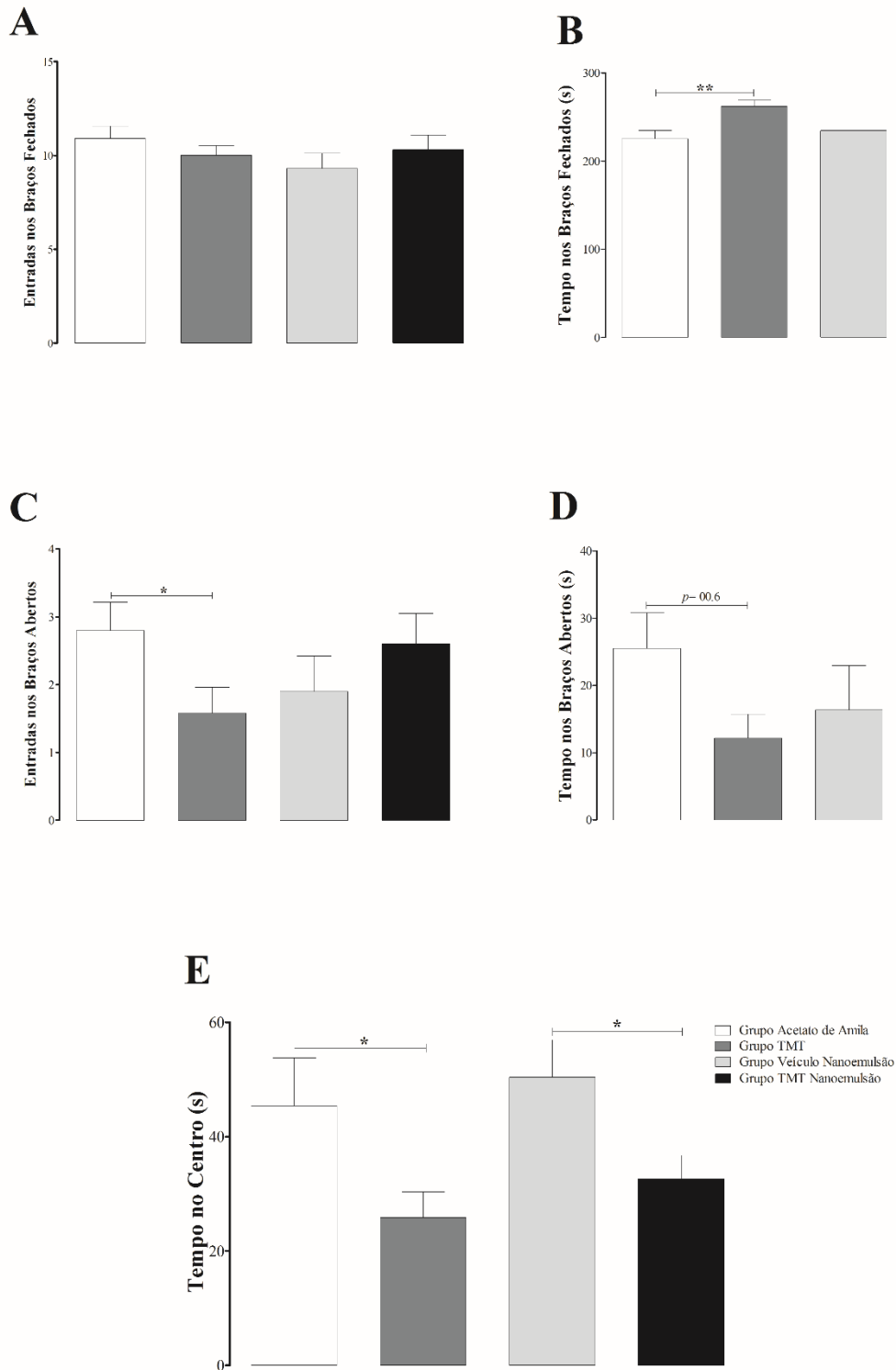
**A****B****C****D****E****F****G****H**



**Figura 15.** Parâmetros avaliados no Condicionamento Contextual (exposição [sessão de condicionamento] e reexposição [sessão teste] à câmara com duplo compartimento): (A) Tempo na Toca, (B) *Rearing*, (C) *Head Out*, (D) *Stretch Attent Posture*, (E) Interação com a fonte odorífera e tempo de permanência nos Quadrantes (F) 1, (G) 2 e (H) 3. Dados indicaram que ratos expostos ao TMT (grupo TMT) exibiram respostas comportamentais de medo inato, mas não condicionamento contextual. *Anova Two-Way* medidas repetidas com pós-teste de *Bonferroni*, enquanto para comparação do mesmo grupo entre sessões de condicionamento e teste, utilizamos os testes *Unpaired t* (F, G e H) ou *Mann Whitney* (A e B). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . N= 10 por grupo (com exceção do grupo TMT, N= 12). Barras indicam média±erro padrão da média.

### **6.5.1.3 RATOS EXPOSTOS À CAIXA SATURADA COM TMT EXIBIRAM COMPORTAMENTOS TIPO ANSIOSOS**

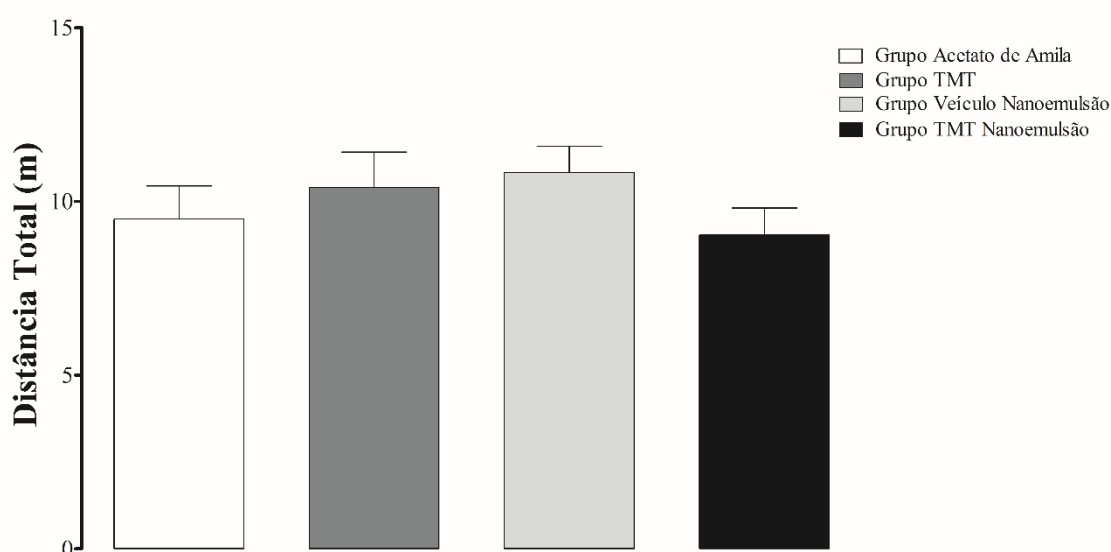
Animais do grupo TMT permaneceram um maior tempo nos braços fechados (Acetato de Amila [225,1±9,26] *versus* TMT [262,0±6,96]; teste *Unpaired t*,  $p < 0,001$ ) e um menor tempo nos braços abertos (Acetato de Amila [25,5±5,28] *versus* TMT [12,17±3,59]; teste *Mann Whitney*,  $p = 0,06$ ), em comparação ao grupo exposto ao Acetato de Amila. Adicionalmente, esses mesmos animais também tiveram uma redução significativa no número de entradas nos braços abertos (Acetato de Amila [2,8±0,41] *versus* TMT [1,58±0,37]; teste *Unpaired t*,  $p < 0,05$ ). E ainda, ambos os animais dos grupos TMT (Acetato de Amila [45,4±8,36] *versus* TMT [25,8±4,48]; teste *Unpaired t*,  $p < 0,05$ ) e TMT Nanoemulsão (Veículo Nanoemulsão [50,4±6,50] *versus* TMT Nanoemulsão [32,6±4,09]; teste *Unpaired t*,  $p < 0,05$ ) exibiram uma redução significativa no tempo gasto no centro do Labirinto em Cruz Elevado em relação aos seus respectivos grupos controles (Figura 16). Essa região é considerada "neutra" no labirinto, logo os animais expostos ao TMT ficaram menos tempo nessa região neutra, preferindo ficar no braço fechado (mais seguro ou menos aversivo), e menos tempo no braço aberto, o que dá suporte à observação de que ratos expostos ao TMT, apresentaram comportamentos tipo ansiosos, 24 h após a sessão de condicionamento.



**Figura 16.** Parâmetros avaliados no Labirinto em Cruz Elevado: (A) número de entradas nos braços fechados, (B) tempo gasto nos braços fechados, (C) número de entradas nos braços abertos, (D) tempo gasto nos braços abertos e (E) tempo no centro. Dados indicam que ratos expostos ao TMT (grupo TMT) exibiram comportamentos tipo ansiosos, 24 h após a sessão de condicionamento. (B, C e E) Teste *Unpaired t*. (A e D) Teste *Mann Whitney*. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ . N= 10 por grupo (com exceção do grupo TMT, N= 12). Barras indicam média±erro padrão da média.

#### 6.5.1.4 RATOS EXPOSTOS AO TMT (INCLUINDO NANOEMULSÃO) NÃO TIVERAM ALTERAÇÃO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA, OBSERVADA NO CAMPO ABERTO

Para a atividade motora, podemos observar na Figura 17, que não houve diferenças significativas na distância total percorrida avaliado pelo Campo Aberto, em nenhum dos grupos experimentais (Acetato de Amila [9,48±0,95], TMT [10,83±0,74], Veículo Nanoemulsão [9,03±0,77], TMT Nanoemulsão [10,40±1,01], teste *Unpaired t*,  $p>0,05$ ). É importante ressaltar que os testes comportamentais foram realizados preferencialmente no período da manhã (fase clara, 07:00-13:00 h).



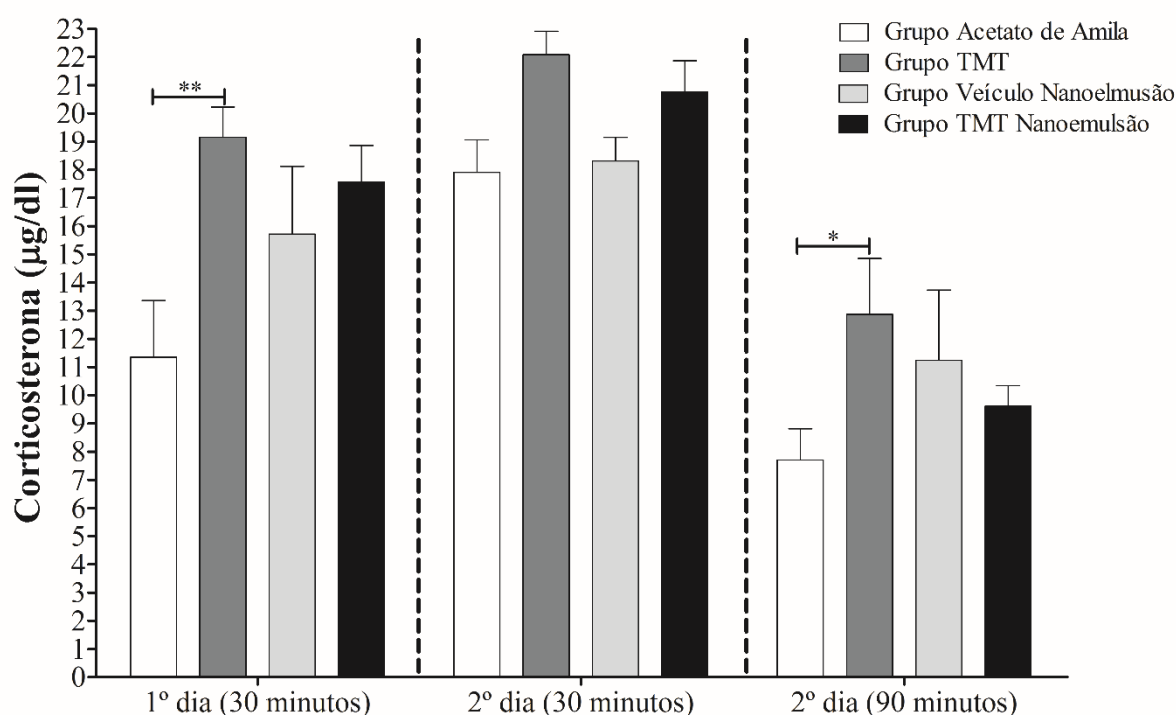
**Figura 17.** Distância total no Campo Aberto: realizado imediatamente após o Labirinto em Cruz Elevado (aproximadamente 25 min após o início da sessão teste), indica ausência de diferença significativa entre os grupos experimentais. Teste *Unpaired t*.  $p>0,05$ . N= 10 por grupo (com exceção do grupo TMT, N= 12). Barras indicam média±erro padrão da média.

#### 6.5.1.5 RATOS EXPOSTOS AGUDAMENTE AO TMT APRESENTARAM AUMENTO DA SECREÇÃO DE CORTICOSTERONA E DO PESO DAS ADRENAIS

Amostras de sangue para analisar a secreção de Corticosterona foram coletadas 30 min após o início da exposição ao TMT (incluindo nanoemulsão) ou a seus controles, no 1º (sessão de condicionamento) e no 2º dia (sessão teste). Além disso, foi coletada uma amostra adicional, 90 min após o início da reexposição ao contexto, no 2º dia (sessão teste). O TMT (grupo TMT) induziu um aumento significativo nos níveis de Corticosterona aos 30 min para o 1º dia (Acetato de Amila [11,35±2,01] *versus* TMT [19,15±1,07], Teste *Mann Whitney*,  $p<0,01$ ) e também 90

min após reexposição ao contexto no 2º dia (Acetato de Amila [7,69±1,11] *versus* TMT [12,87±1,97], Anova *Two-Way* medidas repetidas com pós-teste de *Bonferroni*,  $p < 0,05$ ).

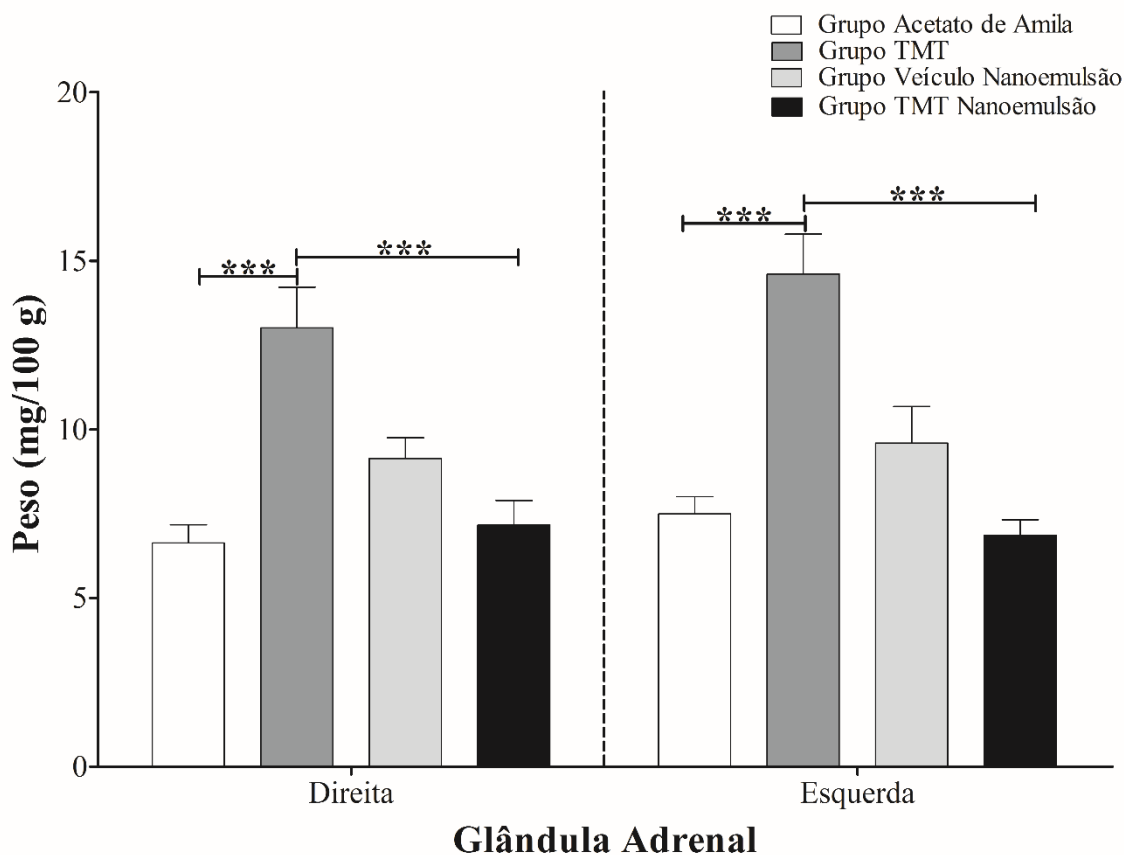
Além disso, o TMT (líquido) e TMT Nanoemulsão foram estatisticamente equivalentes aos 30 min ( $p = 0,21$ ) após a sessão de condicionamento, com diferença significativa apenas para a variável tempo ( $p < 0,0001$ ; 30 *versus* 90 min) no 2º dia, quando houve a reexposição ao contexto (sessão teste). Em conjunto, estes dados sugerem que os animais do grupo TMT demoram mais tempo para retornar à linha de base e indicam ausência do efeito da via de administração (Figura 18).



**Figura 18.** Dosagem de Corticosterona por radioimunoensaio: 30 minutos (min) após a sessão de condicionamento (1º dia), além de 30 e 90 min após a reexposição ao contexto (sessão teste, 2º dia), indicando o aumento da secreção da Corticosterona aos 30 min após a sessão de condicionamento (1º dia) e aos 90 min após a sessão teste (2º dia), para os animais do grupo TMT. Teste *Mann Whitney* (1º dia, 30 min). Anova *Two-Way* medidas repetidas com pós-teste de *Bonferroni* (2º dia). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ . N= 10 por grupo (com exceção do grupo TMT, N= 12). Barras indicam média±erro padrão da média.

Consistente com esses achados, o peso das Glândulas Adrenais de animais expostos ao TMT foi significativamente maior em relação ao controle ([DIREITA] Acetato de Amila [6,6±0,54] *versus* TMT [13,0±1,20]; teste *Unpaired t*;  $p < 0,001$ ; [ESQUERDA] Acetato de Amila [7,4±0,51] *versus* TMT [14,6±1,18]; teste *Unpaired t*,  $p < 0,001$ ) e também aos animais do grupo TMT Nanoemulsão ([DIREITA] TMT [13,0±1,20] *versus* TMT Nanoemulsão [7,1±0,72]; teste *Unpaired t*;  $p < 0,001$ ; [ESQUERDA] TMT [14,6±1,18] *versus* TMT

Nanoemulsão [ $6,87 \pm 0,45$ ]; teste *Mann Whitney*,  $p < 0,001$ ). Enquanto o peso da Adrenal não diferiu entre os grupos Veículo Nanoemulsão *versus* TMT Nanoemulsão (Figura 19).



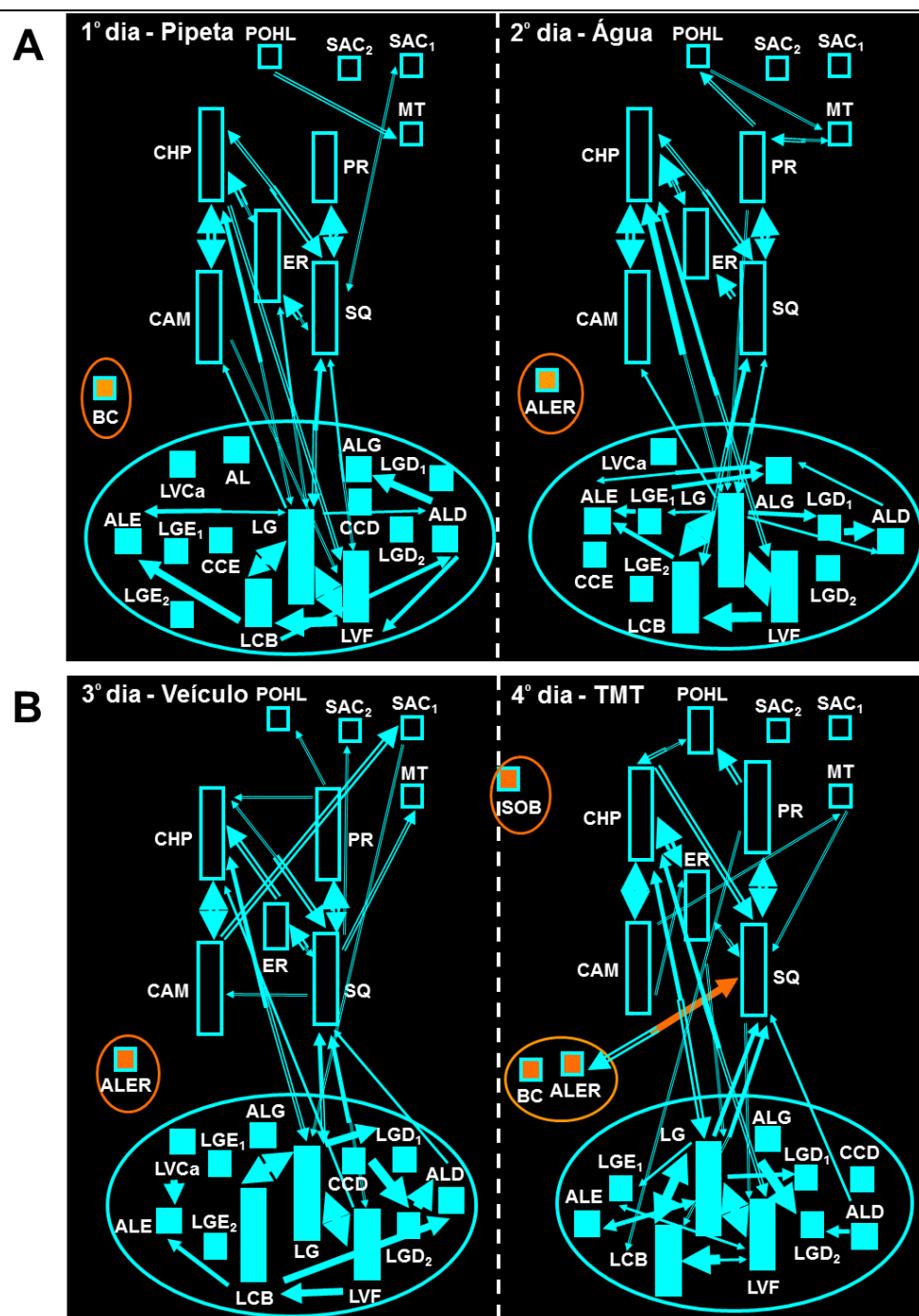
**Figura 19.** Peso das Glândulas Adrenais direita e esquerda: ratos expostos agudamente ao TMT apresentaram aumento do peso das Adrenais, indicando o efeito do tratamento com TMT (teste *Unpaired t*). Além disso, dados indicam efeito da administração, com peso significativamente maior nos animais expostos a câmara saturada com TMT *versus* TMT Nanoemulsão (testes *Unpaired t* [DIREITA] e *Mann Whitney* [ESQUERDA]). \*\*\* $p < 0,001$ . N= 10 por grupo (com exceção do grupo TMT, N= 12). Barras indicam média  $\pm$  erro padrão da média.

### 6.5.2 PROTOCOLO 2. EXPRESSÃO COMPORTAMENTAL DA ENTREGA NASAL DE NANOEMULSÃO CONTENDO TMT EM RATOS *WISTAR-OLD*

A exposição mecânica (sem odor) dos animais promoveu diferentes respostas comportamentais (24), particularmente de itens exploratórios e autolimpeza, além de comportamentos denominados como Outros e um comportamento de medo (bocejar [BC], elipse laranja), observados na Figura 20. Além disso, a administração intranasal com água provocou uma redução do número de itens comportamentais (22) em comparação com exposição mecânica (sem odor, 24), com aumento das interações (38, enquanto o estímulo mecânico causou 36) entre todos os pares comportamentais, juntamente com um comportamento semelhante ao medo (alerta [ALER], elipse laranja). Da mesma forma, a

---

nanoemulsão contendo veículo promoveu (praticamente) o mesmo número de interações (35) e itens comportamentais (22), em relação ao estímulo mecânico (interações [36]) e à água (itens comportamentais [22]) respectivamente, somados à presença de um comportamento de medo (ALER, elipse laranja). Mais importante, a nanoemulsão contendo TMT desencadeou reações complexas semelhantes ao medo, como ALER, BC e sobressalto (SOB), com importante redução da presença dos comportamentos de autolimpeza (autolimpeza direta [ALD], autolimpeza esquerda [ALE], autolimpeza de genitais [ALG], coçar a direita [CCD], lavar a cabeça [LCB], limpar as garras frontal [LG], limpar a garra anterior direita [LGD<sub>1</sub>], limpar a garra posterior direita [LGD<sub>2</sub>], limpar a garra anterior esquerda [LGE<sub>1</sub>] e lavar o focinho [LVF]; Figura 20) quando comparado a outras preparações (sem odor [14], água [12] e nanoemulsão contendo veículo [12]). De maneira intrigante, a liberação nasal de TMT nanoemulsão não interferiu substancialmente nas respostas comportamentais de medo inato de ratos *Wistar-Old*, associada à redução do comportamento de autolimpeza.



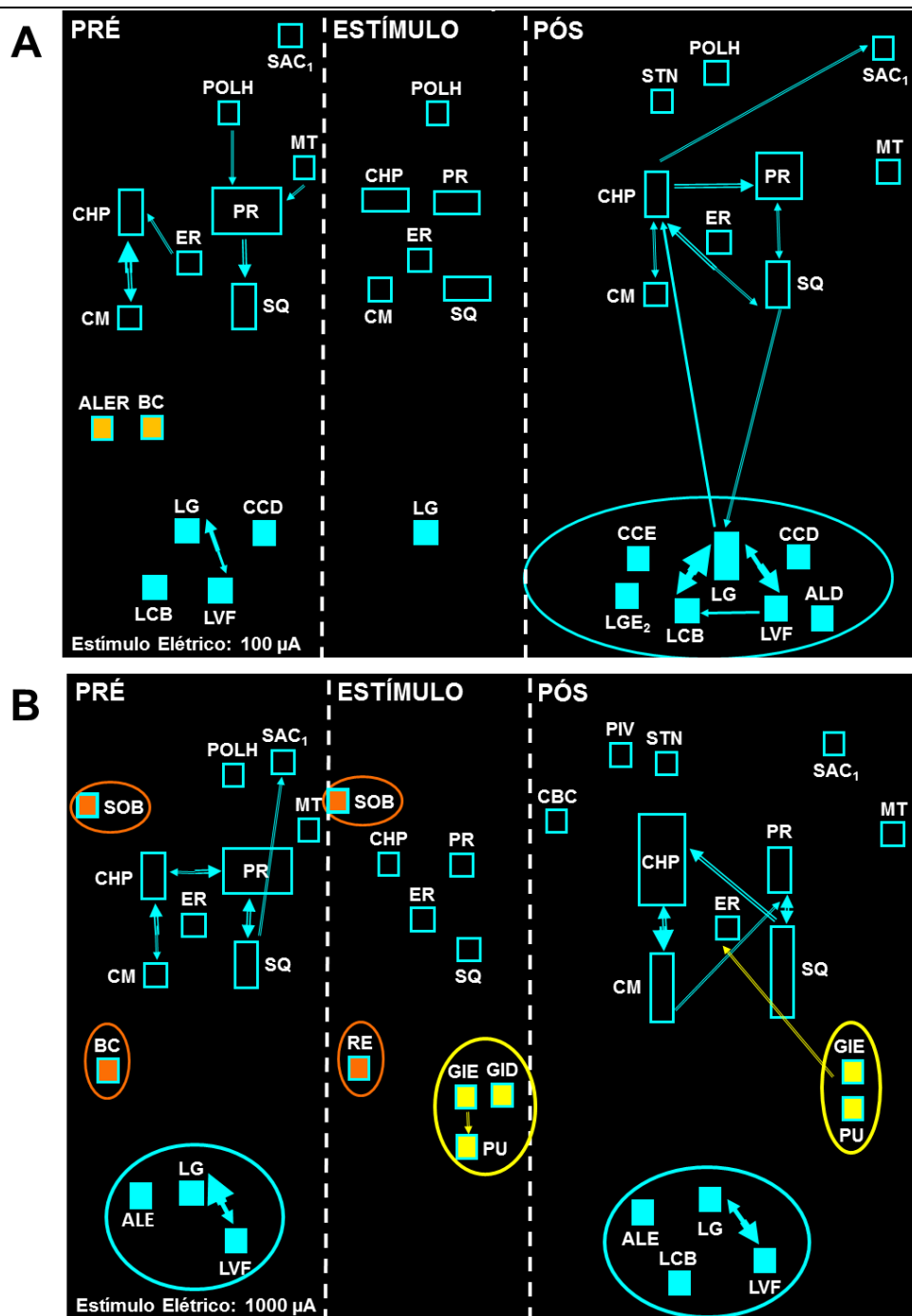
**Figura 20.** Fluxogramas com a soma dos comportamentos após estímulo mecânico (sem odor, A, ESQUERDA), administração nasal de água (A, DIREITA), nanoemulsão contendo veículo (B, ESQUERDA) e nanoemulsão contendo TMT (B, DIREITA). Período de observação de cinco min após a exposição às preparações. Em geral é possível verificar particularmente itens exploratórios e de autolimpeza, além da expressão de algumas respostas de medo inato, especialmente verificados após administração da nanoemulsão contendo TMT (B, DIREITA), incluindo: alerta (ALER), bocejar (BC) e sobressalto (SOB; elipses laranjas). Detalhes de calibração, como retângulos, setas e cores, consulte a Figura 13. Lista completa de siglas na Tabela Suplementar 1.

---

### 6.5.3 PROTOCOLO 3. ESTIMULAÇÃO HIPOTALÂMICA INDUZIU RESPOSTAS DEFENSIVAS

No período PRÉ (Figura 211A, 1º célula) do estímulo elétrico com intensidade de corrente de 100  $\mu$ A, que de fato corresponde ao *baseline*, podemos observar a presença dos comportamentos exploratórios, como cheirar exploratório (CHP), caminhar (CM), ereto (ER), parar (PR) e esquadrinhar (SQ), além de comportamentos descritos como automatismos orofaciais, incluindo: mastigar (MT), piscar os olhos (POLH) e sacudir a cabeça ( $SAC_1$ ), que para efeito de classificação todos se enquadram como comportamentos descritos como Outros (representados pelos retângulos azuis sem preenchimento). Também é possível observar a presença de quatro comportamentos de autolimpeza (representados pelos retângulos preenchidos em azul), tais como: CCD, LCB, LG e LVF. E ainda dois comportamentos de medo, ALER e BC. Já para o período de estímulo elétrico (Figura 21B, 3º célula), os animais mantiveram os seguintes comportamentos: CHP, CM, ER, PR, POHL e SQ, além do comportamento de autolimpeza de LG. Já no período posterior ao estímulo (PÓS, Figura 21A, 3º célula) os animais expressam os mesmos comportamentos observados no período PRÉ, com exceção do ALER e BC, somados aos novos comportamentos de ALD, coçar à esquerda (CCE), limpar a garra posterior esquerda ( $LGE_2$ ) e estendido (STN).





**Figura 21.** Evidências neuroetológicas do efeito da estimulação hipotalâmica nas respostas defensivas. Diferentes respostas comportamentais semelhantes ao medo foram induzidas pela estimulação elétrica (aos 100 e 1000  $\mu$ A), tais como: alerta (ALER), bocejar (BC), recuar (RE) e sobressalto (SOB; quadrados azuis preenchidos por laranja). Com importante acentuação dos comportamentos defensivos, particularmente durante o estímulo elétrico com intensidade de corrente de 1000  $\mu$ A, indicado pela presença dos seguintes comportamentos: GID, GIE e PU (quadrados azuis preenchidos em amarelo). Na primeira célula (esquerda) de cada estímulo, o período PRÉ, com duração de 01 minutos (min) anterior ao estímulo; na segunda célula (meio) o período do ESTÍMULO com 2 segundos, e finalmente na terceira célula (direita), o período PÓS também com duração de 01 min, após o estímulo. Detalhes de calibração, como retângulos, setas e cores, consulte a Figura 13. Lista completa de siglas na Tabela Suplementar 1.

Enquanto no período PRÉ do estímulo elétrico com intensidade de corrente de 1000  $\mu$ A (Erro! Fonte de referência não encontrada.1B, 1º célula), é possível verificar a presença dos

---

mesmos comportamentos descritos como Outros, observados também no período PRÉ do estímulo elétrico com 100  $\mu$ A, tais como: CHP, CM, ER, MT, POLH, PR, SAC<sub>1</sub> e SQ, além de três comportamentos de autolimpeza (ALE, LG e LVF) e dois comportamentos semelhantes ao medo: BC e SOB. Mais importante, para o período de estímulo (Figura 21B, 2º célula) foi possível verificar que em geral os animais expressavam a seguinte sequência de comportamentos: SOB, recuar (RE), girar a direita (GID) e/ou girar a esquerda (GIE), pular (PUL), além dos outros comportamentos nesta situação menos relevantes, como: CHP, ER, PR e SQ. Já no período posterior ao estímulo (PÓS, Figura 21B, 3º célula) os animais expressam no 1º segundo GIE ou PUL, e nos segundos restante observamos os comportamentos que se enquadram na classificação geral como Outros, com a subclassificação de comportamentos exploratórios (CHP, CM, ER, PR e SQ) e automatismos oro-faciais (cabeceio [CBC], MT, pivotar [PIV], SAC<sub>1</sub>), somado a quatro comportamentos de autolimpeza (ALE, LCB, LG e LVF).

Enquanto para estimulações com correntes intermediárias (200-900  $\mu$ A) observamos os comportamentos descritos na Tabela 5.

**Tabela 5.** Caracterização histológica e comportamental da estimulação elétrica progressiva hipotalâmica.

Animais	Análise histológica	Intensidade do estímulo elétrico	Descrição dos comportamentos observados
01	Região Tuberal Hipotâmico Lateral	200 $\mu$ A	Corrida
		300 $\mu$ A	Corrida
		400 $\mu$ A	Elevação
		500 $\mu$ A	Giros à esquerda
		600 $\mu$ A	Sobressalto, giros à esquerda com vocalização
		700 $\mu$ A	Giros à esquerda com vocalização
		800 $\mu$ A	Sobressalto, giros à esquerda com vocalização
		900 $\mu$ A	Sobressalto, giros à esquerda com vocalização
		200 $\mu$ A	Nenhum
02	Núcleo Hipotalâmico Ventromedial	300 $\mu$ A	Mioclonias de patas anteriores
		400 $\mu$ A	Piscar os olhos e giro à esquerda
		500 $\mu$ A	Mastigação e giro à esquerda
		600 $\mu$ A	Giro a esquerda, giro à direita
		700 $\mu$ A	Giro à esquerda
		800 $\mu$ A	Giro à esquerda
		900 $\mu$ A	Giro à esquerda
		200 $\mu$ A	Nenhum
		300 $\mu$ A	Nenhum
03	Núcleo Hipotalâmico Ventromedial	400 $\mu$ A	Nenhum
		500 $\mu$ A	Giro à esquerda
		600 $\mu$ A	Giro à esquerda
		700 $\mu$ A	Recuo, giro à esquerda com vocalização
		800 $\mu$ A	Vocalização
		900 $\mu$ A	Sobressalto, giros à esquerda com vocalização
		200 $\mu$ A	Nenhum
		300 $\mu$ A	Nenhum
		400 $\mu$ A	Nenhum
04	Núcleo Hipotalâmico Ventromedial	500 $\mu$ A	Nenhum
		600 $\mu$ A	Nenhum
		700 $\mu$ A	Giro à esquerda
		800 $\mu$ A	Sobressalto e giro à esquerda
		900 $\mu$ A	Sobressalto e giros à esquerda
		200 $\mu$ A	Sobressalto e giros à esquerda
		300 $\mu$ A	Giro à esquerda
		400 $\mu$ A	Piscar os olhos e giro à esquerda
		500 $\mu$ A	Piscar de olhos, giros à esquerda e pulos
05	Núcleo Hipotalâmico Ventromedial	600 $\mu$ A	Giros à esquerda, pulos e queda atônica
		700 $\mu$ A	Giros à esquerda e pulos
		800 $\mu$ A	Sobressalto, giros à esquerda, pulos e queda atônica
		900 $\mu$ A	Sobressalto, giros à esquerda e pulos
		200 $\mu$ A	Sobressalto, giros à esquerda e pulos
		300 $\mu$ A	Nenhum
		400 $\mu$ A	Nenhum
		500 $\mu$ A	Sobressalto, piscar os olhos e giros à esquerda
		600 $\mu$ A	Sobressalto e giros à esquerda
06	Núcleo Hipotalâmico Ventromedial	700 $\mu$ A	Sobressalto e giro à esquerda
		800 $\mu$ A	Sobressalto, piscar os olhos e giros à esquerda
		900 $\mu$ A	Giro à esquerda
		200 $\mu$ A	Sobressalto e giros à esquerda
		300 $\mu$ A	Nenhum
		400 $\mu$ A	Mioclonia de orelha
		500 $\mu$ A	Pivotear
		600 $\mu$ A	Sacudir a cabeça
		700 $\mu$ A	Esquadrinhar
08	Núcleo Hipotalâmico Ventromedial	700 $\mu$ A	Caminhar e esquadrinhar

		800 $\mu$ A	Sobressalto, elevação e giro à esquerda
		900 $\mu$ A	Sobressalto e giro à esquerda
		200 $\mu$ A	Corrida
		300 $\mu$ A	Nenhum
		400 $\mu$ A	Piscar os olhos e giro à esquerda
09	Núcleo Hipotalâmico Ventromedial	500 $\mu$ A	Giros à esquerda
		600 $\mu$ A	Piscar os olhos e giro à esquerda
		700 $\mu$ A	Sobressalto e giro à esquerda
		800 $\mu$ A	Sobressalto e giros à esquerda
		900 $\mu$ A	Sobressalto, giros à esquerda com vocalização
Para maiores detalhes ver item 6.3.4.			

Em conjunto a estimulação hipotalâmica, particularmente do Hipotálamo Ventromedial região Dorsomedial, induziu expressivos comportamentos defensivos semelhantes a fuga, ou aqueles comportamentos observados durante a fase inicial (procurativa) de uma crise audiogênica aguda em animais da linhagem *WAR* (GARCIA-CAIRASCO et al., 1996).

## 6.6 DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstraram que todos os animais são capazes de responder ao condicionamento Pavloviano, observado pela resposta de Sobressalto Potencializada pelo Medo, entretanto nossos dados indicaram que o TMT não gerou respostas defensivas utilizando o paradigma de medo condicionado ao contexto. Além disso, ratos expostos à câmara saturada com TMT exibiram comportamentos tipo ansiosos, mas não tiveram a atividade locomotora alterada. E ainda surpreendentemente, uma única exposição ao TMT (líquido) foi capaz de sensibilizar significativamente a Glândula Adrenal, o que foi demonstrado pelo seu aumento do peso. Tais achados são consistentes com o aumento do nível de Corticosterona neste grupo, particularmente aos 30 e 90 min após as sessões de condicionamento e teste, respectivamente. Além disso, apesar de bastante preliminares, nossos resultados indicaram que a entrega nasal da nanoemulsão contendo TMT não interferiu substancialmente nas respostas comportamentais de medo inato de ratos *Wistar-Old*, associada à redução do comportamento de autolimpeza. E finalmente, a estimulação Hipotalâmica, particularmente do núcleo Ventromedial, induziu expressivos comportamentos defensivos, tais como giros e PU, de fato uma típica resposta de fuga.

O medo condicionado Pavloviano é uma forma de aprendizagem que consiste no pareamento entre um estímulo neutro (estímulo condicionado), por exemplo, um contexto experimental ou uma pista discreta, como um estímulo de luz, som ou odor neutro, seguido por um estímulo inerentemente aversivo (estímulo incondicionado), tipicamente um choque nas patas, resultando na expressão de respostas de medo ao estímulo originalmente neutro (resposta

---

condicionada), semelhantes às aquelas produzidos pelo estímulo aversivo (ENDRES; FENDT, 2007; LEDOUX, 2000). De fato, diversos estudos vêm empregando a amplitude da resposta ao Sobressalto Potencializado pelo Medo, como avaliação do estado de medo condicionado, por permitir a produção de respostas aversivas muito semelhantes em diferentes espécies de animais e em humanos (ROSEN, 2004), além disso, apresenta como vantagem o controle pelo experimentador de diversos parâmetros como duração e intensidade do choque, além do intervalo entre os estímulos utilizados no teste. O Sobressalto Potencializado pelo Medo foi proposto pela primeira vez por Brown e colaboradores em (1951), e consistiu no pareamento da luz seguida pelo choque de pequena intensidade. Normalmente, durante um estímulo sonoro inesperado, o animal apresenta um sobressalto acústico (resultado da contração muscular súbita de diferentes músculos do corpo), que após o condicionamento, o animal apenas ao ver a luz e sequencialmente ouvir o som intenso, apresenta uma resposta de sobressalto, ou seja, a resposta de sobressalto foi potencializada pelo medo, com amplitude significativamente superior do que se o som tivesse sido apresentado sozinho, ou seja, sem a presença da luz (rever item 6.5.1.1.), indicando a efetividade do medo condicionado (Protocolo 1).

Alternativamente estímulos etologicamente relevantes, incluindo odores de predadores podem ser altamente eficazes para induzir comportamentos defensivos em roedores (ENDRES; FENDT, 2007), dentre eles o odor de gato ou a exposição direta ao gato, que tem sido amplamente utilizado como um importante e consistente indutor de medo incondicionado em roedores, além de claramente suportar o medo condicionado (BINDI; BALDO; CANTERAS, 2018; BLANCHARD; GRIEBEL; BLANCHARD, 2003; CEZARIO et al., 2008; DIELENBERG; MCGREGOR, 2001; MCGREGOR et al., 2002; RIBEIRO-BARBOSA et al., 2005; STAPLES et al., 2005, 2008; STAPLES; MCGREGOR, 2006; TAKAHASHI et al., 2007; ZANGROSSI; FILE, 1992). Enquanto nossos resultados indicam que embora o TMT líquido (Protocolo 1) tenha demonstrado um forte comportamento incondicionado em ratos durante a sessão de condicionamento (similar ao paradigma de medo inato, também observado no Protocolo 2), com a expressão dos seguintes comportamentos: maior permanência na Toca, menor *Rearing*, *Head out* e tempo em todos os Quadrantes, este não demonstrou as respostas defensivas condicionadas ao contexto (rever item 6.5.1.2.).

De fato, a ausência de respostas defensivas durante o condicionamento com o TMT, sugere que esse composto pode ser um odor aversivo, não específico da ameaça, com seus efeitos baseados nas suas propriedades nocivas, similares às aquelas obtidas com outros odores químicos pungentes, como tolueno e outros (APFELBACH et al., 2005; BLANCHARD et al., 2003; CANTERAS et al., 2008b; DAY; MASINI; CAMPEAU, 2004; FENDT et al., 2005;

---

MCGREGOR et al., 2002). Esses achados permitem considerar a possibilidade de que o TMT ative não apenas o sistema olfatório principal (AYERS et al., 2013; HACQUEMAND; JACQUOT; BRAND, 2010; KOBAYAKAWA et al., 2007; ZIBROWSKI; VANDERWOLF, 1997), mas também fibras intranasais do nervo trigêmeo (que desencadeia reflexos protetores específicos [BOYLE et al., 2007; BRAND, 2006; FENDT et al., 2005; GALLIOT et al., 2012; HACQUEMAND et al., 2013; HACQUEMAND; JACQUOT; BRAND, 2010]) além do Gânglio de Grüneberg (BRECHBÜHL et al., 2013). Por outro lado, como citado, alguns estudos sugerem que pistas odoríferas provenientes das fezes ou urina de predadores, incluindo do gato, têm baixa predição espacial e temporal (odores duráveis que normalmente servem para marcar limites territoriais, além da natureza volátil que possibilita ser um sinal olfatório de longa distância [ROSEN; ASOK; CHAKRABORTY, 2015]), comparado a outras apresentações, como coleira, pano friccionado nos pêlos ou pela própria exposição ao animal, que indicam um risco iminente, factível e, portanto, real (BLANCHARD et al., 2003, 2001; BLANCHARD; GRIEBEL; BLANCHARD, 2003; CANTERAS et al., 2008; ROSEN et al., 2008). Neste contexto, pode-se notar que o odor da coleira do gato é detectado apenas até 5 cm de distância (DIELENBERG; MCGREGOR, 2001) enquanto Blanchard e colaboradores (2000) observaram que o odor do gato sugere uma distância efetiva de aproximadamente 30 cm, logo as distâncias para detecção são relativamente curtas e sua natureza transitória, na perspectiva ecológica, sinaliza a presença próxima da ameaça ou perigo (além da potencial não volatilidade do odor de gato sugerido por DIELENBERG; MCGREGOR, 2001).

<b>Tabela 6.</b> Fatores que potencialmente interferem nas respostas defensivas.	
<b>Variáveis</b>	<b>Referências</b>
Contexto da apresentação do odor	(DIAS SOARES et al., 2003; ENDRES; APFELBACH; FENDT, 2005; FENDT; ENDRES, 2008; FENDT; ENDRES; APFELBACH, 2003; FORTES-MARCO et al., 2015; HACQUEMAND et al., 2013; MORROW et al., 2000b; ROSEN et al., 2008; THOMAS; URBAN; PETERSON, 2006) (DAY; MASINI; CAMPEAU, 2004; ENDRES; APFELBACH; FENDT, 2005; FENDT; ENDRES, 2008; FENDT; ENDRES; APFELBACH, 2003; MORROW; ELSWORTH; ROTH, 2002; ROSEN et al., 2008; ROSEN; ASOK; CHAKRABORTY, 2015; WALLACE; ROSEN, 2000)
Características da câmara	(DIAS SOARES et al., 2003; ENDRES; APFELBACH; FENDT, 2005; FENDT; ENDRES, 2008; HACQUEMAND et al., 2013; ROSEN; WEST; DONLEY, 2006; STAPLES; MCGREGOR, 2006)
Componente genético (linhagem)	(ASOK et al., 2013; BLANCHARD et al., 2003; ENDRES; APFELBACH; FENDT, 2005; FENDT; ENDRES, 2008; HACQUEMAND et al., 2013; KOBAYAKAWA et al., 2007; LASKA et al., 2005a; ROSEN et al., 2008; ROSEN; WEST; DONLEY, 2006; THOMAS; URBAN; PETERSON, 2006; WALLACE; ROSEN, 2000)
Concentração de TMT	(ROSEN et al., 2008; THOMAS; URBAN; PETERSON, 2006)
Duração da exposição	(ENDRES; APFELBACH; FENDT, 2005; WALLACE; ROSEN, 2000)
Condições ambientais que os ratos foram criados e mantidos	(ENDRES; APFELBACH; FENDT, 2005; WALLACE; ROSEN, 2000)

(TMT) 2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline.

Adicionalmente, existe uma série de fatores que pode interferir efetivamente nas respostas defensivas, consideradas na Tabela 6, como a linhagem de ratos utilizada, neste sentido a literatura indica que as linhagens *Sprague Dawley* e *Long Evans* são mais responsivas e, portanto, mais sensíveis às propriedades indutoras de medo ao TMT (possivelmente por variação genética nas populações de receptores olfatórios, em particular receptores olfatórios dorsais classe II [KOBAYAKAWA et al., 2007]) comparado à linhagem *Wistar-Old*, embora a causa não seja totalmente clara (ROSEN; WEST; DONLEY, 2006). Além disso, enquanto, segundo dados da literatura, uma única exposição ao gato ou ao seu odor induz de forma confiável o medo condicionado (BINDI; BALDO; CANTERAS, 2018; BLANCHARD; GRIEBEL; BLANCHARD, 2003; CEZARIO et al., 2008; DIELENBERG; MCGREGOR, 2001; MCGREGOR et al., 2002; RIBEIRO-BARBOSA et al., 2005; STAPLES et al., 2005, 2008; STAPLES; MCGREGOR, 2006; TAKAHASHI et al., 2007; ZANGROSSI; FILE, 1992), uma associação similar de medo induzido pelo TMT pareado ao contexto foi encontrada apenas sob condições muito limitadas (FORTES-MARCO et al., 2015; ROSEN, 2004; ROSEN et al., 2008), e não em todos (BLANCHARD et al., 2003; MCGREGOR et al., 2002; MORROW et

---

al., 2000a; WALLACE; ROSEN, 2000), particularmente com uma configuração de câmara considerada semi naturalista, composta de duplo compartimento (FORTES-MARCO et al., 2015; ROSEN, 2004; ROSEN et al., 2008), que segundo a literatura permite estratégias de enfrentamento mais complexas e diversas. Entretanto nossos achados, como citado, indicaram que o pareamento utilizando configurações experimentais similares ao descrito por Rosen e colaboradores (2008), com ratos *Sprague Dawley* não demonstrou o medo condicionado ao contexto utilizando o TMT. Adicionalmente, outro experimento (dados não mostrados) com dupla sessão de condicionamento (tempo de exposição: 20 min/dia), utilizando para tanto, o teste de Aversão Condicionada ao Lugar, também confirmaram nossos primeiros achados, indicando ausência do condicionamento contextual ao TMT em ratos *Wistar-Old* e *SpragueDawley*, apesar do aumento no tempo total (40 min) para sessão de condicionamento.

De maneira intrigante, e para ser investigado em futuros protocolos (até para descartar potenciais problemas na preparação da nanoemulsão ou interferência química do encapsulamento do TMT nas suas propriedades odoríferas ou liberação do conteúdo nanoencapsulado em tempo diferente daquele proposto como imediato, logo os efeitos podem ter sido tardios no preparo da nanoemulsão), a entrega nasal de nanoemulsão contendo TMT (alta concentração) não induziu respostas típicas defensivas inatas em ratos *Sprague Dawley*, comparadas com aquelas observadas com o TMT líquido. Por outro lado, durante a reexposição ao contexto, sem a administração do odor, não foi possível verificar diferença significativa, indicando também falha no condicionamento contextual com nanoemulsão contendo TMT (Protocolo 1). Apenas como alerta, quando observamos sistematicamente o comportamento inato (através da neuroetologia) de ratos *Wistar-Old* após administração nasal de nanoemulsão contendo TMT (alta concentração), em uma câmara com único compartimento (Protocolo 2), observamos maior expressão comportamental (ALER, BC e SOB), com diferentes estratégias de defesa anteriormente não pontuadas, dado a caracterização apenas dos itens defensivos comumente descritos na literatura (BINDI; BALDO; CANTERAS, 2018; BLANCHARD et al., 2003; CEZARIO et al., 2008; DIELENBERG; MCGREGOR, 2001; MCGREGOR et al., 2002; RIBEIRO-BARBOSA et al., 2005; ROSEN et al., 2008; STAPLES et al., 2005, 2008; STAPLES; MCGREGOR, 2006; TAKAHASHI et al., 2007; WALLACE; ROSEN, 2000; ZANGROSSI; FILE, 1992). Não há dúvida, entretanto quanto as respostas inatas de ratos *Sprague Dawley* submetidos ao TMT líquido, tais respostas foram significativamente claras quando comparadas aquelas com administração nasal de nanoemulsão com TMT (Protocolo 1). Em conjunto, esses resultados refletem um cenário complexo, em que os comportamentos induzidos por odor inato são dependentes do contexto, particularmente das características da



câmara, somados à linhagem de rato utilizada e os parâmetros comportamentais analisados, interferindo criticamente na expressão ou representação comportamental de medo. Esta complexidade indica a necessidade de mais pesquisas, claramente demonstrada pela ampla heterogeneidade (ou falta de consistência) de efeitos descritos na literatura (Tabela 4 e 7), após exposição ao TMT.

**Tabela 7.** Respostas comportamentais e endócrinas inatas induzidas pelo TMT.

Comportamentos	Referências
Congelamento	(ASOK et al., 2013; AYERS et al., 2013; BLANCHARD et al., 2003; ENDRES; APFELBACH; FENDT, 2005; FENDT; ENDRES; APFELBACH, 2003; GALLIOT et al., 2012; HACQUEMAND; JACQUOT; BRAND, 2010; HORII et al., 2010; JANITZKY et al., 2015b; NIKAIDO; NAKASHIMA, 2009; ROSEN; WEST; DONLEY, 2006; WALLACE; ROSEN, 2000)
<i>Avoidance</i>	(BLANCHARD et al., 2003; FORTES-MARCO et al., 2015; HACQUEMAND; JACQUOT; BRAND, 2010; HOLMES; GALEA, 2002; KOBAYAKAWA et al., 2007; ROSEN; WEST; DONLEY, 2006; WALLACE; ROSEN, 2000)
Redução da atividade motora	(ENDRES; APFELBACH; FENDT, 2005; HACQUEMAND et al., 2013; HORII et al., 2010; NIKAIDO; NAKASHIMA, 2009; ROOT et al., 2014; THOMAS; URBAN; PETERSON, 2006; VERNET-MAURY; POLAK; DEMAEL, 1984; WALLACE; ROSEN, 2000)
Redução da autolimpeza	(JANITZKY et al., 2015b; NIKAIDO; NAKASHIMA, 2009; THOMAS; URBAN; PETERSON, 2006)
Ativação da função autonômica	(HORII et al., 2010)
Ativação do eixo HPA	(DAY; MASINI; CAMPEAU, 2004; DIAS SOARES et al., 2003; GALLIOT et al., 2012; HOLMES; GALEA, 2002; KOBAYAKAWA et al., 2007; MORROW et al., 2000b; MORROW; ELSWORTH; ROTH, 2002; NIKAIDO; NAKASHIMA, 2009; THOMAS; URBAN; PETERSON, 2006; VERNET-MAURY; POLAK; DEMAEL, 1984)

(TMT) 2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline e (HPA) eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal.

Medo e ansiedade são respostas defensivas adaptativas, enquanto o medo é tradicionalmente considerado uma resposta a uma ameaça imediata (definida), a ansiedade por sua vez é descrita como uma resposta a uma ameaça ambígua (percebida, mas não inexistente ou indefinida), dependentes em parte de diferentes circuitos neurobiológicos (HACQUEMAND et al., 2013). Estudos anteriores mostraram especificamente que altas concentrações do odor de predador induzem respostas relacionadas à ansiedade e ao medo, enquanto baixas concentrações induzem apenas comportamentos tipo ansiosos (BLANCHARD et al., 2008; HACQUEMAND et al., 2013). Nossos resultados no Labirinto em Cruz Elevado mostraram que o TMT líquido provocou efeitos ansiogênicos generalizados para outro

---

ambiente, ou seja, nesta condição os ratos tiveram menor número de entradas associado ao maior tempo, ambos nos braços fechados, considerado como índice de ansiedade. Por outro lado, nenhuma diferença foi observada nas características da atividade locomotora avaliadas através do Campo Aberto. Em conjunto, esses achados sugerem que ratos expostos ao TMT apresentaram comportamentos tipo ansiosos 24 h após a exposição, mas não tiveram a atividade locomotora alterada, e ainda sugere que a concentração de TMT não induziu efeitos tóxicos que poderiam se refletir em ataxia ou acinesia.

De fato, estudos anteriores demonstraram que apesar do TMT não induzir prontamente o condicionamento contextual ao medo, pode provocar um efeito de sensibilização generalizada (FENDT et al., 2005; HACQUEMAND et al., 2013). Após a exposição ao TMT (10 min de exposição), Hebb e colaboradores (2003) demonstraram que camundongos apresentaram potencialização da resposta ao sobressalto acústico, que duravam até 168 h. Camundongos e ratos expostos ao TMT também apresentaram aumento do comportamento tipo ansioso no Labirinto em Cruz Elevado (dado o menor tempo nos braços abertos), no Campo Aberto e na Caixa Claro-Escuro, que pode durar até 3 dias (FENDT et al., 2005; HACQUEMAND et al., 2013; NASCA et al., 2013), embora surpreendentemente, McGregor e colaboradores (2002) descreveram que o TMT puro não teve efeito sobre esse parâmetro em comparação ao controle. Adicionalmente também foi demonstrado que TMT 10% induziu um efeito mais robusto (congelamento no campo aberto) comparado ao seu equivalente natural (odor das fezes da raposa, BURON et al., 2007), enquanto o oposto foi encontrado por Rampin e colaboradores (2018), estudando apenas o efeito do TMT no comportamentos de congelamento (frequência e duração).

Além disso, vários estudos demonstraram que a exposição ao TMT ativa o sistema Simpatoadrenomedular (SAM, CURTIS et al., 2012; HORII et al., 2010; JANITZKY et al., 2015) e o eixo HPA (DAY; MASINI; CAMPEAU, 2004; DIAS SOARES et al., 2003; GALLIOT et al., 2012; HOLMES; GALEA, 2002; KOBAYAKAWA et al., 2007; MORROW et al., 2000; MORROW; ELSWORTH; ROTH, 2002; NIKAIDO; NAKASHIMA, 2009; THOMAS; URBAN; PETERSON, 2006; VERNET-MAURY; POLAK; DEMAEL, 1984) em camundongos e ratos, além de um padrão de expressão cerebral do Fos sugestivo de estresse intenso (JANITZKY et al., 2015). Além disso, Morrow e colaboradores (2000) demonstraram que a exposição ao TMT aumentou a Corticosterona sérica, mas não alterou nenhum dos comportamentos avaliados em seu estudo, associado ao aumento do nível do hormônio Adrenocorticotrófico (DAY; MASINI; CAMPEAU, 2004). O odor de gato também induziu

---

esse efeito em ratos (FILE et al., 1993; TAKAHASHI, 2014), confirmando a sua natureza estressora.

Em consonância com esses achados, mostramos que o nível de Corticosterona plasmática aumentou drasticamente, particularmente aos 30 e 90 min, após a exposição e reexposição ao contexto pareado com TMT, respectivamente. Considerando a síntese e liberação da Corticosterona em resposta ao estresse, surpreendentemente observamos que uma única exposição foi capaz de aumentar o peso da Glândula Adrenal (córtex adrenal, zona fasciculada), indicando uma intensa resposta endócrina de medo ao predador para o grupo TMT (Figura 19). Da mesma forma, situações estressantes que não a exposição a predadores, como o estresse físico e psicológico (no início da vida), também aumentaram a resposta à Corticosterona (GODOY et al., 2018a, para revisão sobre Estresse ver GODOY et al., 2018b). No entanto, de acordo com nossos achados, o aumento nos níveis de Corticosterona não parece ser crítica para a expressão de comportamentos defensivos condicionado ao contexto, particularmente para o grupo exposto à câmara saturada com TMT.

Importantes avanços ocorreram nas últimas duas décadas, na compreensão da base neural do medo inato ao TMT, indicando a ativação crítica das seguintes estruturas: receptores olfatórios dorsais da classe II (HACQUEMAND; JACQUOT; BRAND, 2010; KOBAYAKAWA et al., 2007; SAITO et al., 2017) e o Gânglio de Grüneberg (BRECHBÜHL et al., 2013) que projetam para o domínio II do Bulbo Olfatório Principal Dorsal (AYERS et al., 2013; DAY; MASINI; CAMPEAU, 2004; JANITZKY et al., 2015c; KOBAYAKAWA et al., 2007; ROOT et al., 2014; SAITO et al., 2017), que ativam a Amígdala Cortical (ROOT et al., 2014; SAITO et al., 2017), seguida pela Amígdala Medial (FENDT; ENDRES; APFELBACH, 2003; JANITZKY et al., 2015c; SAITO et al., 2017) que envia projeções para o Núcleo Leito da Estria Terminal (ASOK et al., 2013; DAY; MASINI; CAMPEAU, 2004; FENDT; ENDRES; APFELBACH, 2003; JANITZKY et al., 2015c; SAITO et al., 2017), que finalmente envia informações para Substância Cinzenta Periaquedutal (para revisões ver ROSEN; ASOK; CHAKRABORTY, 2015; TAKAHASHI, 2014, JANITZKY et al., 2015), além da modulação de outras estruturas nas respostas fisiológicas e comportamentais de medo, listadas na Tabela 8. Enquanto no condicionamento contextual, o processamento neural para o TMT, presumivelmente envolve receptores olfatórios ventrais (KOBAYAKAWA et al., 2007) e o Gânglio de Grüneberg (BRECHBÜHL et al., 2013), que projetam para o Bulbo Olfatório Principal, então as células mitrais/tufosas enviam projeções para o Córtex Piriforme, para aprendizagem relacionada ao TMT, e para o Córtex Entorrinal que possui importantes projeções para o Hipocampo Dorsal, particularmente envolvido no aprendizado contextual (ROSEN;

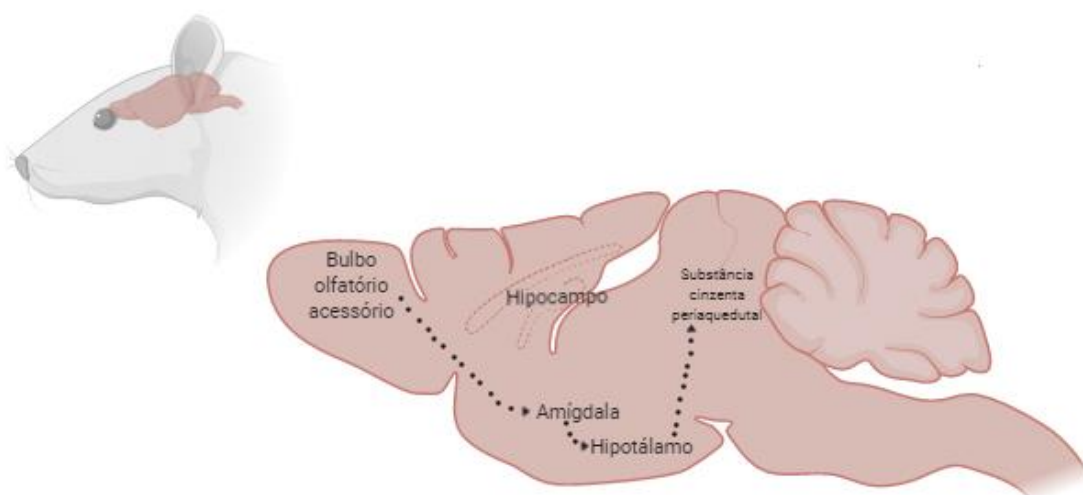
ASOK; CHAKRABORTY, 2015; TAKAHASHI, 2014). Além disso o Complexo Amigdalóide, especialmente os núcleos BLA (que inclui os núcleos Lateral, Basolateral e Basomedial) e Medial recebem projeções diretas e indiretas do Bulbo Olfatório Principal, além do envolvimento do Núcleo Leito da Estria Terminal e Substância Cinzenta Periaquedutal (ROSEN, 2004; ROSEN; ASOK; CHAKRABORTY, 2015; TAKAHASHI, 2014). Entretanto as informações dos sítios neurais específicos ativados pelo TMT durante o condicionamento ao contexto são absolutamente escassas, obviamente pela dificuldade em reproduzir tal paradigma.

**Tabela 8.** Efeitos do TMT na modulação de diferentes estruturas após paradigma de medo inato.

<b>Estruturas</b>	<b>Referências</b>
Epitélio Olfatório Primário	(HACQUEMAND; JACQUOT; BRAND, 2010; SAITO et al., 2017)
Basolateral	(MORROW et al., 2000b; MORROW; ELSWORTH; ROTH, 2002)
Amígdala	(ASOK et al., 2013; DAY; MASINI; CAMPEAU, 2004)
Central	(ASOK et al., 2013; DAY; MASINI; CAMPEAU, 2004)
Hipotálamo	(DAY; MASINI; CAMPEAU, 2004; JANITZKY et al., 2015a)
<i>Locus Ceruleus</i>	(DAY; MASINI; CAMPEAU, 2004; JANITZKY et al., 2015a)
Septo Lateral	(MORROW et al., 2000b; MORROW; ELSWORTH; ROTH, 2002; REDMOND et al., 2002)
Córtex Pré Frontal	(TMT) <i>2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline</i> .

No entanto em contraste, a exposição ao gato ou estímulos associados a esse (com potencial efeito da proteína encontrada na saliva do gato, dentre elas a Feld4 [ROSEN; ASOK; CHAKRABORTY, 2015; TAKAHASHI, 2014]), ativa o Sistema Olfativo Acessório que envia projeções para o Bulbo Olfatório Acessório, uma região prosencefálica envolvida no processamento da informação do Vomeronasal (1ª centro; STAPLES et al., 2008), seguida pelo processamento central nas seguintes áreas: núcleo Medial da Amígdala (STAPLES et al., 2005), núcleos Hipotalâmicos Mediais (incluindo parte Dorsomedial do núcleo Ventromedial do Hipotálamo, núcleo Hipotalâmico Anterior e o núcleo Pré Mamilar Dorsal [CANTERAS et al., 2008b; CEZARIO et al., 2008; STAPLES et al., 2005]), que fazem parte do circuito Hipotalâmico Defensivo Medial e Substância Cinzenta Periaquedutal (Figura 22; CANTERAS; PAVESI; CAROBREZ, 2015; GROSS; CANTERAS, 2012; CEZARIO et al., 2008). Tais áreas também estão implicadas na consolidação do medo contextual induzido pelo gato ou seu odorante, adicionadas as seguintes áreas: Hipocampo Ventral (PENTKOWSKI et al., 2006), Septo Lateral, núcleos Lateral (MARTINEZ et al., 2011) e BLA da Amígdala (BINDI; BALDO; CANTERAS, 2018; MARTINEZ et al., 2011), Núcleo Talâmico Anteromedial Ventral, dentre outras (para revisão completa sobre indução de medo inato ou condicionado

após exposição ao gato ou ao seu odor, ver CANTERAS; PAVESI; CAROBREZ, 2015; GROSS; CANTERAS, 2012).



**Figura 22.** Esquema das principais áreas ativadas pela exposição direta ao gato (para maiores detalhes ver (CANTERAS; PAVESI; CAROBREZ, 2015; GROSS; CANTERAS, 2012).

De particular interesse, o Hipotálamo uma estrutura anatômica localizada na porção central do diencefalo, tem sido implicada como uma estrutura crítica em diferentes funções, incluindo a integração e expressão do comportamento emocional (PURVES, 2010), particularmente nas respostas defensivas, descritas inicialmente nos clássicos estudos de Bard (1928) e Hess & Brügger (1943). De fato, tal padrão de respostas corresponde ao comportamento de animais frente a ameaças naturais (CEZARIO et al., 2008). Desde então vários estudos com estimulações diversas foram realizadas (LIN et al., 2011; ULLAH et al., 2015, 2017), especialmente na porção Dorsomedial do Hipotálamo Ventromedial, incluindo a administração química de N-Metil D-Aspartato (NMDA) que induziu CG, ALER e fuga orientada além de comportamentos explosivos, definidos como uma resposta comportamental de fuga não orientada, aos 6 e 9 nMol, respectivamente (ULLAH et al., 2015, 2017). Enquanto dados preliminares do nosso laboratório indicaram que a estimulação elétrica (rever item 6.5.3.) do núcleo Hipotalâmico Ventromedial e áreas adjacentes induziu comportamentos de defesa (fuga ou escape), que se caracterizavam pela ocorrência de robustos giros e PU, muito semelhantes aqueles comportamentos observados durante a fase aguda de uma crise epiléptica audiogênica, em animais da linhagem WAR (GARCIA-CAIRASCO et al, 1996; para revisão da linhagem WAR, ver GARCIA-CAIRASCO et al., 2017).

De fato, embora a percepção dos odores de predadores (incluindo TMT e odor de gato) pareça ser inata, o repertório de respostas defensivas é complexo e amplamente modulado pelo

---

contexto, intensidade do estímulo e distância defensiva, demonstrando portanto que as respostas não são simplesmente reflexos (LITVIN; BLANCHARD; BLANCHARD, 2010). Sendo observadas intensas respostas de medo na presença de um predador real, com a expressão de comportamentos como CG, luta ou fuga, vocalizações ultra sônicas, enquanto as respostas de medo a pistas do predador, incluindo seu odor (que refletem comportamento tipo ansioso), comumente expressada pelo comportamento de avaliação de risco, com exploração/investigação cuidadosa do ambiente, permitindo a coleta de informações, afim de reconhecer sinais químicos presentes no ambiente, que permitem a detecção da proximidade de um predador, bem como a sua localização (iminência predatória), importante e fundamental para a sobrevivência das espécies (BLANCHARD; BLANCHARD; ROSEN, 2008; DIELENBERG; MCGREGOR, 2001; MCGREGOR et al., 2002).

Notavelmente nos últimos anos, vários estudos sobre como os organismos se adaptam, antecipam e reagem a estímulos ameaçadores, particularmente ao TMT (resumidos na Tabela 9), foram publicados. Obviamente a compreensão da dinâmica dos sistemas neurais envolvidos na codificação e expressão do medo e ansiedade, em resposta a um estímulo ameaçador mostra-se importante para estudos translacionais, particularmente os que envolvem memória aversiva, comuns em vítimas do transtorno do estresse pós-traumático e ansiedade patológica, dentre outras. De fato, estudos experimentais têm como objetivo final a tentativa da aplicabilidade dos seus achados na clínica (visão translacional). Este estudo em particular não foi elaborado para replicar primariamente achados anteriores, mas para adicionar dados neurobiológicos em um campo amplamente controverso, como elegantemente indicado por Rosen e colaboradores (2015).

Em resumo, os nossos achados indicaram comportamento de medo inato induzido pelo TMT líquido, enquanto durante a reexposição ao contexto sem a presença do odor, a ausência de comportamentos de medo condicionado, adicionado apenas à presença dos comportamentos tipo ansiosos, observado no Labirinto em Cruz Elevado, com ativação crítica do eixo HPA e consequente liberação de Corticosterona, associada ao aumento do peso da Glândula Adrenal (Protocolo 1). Uma questão adicional deste estudo foi que ratos expostos à nanoemulsão contendo TMT não diferiram significativamente dos seus controles em qualquer uma das medidas, particularmente comportamentais registradas nos Protocolos 1 e 2, embora a análise sistemática do comportamento inato dos ratos ao TMT realizada no Protocolo 2, permitiu a caracterização de diferentes estratégias de defesa, como ALER, BC e SOB. Finalmente, a estimulação do núcleo Hipotalâmico Ventromedial e áreas adjacentes induziu comportamentos de escape, incluindo vigorosos giros e PU. Claramente, mais investigações são necessárias.

**Tabela 9.** Estudos recentes envolvendo TMT e áreas afins.

(FORTES-MARCO et al., 2015)	<p>Camundongos CD1 fêmeas exibiram <i>avoidance</i> mas não congelamento quando expostos ao TMT em baixas concentrações (3,8 pmol [limiar para detecção do TMT] e 0,38 nmol), mas em altas concentrações (3,8 nmol a 0,38 µmol) os animais parecem se habituar ao odor, entretanto o comportamento de <i>avoidance</i> reaparece em concentrações de 3,8 e 0,38 µmol. Outro comportamento analisado, o tempo gasto no quadrante com odor foi significativamente reduzido apenas com 38 µmol de TMT, similar aos achados com Acetato de Amila, sugerindo que odores em altas concentrações perdem seu significado biológico, funcionando como odor químico pungente, possivelmente ativador mecânico do nervo Trigeminal. Além disso, a exposição repetida ao TMT e Acetato de Amila induziu condicionamento contextual.</p>
(JANITZKY et al., 2015a)	<p>Camundongos C57BL/6J expostos ao TMT, tiveram aumento da expressão de Fos em áreas criticamente envolvidas nas respostas ao estresse e comportamentos tipo ansiosos, como: Núcleo Leito da Estria Terminal, Septo Lateral, Núcleo Paraventricular do Hipotálamo, Substância Cinzenta Periaquedutal e <i>Locus Coeruleus</i>.</p>
(AYERS et al., 2016)	<p>Ratos <i>Long Evans</i> expostos diariamente (20 min) durante as 3 primeiras semanas de vida (PN 1-21), a 300 µmol TMT, apresentaram menos congelamento, quando reexpostos ao TMT, no 30º dia de idade (efeito de tolerância expresso a longo prazo). Enquanto as mães expostas ao TMT durante o mesmo período, apresentaram mudanças no seu comportamento de amamentação ao longo do período de exposição (efeito a curto prazo).</p>
(SARAIVA et al., 2016)	<p>A aversão do TMT foi neutralizada quando misturado a um odorante atrativo ou quando o TMT foi apresentado em baixas concentrações aos camundongos.</p>
(YANG et al., 2016)	<p>Através de diferentes técnicas, incluindo a optogenética foi descoberto que o Núcleo Tegmental Laterodorsal (em particular neurônios colinérgicos, glutamatérgicos e GABAérgicos, além de interneurônios positivos para parvalbumina) participam da resposta inata ao TMT.</p>
(SAITO et al., 2017)	<p>Através de experimentos optogenéticos os autores demonstraram que fotoativação do receptor olfatório 1019 (altamente responsivo ao TMT) ativa seletivamente uma única espécie glomerular do Bulbo Olfatório Principal Posterodorsal (subdomínio DII), induzindo imobilidade nos camundongos (sem efeito nas respostas aversivas), enquanto a deleção do Olfr1019 suprimiu essa resposta.</p>
(ASOK; SCHULKIN; ROSEN, 2016)	<p>A antalarmina, um potente antagonista de receptores de CRF do tipo 1, injetada intracerebroventricular (i.c.v.) e no Núcleo Leito da Estria Terminal Dorsolateral, afetou a retenção do medo condicionado ao contexto (utilizando choque nas patas), mas não o medo incondicionado ao TMT.</p>
(RALE et al., 2017)	<p>Este estudo identificou que o neuropeptídeo CART regula a excitação glutamatérgica (NMDA-R) dos neurônios do núcleo central da amígdala, que via</p>

---

Núcleo Leito Da Estria Terminal (Ventral), controla o congelamento induzido pelo TMT.

(MOBERLY et al., 2018) O ritmo respiratório é capaz de modular a atividade cerebral, alterando determinados comportamentos. Possivelmente esse mecanismo ocorre durante a discriminação e posterior expressão do medo, via Amígdala Basolateral, Hipocampo e Córtex Pré Frontal. Esse estudo demonstrou em roedores, a expressão de memórias de medo condicionado (observado pelo comportamento de congelamento) está associada a uma taxa respiratória de 4 Hz, sincronizadas na mesma frequência com oscilações no Córtex Pré Frontal Pré Límbico. Em especial, dados indicaram que a ablação do epitélio olfatório e a inativação do bulbo olfatório, causaram redução significativa na oscilação em 4 Hz do Córtex Pré Frontal, associado a períodos prolongados de congelamento ou alteração desse comportamento basal respectivamente, durante o medo condicionado.

(RAMPIN et al., 2018) 1) Os autores não conseguiram detectar a presença de TMT nas fezes da raposa usando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (limiar de detecção empregado 50 nmol/g), 2) Ratos *Brown Norway* e *Wistar* apresentaram respostas de medo quando expostos as fezes da raposa e a uma baixa concentração de TMT, e 3) ratos *Brown Norway* expressam maior congelamento (frequência e duração) quando expostos a fezes da raposa > cadaverina = 2-feniletilamina = TMT. (i.c.v.) Intracerebroventricular e (TMT) 2,5-Dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline.

---

## 6.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

1. O TMT induziu respostas de medo inato, mas não condicionamento contextual, em animais *Sprague Dawley* e *Wistar-Old*. Além disso, ratos expostos à câmara saturada com TMT exibiram comportamentos tipo ansiosos (24 h após), mas não tiveram alteração na atividade locomotora. Adicionalmente, apresentaram aumento da secreção de Corticosterona e do peso das Adrenais.

2. A nanoemulsão contendo TMT não interferiu nas respostas comportamentais de medo inato. Problemas, possivelmente no preparo da nanoemulsão ou de interação do TMT com o seu encapsulamento ou liberação do conteúdo nanoencapsulado em tempo diferente daquele proposto como imediato, deverão ser resolvidos futuramente.

3. A estimulação elétrica hipotalâmica induziu importantes comportamentos defensivos tipo fuga ou escape.



---

**7 CAPÍTULO III: CARACTERIZAÇÃO  
ELETROFISIOLÓGICA DO EFEITO  
ANTICONVULSIVANTE DA EXPOSIÇÃO AO ODOR  
DO PREDADOR EM MODELO EXPERIMENTAL DE  
EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL**

---

## 7.1 INTRODUÇÃO

A modulação da atividade epiléptica também é descrita através da estimulação olfatória, bloqueando ou suprimindo crises (BETTS, 2003; DELFINO-PEREIRA et al., 2018; EBERT; LÖSCHER, 2000; EFRON, 1956, 1957; GOWERS, 1881; JASEJA, 2008, 2010; LUNARDI et al., 2016; VALENTINE; FREMIT; TESKEY, 2005; WOOD et al., 1984), e em outros casos, induzindo, as chamadas Epilepsias reflexas (BOZORG; BENBADIS, 2009; BURKHARD et al., 1999; HUGHES; ANDY, 1979; ILIK; PAZARLI, 2015; LUNARDI et al., 2016; NGUYEN; RYBA, 2012a; RESTREPO; HELLIER; SALCEDO, 2013; SKALLI; SOULAYMANI BENCHEIKH, 2011; SPINELLA, 2001; STAFSTROM, 2007; T. TAKAHASHI, 1975). Por outro lado, a aura olfatória descrita inicialmente por Gowers (1881), foi associada por Hughlings-Jackson (1888) a “*dreamy states*” ou “*crude sensation*” (“*warning*”) of smell”.

Essa modulação é longamente conhecida e utilizada em países como a Índia, através da exótica aplicação do “*shoe smell*” no controle de crises (JASEJA, 2008, 2010). A aromaterapia engloba essa e outras técnicas que utilizam óleos essenciais com características anticonvulsivantes, como: alecrim, *ylang-ylang* e jasmim (BETTS, 2003). Um clássico e elegante estudo foi descrito por Efron (1956) sobre uma paciente que manifestava uma aura com cheiro forte de jasmim. Com o tempo e muita observação de suas crises, controlava as mesmas com a exposição experimental a odores fortes, tais como jasmim, sulfeto de hidrogênio, escatol, entre outros. Mais tarde essa mesma paciente criou interessantemente um condicionamento, tal que a simples evocação da memória olfatória impedia a expressão das crises (EFRON, 1957). Esse resultado intrigante, digamos que ficou “sepultado” na literatura como uma descrição puramente anedótica. Muitas décadas depois, um grupo de protocolos citam este estudo de Efron (1956, 1957), dentre eles Ebert & Löscher (2000), que descreveram o efeito anticonvulsivante do estímulo olfatório com tolueno e amônia na susceptibilidade de crises, utilizando o modelo experimental de Abrasamento da Amígdala convencional. Ebert & Löscher (2000) tiveram que aumentar em até duas vezes a corrente elétrica na Amígdala, necessária para evocar crises comportamentais e EEGráficas, em animais previamente abrasados (*kindled*). A atividade era evocada do eletrodo implantado na Amígdala e, além desse, outro eletrodo posicionado no Córtex Piriforme, também monitorava, em sincronia com o comportamento, a atividade EEGráfica. É interessante o

relato do Ebert & Löscher (2000), de que as crises não se propagavam (efeito anticonvulsivante do tolueno) porque o Córtex Piriforme, apesar da estimulação teoricamente recrutante da Amígdala, estaria “ocupado” (*busy*) processando a informação olfatória (por exemplo, do tolueno). Além disso, recentemente um estudo clínico demonstrou que a estimulação olfatória com *ylang-ylang* modificou a atividade epiléptica (LUNARDI et al., 2016).

Baseado nesses estudos (predominantemente clínicos), nosso grupo foi convidado para participar do ***EpExMo Project***, com o propósito de aumentar o conhecimento dos efeitos e dos mecanismos neurofisiológicos envolvidos na modulação das crises por odorantes, utilizando diferentes modelos experimentais. Assim, nossos achados confirmaram o efeito anticonvulsivante do tolueno no bloqueio de crises audiogênicas agudas e crônicas, em animais da linhagem WAR (DELFINO-PEREIRA et al., 2018, anexado), e que o TMT, um odor sintético, semelhante àquele extraído das fezes da raposa vermelha, causou incondicionalmente comportamentos semelhantes ao medo (PEREIRA et al., 2014, 2016; GARCIA-CAIRASCO et al., 2016, 2017; artigo em preparação anexado). Além disso, demonstramos que o TMT apresentou um exuberante efeito anticonvulsivante, do ponto de vista comportamental, tanto nas Crises Audiogênicas agudas quanto no ARA ( PEREIRA et al., 2014, 2016; GARCIA-CAIRASCO et al., 2016, 2017; artigo em preparação anexado).

De fato, considerando as evidências clínicas e experimentais sobre a exposição olfatória no controle de crises, a nossa hipótese é que a exposição ao TMT deverá induzir um robusto aumento do limiar das crises, em ratos *Sprague Dawley* submetidos ao ARA, um modelo amplamente utilizado para o estudo de drogas anticonvulsivantes (BIALER; WHITE, 2010; LÖSCHER, 2002, 2011; LÖSCHER; BRANDT, 2010). Uma natural consequência deste fenômeno será a supressão ou inibição dos efeitos EEGráficos característicos da ELT. Logo a eventual inibição das crises deflagradas pelo ARA, através da exposição ao TMT, representa uma ferramenta adicional no estudo das Epilepsias.

## **7.2 OBJETIVO**

Verificar os efeitos EEGráficos da exposição ao TMT, nas crises límbicas induzidas pelo ARA.

---

## 7.3 MATERIAL E MÉTODOS

### 7.3.1 PROTOCOLO 1: EFEITOS EEGRÁFICOS DA EXPOSIÇÃO AO TMT, EM RATOS *WISTAR-OLD*, SUBMETIDOS AO ABRASAMENTO RÁPIDO DA AMÍGDALA.

Estudos analíticos EEGráficos foram realizados em colaboração com os grupos do **Professor Dr. João Luís Garcia Rosa (Doutorando Daniel Moreira Cestari, USP-São Carlos)** e dos **Professores Drs. Márcio Flávio Dutra Moraes e Eduardo Mendes** (co supervisor e supervisor do **Dr. Daniel Medeiros de Castro**, Universidade Federal de Minas Gerais).

De fato, esses dados originais eletrográficos fazem parte de material apresentado para a obtenção do título de Mestre, que na ocasião, basicamente por inexistência de treinamento das rotinas computacionais no LNNE, não foram analisados sistematicamente, e por esse motivo, agora, revisados e detalhadamente analisados, constituem parte importante do Doutorado. Sem as colaborações acima mencionadas e sem os treinamentos que vieram com eles, estas análises não teriam sido possíveis. Por outro lado, os achados comportamentais por si só já haviam corroborado os efeitos anticonvulsivantes do TMT. Tais achados comportamentais (após ARA com ratos da linhagem *Wistar-Old*) resultaram na indicação de destaque (10 melhores trabalhos) para Prêmio Jovem Pesquisador no Congresso da Liga Brasileira de Epilepsia (2016), mostrando que nossos estudos atendem às expectativas da comunidade científica, com o reconhecimento pelos nossos pares epileptologistas. Da mesma maneira em 2014, outro trabalho demonstrando o efeito anticonvulsivante do TMT em *WARs*, também recebeu no Congresso da Liga Brasileira de Epilepsia, o Prêmio de Melhor Pôster da Área Básica (Pereira *et al.*, 2014, 2016; Garcia-Cairasco *et al.*, 2016, 2017; artigos em anexo).

Assim, a sequência do Projeto traz agora o importante e promissor objetivo de avaliar a influência da estimulação olfatória com TMT nas crises síncronas comportamentais e EEGráficas límbicas, de ratos *Wistar-Old*. Esse estudo foi aprovado pelo CEUA, da FMRP – USP (número do protocolo: 200/2011).

---

### **7.3.1.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL: ANIMAIS, CIRURGIA ESTEREOTÁXICA E ABRASAMENTO RÁPIDO DA AMÍGDALA**

Brevemente, foram utilizados 36 ratos *Wistar-Old*, machos, *naïve*, com peso entre 280-300 gramas, proveniente do Serviço de Biotério do Campus de Ribeirão Preto da USP. Os animais foram submetidos a um ciclo claro-escuro de 12/12 h, temperatura controlada ( $23 \pm 2$  °C), com água e ração *ad libitum*. Todos foram armazenados em caixas de polietileno com tampa de ferro cromado, em grupos de no máximo 4 ratos por caixa, no período anterior à cirurgia, e após este procedimento, foram armazenados em caixas individuais até o término do experimento, quando foram eutanasiados.

Todos os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implante dos eletrodos (*A-M System, Inc.*; diâmetro= 400 µm) de registro em áreas importantes relacionadas com a possível ação do TMT e medo, e com crises límbicas, tais como: Formação Hipocampal (AP: -6.3 mm; ML: -4,5 mm; DV: -4.5 mm) e no Córtex Piriforme (AP: bregma; ML: - 5,0 mm; DV: -8,8 mm); e um eletrodo tripolar no Complexo Amigdalóide, utilizando como referência o BLA, para estímulo e registro (AP: -2.3 mm; ML: -4.7 mm; DV: -7.1 mm). Adicionalmente foi implantado um parafuso de aço inoxidável (Ø 1.5 mm; Fine Science Tools, Heidelberg, Germany) soldado a um pequeno fio, para aterramento do animal ao sistema, além de quatro parafusos adicionais no escalpo sem coordenadas estereotáxicas definidas. Foram utilizados na região de contato entre osso e parafuso ou eletrodo, cimento dental de zinco (*S.S. White* – Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Na sequência, os eletrodos e o fio terra foram soldados aos fios do conector macho de seis pinos (*RJ 11 cat6*), fixado com acrílico dental no crânio, formando assim o capacete, ilustrado na Figura 2.

Obviamente, todos os procedimentos anestésicos descritos em diversos capítulos, incluindo I e IV (para descrição completa, consultar artigo anexado), foram aplicados e sua eficácia foi cuidadosamente verificada durante todo o procedimento, afim de seguir normas de ética e boas práticas laboratoriais.

Após o período de recuperação (7 dias) e habituação (realizados nos últimos três dias consecutivos do período de recuperação), os animais foram aleatoriamente divididos em um dos quatro grupos experimentais, compreendidos como:

- A. Grupo Sem Estímulo e Água: 8 animais;
- B. Grupo Estímulo e Água: 8 animais;

C. Grupo Sem Estímulo e TMT: 8 animais;

D. Grupo Estímulo e TMT: 12 animais.

Na sequência os animais dos grupos estimulados (a saber incluem os grupos: Estímulo e Água, e Estímulo e TMT) foram submetidos ao protocolo de ARA (FORESTI et al., 2008), consistindo na aplicação de 20 estímulos elétricos (durante 2 dias consecutivos, 10 estímulos/dia), com as seguintes características: trens de ondas quadradas bifásicas, corrente constante de 500  $\mu$ A, 60 Hz, pulso de 1 ms, com 10 s de duração. Os registros EEGráficos foram obtidos do Córtex Piriforme, Formação Hipocampal, além do Complexo Amigdalóide, com o ganho ajustado em 2000X, filtro passa baixa de 1000 Hz, filtro passa alta 0,1 Hz, *notch filter* (60 Hz) e frequência de amostragem de 2000 Hz. Após a conclusão do protocolo de ARA, os animais abrasados foram pré-expostos a uma câmara saturada de TMT puro ou água (controle), imediatamente antes do estímulo teste (21°).

De fato os animais dos grupos não estimulados ou *sham* (Sem Estímulo e Água, e Sem estímulo e TMT) foram expostos somente aos odorantes (água ou TMT, respectivamente), mas foram igualmente manipulados durante o ARA (obviamente, sem receber o estímulo elétrico).

O protocolo de estimulação olfatória consistiu na colocação de 5  $\mu$ L de líquido (TMT ou água) sob papel filtro (dimensão: 4,5 x 4,5) na câmara (ver Figura 12) mantida completamente fechada por 30 min (parâmetros químicos determinados previamente em outro estudo, artigo anexado). Na sequência, o animal foi colocado na câmara e o vídeo-EEG registrado durante todo o período de observação (5 min e 30 s). Após a retirada do animal, o sistema de exaustão foi ligado, afim de dessaturar internamente e completamente a câmara.

### ***7.3.1.2 ANÁLISE EEGRÁFICA: OCORRÊNCIA DA PÓS DESCARGA E ANÁLISE ESPECTRAL***

A atividade epileptiforme foi medida pela ocorrência da 1° e 2° pós descargas no EEG (para definição de pós descarga ver Tabela 3) no 1° e 21° estímulos, para os grupos: Estímulo e Água, e Estímulo e TMT.

Além disso, as análises espectrais do EEG foram realizadas utilizando a Transformada Rápida de Fourier (comumente conhecida pela sigla em inglês, FFT: *Fast Fourier Transform*) na 1° pós descarga do 21° estímulo, para todos os grupos. Nesta etapa

foram avaliadas as seguintes características (para maiores detalhes ver artigo anexado e TONNER; BEIN, 2006) do espectro do sinal:

1. Frequência mediana: corresponde ao valor de frequência no qual 50% da potência estão em frequências mais baixas e 50% da potência estão em frequências mais altas, ou seja, frequência que soma 50% do sinal da energia;
2. Pico de potência: valor máximo da potência para uma determinada frequência;
3. Frequência no pico de potência: frequência que possui a maior potência;
4. Potência total: é a quantidade de energia/potência contida no sinal.

Foram consideradas as seguintes bandas de frequência: teta (4-8 Hz), alfa (8-14 Hz), beta (14-30 Hz) e gama (30-100 Hz). Para evitar artefatos (efeito da descarga dos capacitores, logo após o estímulo), foram incluídas apenas frequências  $\geq 4$  Hz.

Para os animais dos grupos Sem Estímulo (inclui: Sem Estímulo e Água, e Sem Estímulo e TMT) foram extraídos 30 segundos correspondentes a 30-60 segundos do registro EEGráfico.

Os sinais foram analisados usando: *Matlab* (2016) e *Python* (3.7.2), além das bibliotecas *NumPy* (1.15.4), *SciPy* (1.2.0) e *Matplotlib* (3.0.2).

### 7.3.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A ocorrência (ausência ou presença) da 1<sup>o</sup> e 2<sup>o</sup> pós descarga no EEG foi detectada pela análise do  $\chi^2$ , comparando o 1<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> estímulo, para ambos os grupos: Estímulo e Água, e Estímulo e TMT. FFT foi analisado através do teste *Mann Whitney*.

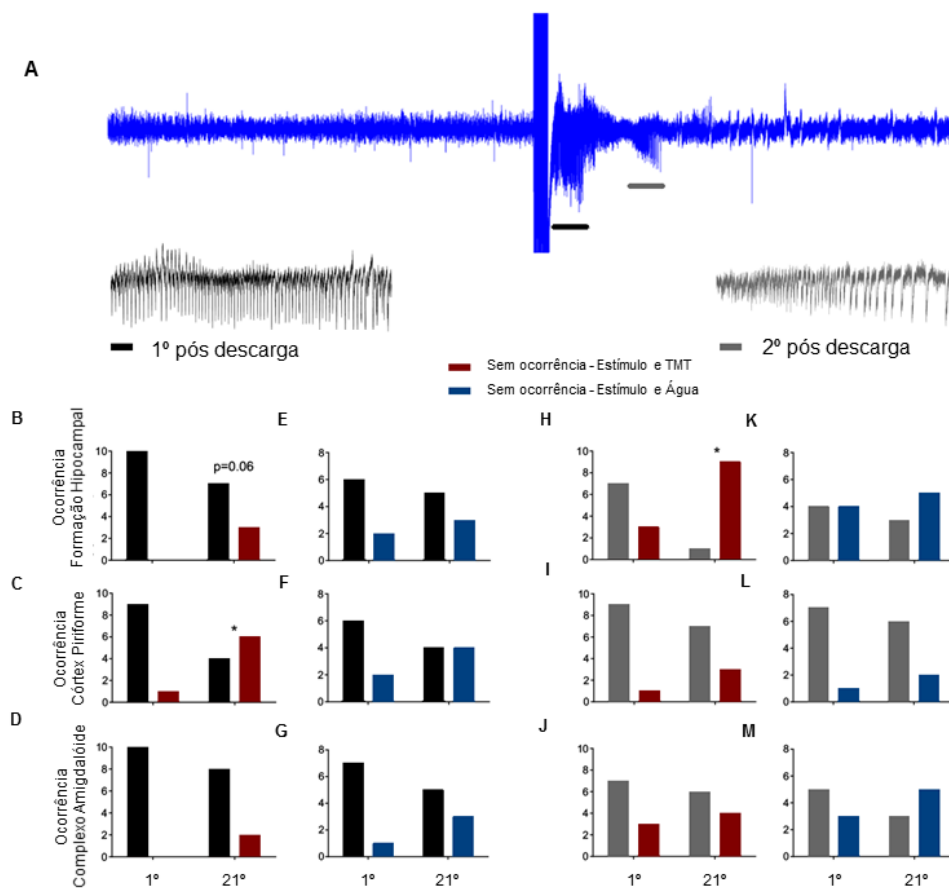
Os dados foram analisados estatisticamente e seus gráficos confeccionados utilizando o *GraphPad Prism* (8.0, *GraphPad Software, Inc; USA*). Os valores foram apresentados como média $\pm$ EPM, sendo considerado estatisticamente significativo, as diferenças iguais ou inferiores a  $p < 0,05$ .

## 7.4 RESULTADOS

### 7.4.1 PROTOCOLO 1: ANÁLISE EEGRÁFICA CONFIRMA O EFEITO SUPRESSOR DO TMT NAS CRISES LÍMBICAS

A avaliação da pós descarga no EEG (Figura 23) demonstrou uma redução significativa na presença de crises eletrográficas para os animais do grupo Estímulo e TMT (N= 12), mas não para o grupo Estímulo e Água (N= 08). O grupo Estímulo e TMT

apresentou maior ausência de pós descarga no 21º estímulo comparado com o 1º estímulo para seguintes as estruturas: Córtex Piriforme (1º pós descarga; **Erro! Fonte de referência não encontrada.**3C; análise do  $\chi^2$ ) e Formação Hipocampal (1º e 2º pós descargas; Figura 23B e H, respectivamente; análise do  $\chi^2$ ).

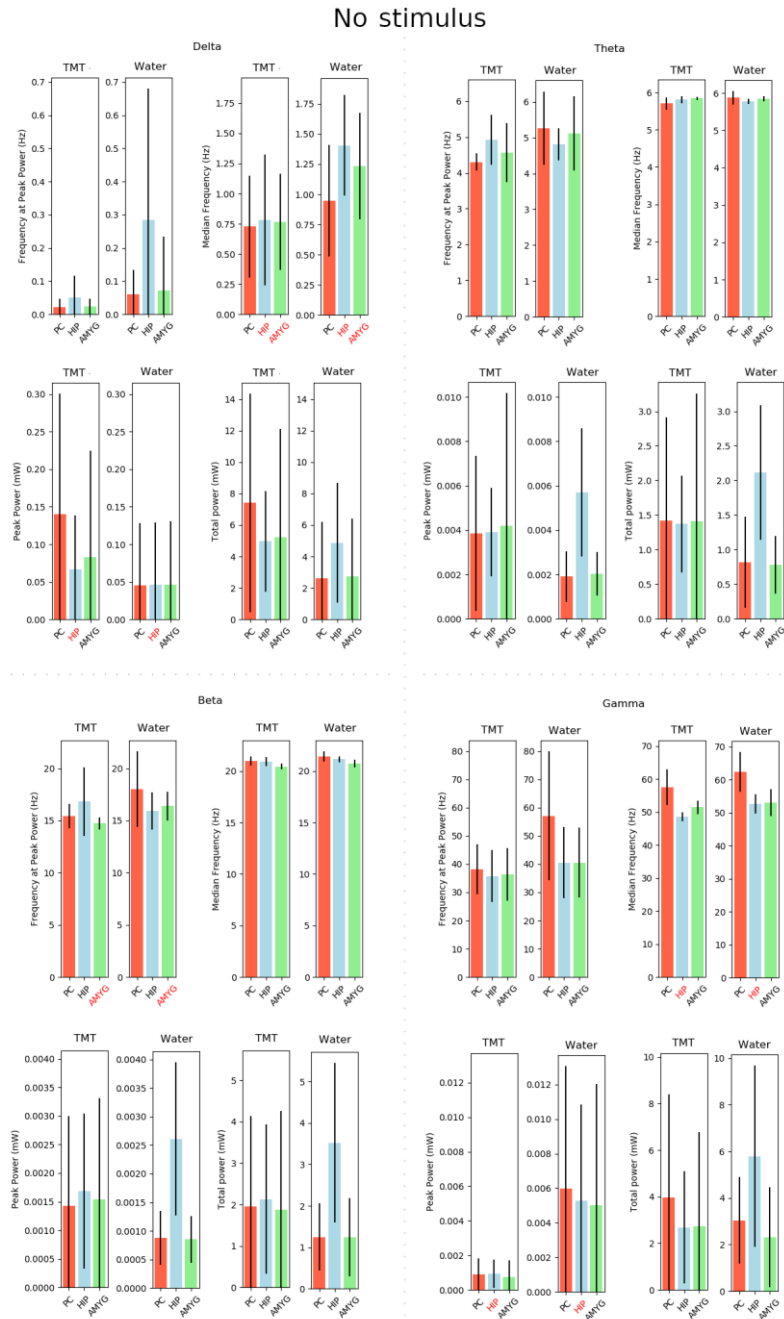


**Figura 23.** Ocorrência da 1º e 2º pós descargas no eletrencefalograma (EEG) no 1º e 21º estímulos para os grupos Estímulo e Água (N= 08), e Estímulo e TMT (N= 12). O painel superior (A) ilustra um sinal bruto representativo do 1º estímulo. A inserção descreve uma típica 1º (traço preto) e 2º (cinza traço) pós descargas no EEG. Os gráficos mostram a quantificação da presença e ausência da pós descarga para as seguintes estruturas: Formação Hipocampal (B, E, H e K), Córtex Piriforme (C, F, I e L) e Complexo Amigdalóide (D, G, J e M). Os dados indicam que grupo Estímulo e TMT apresentou maior ausência de pós descarga no 21º estímulo comparado com o 1º estímulo para seguintes as estruturas: Córtex Piriforme (1º pós descarga - C) e Formação Hipocampal (1º e 2º pós descargas - B e H, respectivamente). teste  $\chi^2$ . \* $p < 0,05$ .

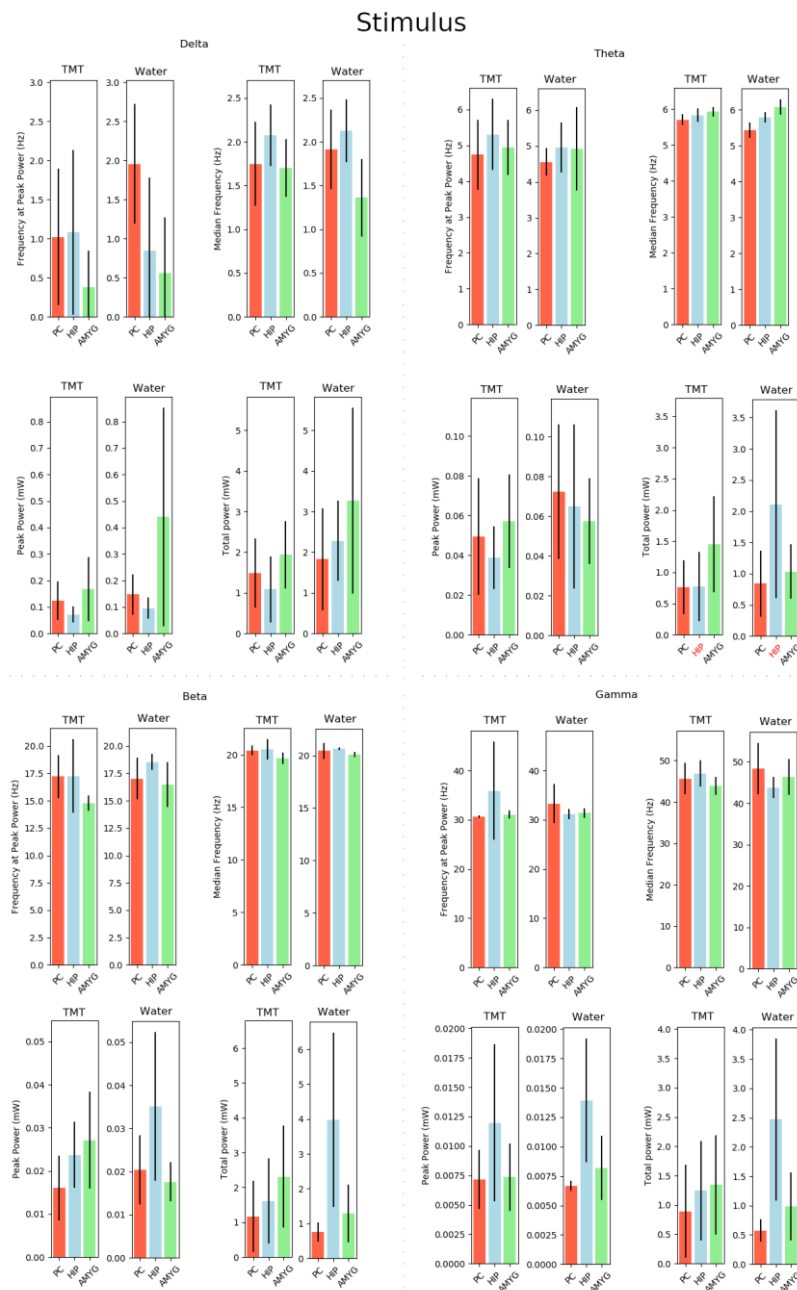
A análise espectral surpreendentemente indicou menor atividade de frequência para o grupo Sem Estímulo e TMT (N= 08), em relação ao grupo Sem Estímulo e Água (N= 08, Figura 24), com diferença significativa para a frequência mediana em delta na Formação Hipocampal ( $p < 0,05$ ; teste *Mann Whitney*) e Complexo Amigdalóide ( $p < 0,05$ ; teste *Mann Whitney*). Similares achados foram obtidos para o (1) frequência no pico de potência na banda beta para o Complexo Amigdalóide ( $p < 0,05$ ; teste *Mann Whitney*), (2)



frequência mediana e pico de potência, ambos na banda gama para Formação Hipocampal ( $p < 0,05$ ; teste *Mann Whitney*). Assim, como previamente citado, curiosamente o TMT reduziu a oscilação nas diferentes sub bandas, com exceção do pico de potência em delta para a Formação Hipocampal ( $p < 0,05$ ; teste *Mann Whitney*; Figura 24).



**Figura 24.** Características espectrais dos grupos Sem Estímulo e Água (*Water*;  $N = 8$ ), e Sem Estímulo e TMT (*TMT*;  $N = 8$ ), com diferenças estatísticas para as estruturas: Formação Hipocampal (*HIP*) e Complexo Amigdalóide (*AMYG*), em diversos parâmetros, tais como: Frequência Mediana (*Median Frequency*), Pico de Potência (*Peak Power*) e Frequência do Pico de Potência (*Frequency of Peak Power*). Teste *Mann-Whitney*.  $p < 0,05$ .



**Figura 25.** Características espectrais dos grupos Estímulo e Água (*Water*;  $N= 08$ ), e Estímulo e TMT (TMT;  $N= 12$ ), com diferenças estatísticas para o Pico de Potência (*Peak Power*) em teta (*theta*) na Formação Hipocampal (HIP). Teste *Mann-Whitney*.  $p<0,05$ .

Além disso, a análise espectral com FFT mostrou que o TMT (grupo Estímulo e TMT,  $N= 12$ ) diminuiu a potência total em teta na Formação Hipocampal ( $p<0,05$ ; teste *Mann Whitney*; Figura 25), comparado ao grupo Estímulo e Água ( $N= 08$ ). Em conjunto, esses achados corroboram os dados comportamentais, indicando que o TMT interferiu na sincronização típica de crise límbica (Figura 25).

---

## 7.5 DISCUSSÃO

A análise EEGráfica concorda com os dados prévios comportamentais (para descrição completa, ver artigo anexado), indicando que de fato o TMT, uma substância química com importante relevância biológica (cheiro de predador), interferiu na atividade epileptiforme límbica, dada a redução significativa na ocorrência da 1<sup>o</sup> e 2<sup>o</sup> pós descargas no EEG (Figura 23). Além disso, a análise espectral através da FFT mostrou que o TMT diminuiu as oscilações teta na Formação Hipocampal de animais do grupo Estímulo e TMT, comparado ao grupo Estímulo e Água (Figura 25). Surpreendentemente, nossos achados com FFT também indicaram menores frequências na atividade EEGráfica para animais do grupo Sem Estímulo e TMT, em relação ao seu controle, particularmente para Formação Hipocampal e Complexo Amigdalóide (Figura 24).

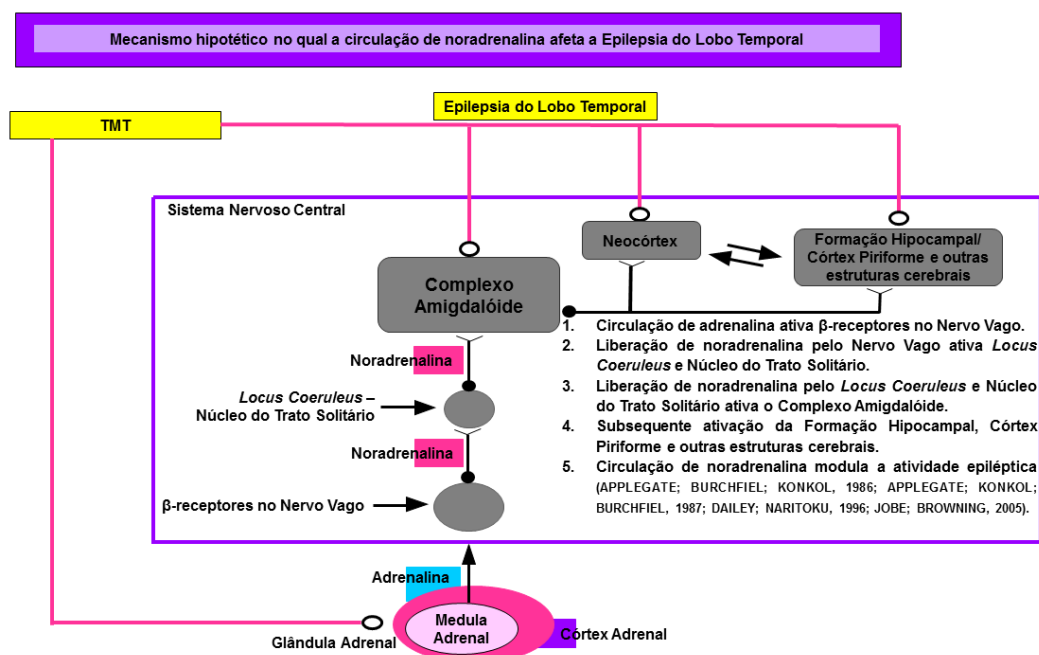
Assim, nossos achados com o modelo de ARA estão de acordo com dados da literatura de outros modelos experimentais e da clínica que indicam que a exposição olfatória é capaz de suprimir ou inibir crises epiléticas (BETTS, 2003; CRUZ et al., 2003; DELFINO-PEREIRA et al., 2018b; EBERT; LÖSCHER, 2000a; EFRON, 1956, 1957, JASEJA, 2008, 2010; LUNARDI et al., 2016; VALENTINE; FREMIT; TESKEY, 2005). Embora, os mecanismos neurofisiológicos para controlar as crises epiléticas com odores sejam ainda pouco compreendidos (DELFINO-PEREIRA et al., 2018; LUNARDI et al., 2016), um potencial mecanismo descrito por Ebert & Löscher (2000), envolve a competição de sistemas ou antagonismo de circuitos. A nossa interpretação é a de que essa competição ou antagonismo poderia ocorrer entre áreas cerebrais envolvidas no processamento de medo, criticamente implicadas na ativação pelo TMT, tais como Complexo Amigdalóide (em especial núcleos Cortical e Medial), Córtex Piriforme e Hipocampo Ventral (para maiores detalhes ver discussão do Capítulo II), que são também amplamente envolvidas nas crises límbicas (particularmente durante o ARA). Esse potencial mecanismo de fato baseia-se em um efeito inibitório endógeno, ou seja, um método natural para controle de crises, que não envolve administração farmacológica ou manipulações cerebrais, funcionando como uma contra medida na atividade epileptiforme, dada a ativação de uma determinada região cerebral envolvida no início da crise, particularmente na aura (EBERT; LÖSCHER, 2000a; EFRON, 1956; JASEJA, 2008).

Em claro contraste com nossos achados, a estimulação olfatória também pode induzir crises, as chamadas Epilepsias reflexas (BOZORG; BENBADIS, 2009; BURKHARD et al., 1999; ILIK; PAZARLI, 2015; LUNARDI et al., 2016; NGUYEN; RYBA, 2012b; RESTREPO; HELLIER; SALCEDO, 2013; SKALLI; SOULAYMANI BENCHEIKH, 2011; STAFSTROM, 2007). De acordo com Restrepo e colaboradores (2013) a combinação da estimulação odorífera forte e rápida é capaz de provocar crises. Curiosamente, quando os animais e/ou humanos detectam odores passivamente, as células piramidais no Córtex Piriforme não aumentam significativamente suas taxas de disparo (GIRE et al., 2013; GOTTFRIED, 2010; LUNA; PETTIT, 2010). Em contraste, durante a detecção do odor ativo (por exemplo, quando os animais detectam o TMT), as taxas de disparo induzidas pelo odor aumentam significativamente nas células piramidais (GIRE et al., 2013). Esta atividade complexa é metabolicamente exigente e pode causar a geração de crises (RESTREPO; HELLIER; SALCEDO, 2013), dada a redução da inibição GABAérgica no Córtex Piriforme anterior ou na *área tempestas* (LUNA; PETTIT, 2010). Em adição, é descrito que pacientes com ELT apresentam a função olfatória alterada (WOLF, 2016), que pode ser correlacionada com a redução do volume no Bulbo Olfatório (HUMMEL et al., 2013).

Interessantemente, também foi descrito que o TMT, assim como o tolueno, este último induziu oscilações rítmicas rápidas (8–21 Hz) no Córtex Piriforme, em contraste com a amônia (ZIBROWSKI; VANDERWOLF, 1997). Além disso, a estimulação elétrica da mucosa olfatória (LI et al., 2010) e do Córtex Piriforme Central (estimulação de baixa frequência [YANG et al., 2006]) foi capaz de suprimir as crises límbicas. Nessa linha, apesar de parecer paradoxal, alguns estudos descreveram que a estimulação elétrica de certas estruturas cerebrais é eficiente no controle de crises, utilizando estímulos de frequência variada (em geral baixa e alta frequência está associada à sincronização ou dessincronização, respectivamente [COTA et al., 2009; MEDEIROS; MORAES, 2014; VONCK et al., 2002]) e intervalos interpulsos particularmente não periódicos (CARLA et al., 2014; COTA et al., 2009; MEDEIROS; MORAES, 2014; MEDEIROS et al., 2012) no Complexo Amigdalóide (COTA et al., 2009; MEDEIROS et al., 2012) ou em outros alvos anatômicos (COTA et al., 2009; MEDEIROS et al., 2012; VONCK et al., 2002). Essa ação é baseada na dessincronização de redes neurais epileptogênicas (CARLA et al., 2014; COTA et al., 2009; MEDEIROS; MORAES, 2014; MEDEIROS et al., 2012).

Portanto, a estimulação olfatória pode ter efeitos semelhantes aos anteriormente citados, mas com a vantagem de não ser invasiva.

Outra hipótese para nossos resultados é baseada no efeito anticonvulsivante da noradrenalina (APLEGATE; BURCHFIEL; KONKOL, 1986; APLEGATE; KONKOL; BURCHFIEL, 1987; CURTIS et al., 2012; DAILEY; NARITOKU, 1996; FEINSTEIN; GLEASON; LIBET, 1989; FITZGERALD, 2010; GIORGI et al., 2004; JANITZKY et al., 2015b; JOBE; BROWNING, 2005). De acordo com essa linha de raciocínio, parece plausível que as Epilepsias e a Depressão compartilhem mecanismos e gatilhos patogênicos (DE KLOET; JOËLS; HOLSBOER, 2005; KANNER, 2012) e isso é compatível com a *exterior defensive shield theory* (JOBE; BROWNING, 2005). O fato é que o TMT é um odor considerado etologicamente relevante e por outros autores considerado aversivo (APFELBACH et al., 2005; BLANCHARD et al., 2003; DAY; MASINI; CAMPEAU, 2004; FENDT et al., 2005; MCGREGOR et al., 2002), mas em ambos os casos, indutor de estresse para o rato, capaz de ativar respostas fisiológicas e comportamentais desencadeadas pelo sistema SAM, que levam à liberação de moléculas mediadoras, principalmente catecolaminas (DE KLOET; JOËLS; HOLSBOER, 2005; JOËLS; BARAM, 2009; TANK; LEE WONG, 2015), como a noradrenalina. O aumento da noradrenalina circulante prepara o corpo para a reação de “luta ou fuga” (BOWMAN, 1930; CANNON WB., 1915, 1929) e interage com receptores adrenérgicos presentes em neurônios disseminados no sistema nervoso central (MCCORRY, 2007; TANK; LEE WONG, 2015), que podem influenciar estruturas envolvidas nas Epilepsias (principalmente via *locus coeruleus*), como a Formação Hipocampal e o Complexo Amigdalóide (Figura 26).



**Figura 26.** Figura esquemática da modulação das crises epilépticas pela circulação de noradrenalina central (ver texto para maior elaboração). O TMT é um odor capaz de ativar respostas fisiológicas e comportamentais desencadeadas pelo sistema simpatoadrenomedular (SAM), que levam à liberação de moléculas mediadoras, particularmente a noradrenalina. A circulação da noradrenalina ativa os receptores  $\beta$  no Nervo Vago, que por consequência ativa o *Locus Coeruleus* e o Núcleo do Trato Solitário. Enquanto a liberação de noradrenalina pelo *Locus Coeruleus* e o Núcleo do Trato Solitário ativa o Complexo Amigdalóide, com subsequente ativação do Córtex Piriforme, Formação Hipocampal e outras estruturas cerebrais. Assim, a circulação de noradrenalina poderia modular a atividade epiléptica, como demonstrado por diversos estudos (APPLEGATE; BURCHFIEL; KONKOL, 1986; APPLEGATE; KONKOL; BURCHFIEL, 1987; DAILEY; NARITOKU, 1996; FEINSTEIN; GLEASON; LIBET, 1989; JOBE; BROWNING, 2005). Adaptado de Tank & Lee Wong (2015).

Assim, o efeito causado pela noradrenalina depende da sua disponibilidade cerebral (DAILEY; NARITOKU, 1996; FITZGERALD, 2010; JOBE; BROWNING, 2005). Em geral, a depleção de noradrenalina contribui para a predisposição às crises no modelo de Abrasamento (APPLEGATE; BURCHFIEL; KONKOL, 1986; CURTIS et al., 2012; JANITZKY et al., 2015b; JOBE; BROWNING, 2005). Portanto, doses normais podem ter efeito anticonvulsivante (APPLEGATE; BURCHFIEL; KONKOL, 1986; APPLEGATE; KONKOL; BURCHFIEL, 1987; DAILEY; NARITOKU, 1996; JOBE; BROWNING, 2005). Os animais *GEPRs*, por exemplo, são uma importante linhagem de ratos endogenamente epilépticos que apresentam *déficit* nos sistemas noradrenérgico e serotoninérgico, resultando em baixos limiares de crises, associados à presença de crises epilépticas graves (JOBE; BROWNING, 2005; JOBE; DAILEY, 2000; PHILLIP C. JOBE, PRAVIN K. MISHRA, RONALD A. BROWNING; LEAH E. ADAMS-CURTIS, 1994; PHILLIP C. JOBE, 2003). Applegate e colaboradores (1986) sugeriram que a

supressão da crise durante o modelo de *Kindling Antagonism* é dependente da noradrenalina central. Outra evidência do efeito anticonvulsivante da noradrenalina foi surpreendentemente descrita em um estudo que estimulou o *Locus Coeruleus* em dois pacientes com Epilepsia (um com crises tônico-clônicas generalizadas e outro com crises psicomotoras), indicando a eficácia no controle das crises, com redução da frequência e gravidade em ambas as crises (FEINSTEIN; GLEASON; LIBET, 1989).

Além disso, Horii e colaboradores (2010) demonstraram que ratos anestesiados com uretano, expostos ao TMT apresentaram aumento da atividade do sistema SAM. Essa alteração autonômica é descrita em outros estudos (CURTIS et al., 2012; JANITZKY et al., 2015b). Por outro lado, e similarmente aos achados descritos no Capítulo I do Protocolo II, também é mencionado que TMT aumenta os níveis de Corticosterona (MORROW et al., 2000b; MORROW; ELSWORTH; ROTH, 2002; VERNET-MAURY; POLAK; DEMAEL, 1984) e ainda outros estudos descreveram que o TMT, particularmente em alta concentração, também pode ativar o nervo trigêmeo (APFELBACH et al., 2005; BLANCHARD et al., 2003; DAY; MASINI; CAMPEAU, 2004; FENDT et al., 2005; MCGREGOR et al., 2002). No entanto, nosso desenho experimental (como citado, os animais foram expostos à água ou TMT durante 20 s, e imediatamente após foram submetidos à estimulação elétrica, ver detalhes em 7.3.1.) inviabiliza tal efeito, particularmente pelos nossos achados anticonvulsivantes. Assim, hipotetizamos que, se a noradrenalina estiver envolvida nos mecanismos de ação do TMT, certamente houve o predomínio da ativação do sistema SAM (medeia efeitos de curto prazo) sob os efeitos do eixo HPA (medeia efeitos de curto e principalmente de longo prazo [JOËLS; BARAM, 2009; TANK; LEE WONG, 2015]).

Em conjunto, dentre os possíveis mecanismos que parecem estar envolvidos no controle das crises com TMT, consideramos (1) o antagonismo ou competição entre "redes relacionadas com o processamento do TMT" e "redes relacionadas às crises", ou (2) um efeito noradrenérgico (estresse, sistema de defesa), ou (3) a combinação de ambos. Tais ações são altamente complexas, dada a ativação das mesmas estruturas anatômicas com diferentes funcionalidades, imediatas e não-lineares, de forma que o aprofundamento do tema é fundamental para a compreensão da modulação olfatória nas crises, em particular do TMT.

Assim, além do mecanismo neurofisiológico ser desconhecido até o presente momento, ainda há dados limitados sobre os efeitos da estimulação olfatória sobre a

atividade epiléptica. Logo, tentar entender os mecanismos subjacentes a essas respostas, e possivelmente a longo prazo, identificar potenciais terapias não farmacológicas é de suma importância, que mesmo sem claros efeitos antiepilépticos, poderiam ser uma opção terapêutica alternativa e complementar, que permitiriam, por exemplo, o uso de menores dosagens de drogas anticonvulsivantes (reduzindo potenciais reações adversas) ou até mesmo facilitar efeitos neuroprotetores, que ao final gerariam menos crises (partindo da afirmação de que “crises geram crises”). Assim, nossa perspectiva para o futuro próximo é uma medicina transdisciplinar, com cooperação mútua entre pesquisadores básicos e clínicos, para o ótimo e esperado desenvolvimento nesta área, baseados na complexidade e no dinamismo não linear das Epilepsias. De fato, nosso grupo continua o estudo da modulação olfatória nas Epilepsias, acrescentando dados à literatura existente, mas certamente, nossos achados representam um componente parcial, mas importante, que contribuirá para a compreensão da eficácia dos odorantes na modulação de crises.

## **7.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Avaliações EEGráficas utilizando o modelo de ARA confirmaram que o TMT, um estímulo olfatório com forte relevância biológica, suprimiu significativamente as crises epileptiformes límbicas, corroborando aos dados comportamentais.



**8 CAPÍTULO IV: EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO  
AGUDA DO HUF-101, UM POTENTE DERIVADO DO  
CANABIDIOL, NO ABRASAMENTO RÁPIDO DA  
AMÍGDALA**

## 8.1 INTRODUÇÃO

O CBD é um dos principais canabinóides presentes no extrato da *Cannabis Sativa*, que contém mais de 80 substâncias químicas (DEVINSKY et al., 2014, 2016; HILL et al., 2012; ROSENBERG et al., 2015; SZAFARSKI; MARTINA BEBIN, 2014). Gaoni & Mechoulam (1964) foram os primeiros a isolar e descrever o principal componente ativo da *Cannabis*, o  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol (THC), conhecido pelos efeitos psicotomiméticos. Enquanto, o fitocannabinóide CBD, um componente não psicoativo, foi isolado em 1940 (ADAMS; HUNT; CLARK, 1940) e sua estrutura elucidada em 1963, por Mechoulam & Shvo. Embora o mecanismo de ação do CBD não seja totalmente compreendido, o CBD é conhecido por potencialmente agir em vários alvos (multi-alvo), inibindo o metabolismo do endocannabinóide anandamina (AEA) e a captação da 2-araquidonilglicerol (2-AG), ativando os canais TRPV1 (causando sua dessensibilização direta), com mudança bidirecional nos níveis de cálcio intracelular. Brevemente, sob condições fisiológicas normais, o CBD aumenta ligeiramente o cálcio intracelular, ao passo que, reduz o cálcio intracelular sob condições de alta excitabilidade, enquanto também aumenta a atividade do receptor serotoninérgico 5-HT<sub>1A</sub> e, dada sua natureza polifenólica, reduz os efeitos oxidativos (DEVINSKY et al., 2014; SZAFARSKI; MARTINA BEBIN, 2014), além de apresentar ação indireta nos receptores CB1 e CB2 (BREUER et al., 2016; JONES et al., 2010; MECHOULAM et al., 2007; PEREZ et al., 2018; SILVA et al., 2017; SZAFARSKI; MARTINA BEBIN, 2014; VILELA et al., 2017), entre outros mecanismos (para revisão ver DEVINSKY et al., 2014; MECHOULAM et al., 2007).

Vários estudos relatam efeitos terapêuticos do CBD em diferentes distúrbios neuropsiquiátricos, por possuir propriedades anti-inflamatória, analgésica, antidepressiva, anticomulsiva e anticonvulsiva (DEVINSKY et al., 2014). Particularmente nas Epilepsias, estudos *in vitro* e *in vivo* indicam importantes efeitos anticonvulsivantes e neuroprotetores (CARLINI et al., 1973; CONSROE et al., 1982; CONSROE; WOLKIN, 1977; DO VAL-DA SILVA et al., 2017; HILL et al., 2013; HOSSEINZADEH et al., 2016; JONES et al., 2010, 2012; KLEIN et al., 2017; PELZ et al., 2017; SHIRAZI-ZAND et al., 2013; VILELA et al., 2017). Adicionalmente, estudos clínicos também demonstraram que o CBD é capaz de controlar as crises epiléticas (CONSROE; WOOD; BUCHSBAUM, 1975; CUNHA et al., 1980; DEVINSKY et al.,

2016), particularmente quando coadministrado com drogas anticonvulsivantes, em pacientes fármaco resistentes, como por exemplo, naqueles pacientes com síndrome de Dravet (DEVINSKY et al., 2016).

Entretanto, apesar das consistentes propriedades terapêuticas, o CBD apresenta baixa biodisponibilidade, o que pode comprometer seu uso clínico (AGURELL et al., 1981), além da curva dose-resposta em formato de sino, indicando alta eficácia em um intervalo limitado (GUIMARÃES et al., 1990; VILELA et al., 2017; ZANELATI et al., 2010). Recentemente foi demonstrado que a ação de drogas, particularmente o CBD, pode ser potencializada pela adição de um átomo de flúor, como na forma do HUF-101 (BREUER et al., 2016; PEREZ et al., 2018; SILVA et al., 2017), sintetizada pelo grupo do Professor Dr. Raphael Mechoulam, da Universidade Hebraica, em Jerusalém, Israel.

Modelos animais de Epilepsia replicam a sintomatologia associados ou não à subsequente presença de crises espontâneas crônicas (KANDRATAVICIUS et al., 2014). Crises límbicas induzidas por estímulos excitatórios repetidos causam mudança no padrão comportamental e EEGráfico das crises, somado ao posterior recrutamento de outras áreas, como tronco cerebral, um fenômeno descrito anteriormente, como abrasamento ou *Kindling* (GODARD et al, 1969; RACINE, 1972). O protocolo de Abrasamento Rápido desenvolvido inicialmente no hipocampo por Lothman e colaboradores (1985), em contraste com o Abrasamento clássico ou convencional, causa crises generalizadas (estado abrasado ou *kindled*) em horas (FISHER, 1989; FORESTI et al., 2008; LÖSCHER; BRANDT, 2010; LOTHMAN et al., 1985; MCNAMARA et al., 1980; NOEBELS JL, AVOLI M, ROGAWSKI MA, OLSEN RW, 2012). De fato, além do *Status Epilepticus*, o abrasamento é um dos modelos recomendados para identificar potenciais alvos no tratamento das Epilepsias pelo *The National Institutes of Health (NIH; BIALER; WHITE, 2010; LÖSCHER, 2002, 2011; LÖSCHER; BRANDT, 2010)*, o que o torna um modelo particularmente interessante para o estudo dos efeitos dos derivados/análogos do CBD, como no caso do HUF-101.

Assim, considerando as evidências do tratamento complementar e alternativo com CBD nas Epilepsias, desejamos verificar o potencial efeito anticonvulsivante do CBD fluorado, o HUF-101, no modelo de ARA. Nós hipotetizamos encontrar efeitos anticonvulsivantes promissores do HUF-101 para as análises comportamentais e EEGráficas.

## 8.2 OBJETIVO

Avaliar os efeitos da administração aguda de HUF-101, um potente derivado fluorado sintético do CBD, no ARA, um modelo experimental de ELT.

## 8.3 MATERIAIS E MÉTODOS

Esse protocolo experimental foi aprovado pelo CEUA, da FMRP - USP (número do protocolo: 27/2019). Para tanto foram utilizados ratos *Wistar-Old*, machos, *naïve*, adultos (280-300 g), provenientes do Serviço de Biotério do Campus de Ribeirão Preto da USP.

Os animais foram submetidos a um ciclo claro-escuro de 12/12 h, sob temperatura controlada de  $23\pm 2^\circ\text{C}$ , com água e ração *ad libitum*. Todos foram armazenados em caixas de polietileno com tampa de ferro cromado (40,5 x 33,5 x 21 cm), em grupos de no máximo 4 ratos por caixa no período anterior a cirurgia, e após este procedimento foram armazenados em caixas individuais até o término do experimento.

### 8.3.1 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

Os animais foram devidamente anestesiados (similarmente à descrição realizada nos itens 5.3.2 e **Erro! Fonte de referência não encontrada.**) com Thiopentax – tiopental sódico 4% (30 mg/kg; Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA, Itapira, SP, Brasil), com doses de manutenção dos anestésicos Ketamina 3% (0,6 mg/kg; Agener União Saúde Animal – Embu-Guaçu, SP, Brasil) e Xilazina 0,02% (0,4 mg/kg Bayer Saúde Animal – São Paulo, SP, Brasil), então a pele do dorso do crânio foi tricotomizada.

Em seguida, foram colocados no aparelho estereotáxico (*David Kopf 962 – Tujunga, CA, USA*), presos por barras auriculares e barra para incisivos. Com o animal devidamente posicionado no equipamento, foi aplicada anestesia local subcutânea composta por cloridrato de lidocaína 2% contendo epinefrina (Astra – Naucalpan, México). Posteriormente foi realizada uma pequena incisura afim de expor a calota craniana, onde o periósteo foi raspado, para facilitar a visualização das suturas que serviram como guias para o procedimento estereotáxico. Neste momento, foi implantado o fio terra anterior ao Bregma, adicionalmente a outros quatro parafusos ( $\varnothing$  1.5 mm; *Fine*

*Science Tools, Heidelberg, Germany*) FST Inc.), sem coordenadas estereotáxicas definidas, para melhor fixação do capacete. E, finalmente foram implantados dois eletrodos bipolares de aço inoxidável revestidos de teflon (aço inoxidável revestidos de teflon, diâmetro= 400  $\mu\text{m}$ , Modelo 791400, *AM Systems Inc., Carlsborg, WA, USA*), na Formação Hipocampal (AP: -6.3 mm; ML: -4,5 mm; DV: -4.5 mm) e no Córtex Piriforme (AP: Bregma; ML: -5,0 mm; DV: -6,8 mm); e um eletrodo tripolar no Complexo Amigdalóide utilizando como referência o núcleo BLA (AP: -2.3 mm; ML: -4.7 mm; DV: -7.1 mm), de acordo com Paxinos & Watson (1997).

Na região de contato parafuso/osso e eletrodo/osso foi aplicado cimento dental de zinco (*S.S. White – Rio de Janeiro, RJ, Brasil*) e externamente foi revestido com acrílico dental. Os eletrodos e o fio terra foram soldados ao conector macho de seis pinos (*RJ 11 cat6*), que serviu para acoplar o animal ao sistema de estimulação/registo (ver Figura 2).

Após a cirurgia os animais permaneceram em recuperação, no Biotério do Departamento de Fisiologia da FMRP - USP, por um período de 7 dias, antes de iniciar os procedimentos subsequentes. Entretanto, durante os últimos três dias (período de recuperação), os animais passaram pelo protocolo de habituação.

### **8.3.2 ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA: ABRASAMENTO RÁPIDO DA AMÍGDALA**

No primeiro dia após a recuperação cirúrgica foi realizado o cálculo do limiar (EBERT; LÖSCHER, 1995; FORESTI et al., 2008), com a aplicação de estímulos elétricos no Complexo Amigdalóide (*GRASS-S88 stimulator; West Warwick, USA*) utilizando uma corrente inicial de 100  $\mu\text{A}$  durante 2 s, com progressivos aumentos de 100  $\mu\text{A}$ , a cada 5 min, até a presença da primeira crise EEGráfica (pós descarga, para definição ver Tabela 3).

O protocolo para ARA seguiu o modelo proposto por Foresti e colaboradores (2008, também similar ao protocolo descrito nos itens 5.3.3. e 7.3.1.1.), consistindo em 20 estímulos elétricos, aplicados durante 2 dias sendo, portanto, 10 estímulos/dia, com intervalo de 30 min entre estímulos. Trinta minutos antes do 21º estímulo elétrico, metade dos animais foi injetada intraperitonealmente com veículo (98% salina à 0,15M e 2% *Tween 80*), e a outra metade com HUF-101 (10 mg/kg).

Para a estimulação elétrica foram utilizados trens de ondas quadradas bifásicas, com corrente constante de 500  $\mu\text{A}$  (ver FORESTI et al., 2008; LOTHMAN et al., 1985), frequência de 60 Hz, pulsos de 1 ms e 10 s de estimulação (EBERT; LÖSCHER, 1995;

FORESTI et al., 2008). Enquanto os sinais eletrofisiológicos foram registrados 5 min antes e após cada estímulo, filtrados e amplificados pelo *CyberAmp* (Axon Instruments), digitalizados (MP100, *Biopac Systems*) e registrados pelo sistema de vídeo-EEG *PowerLab 8/30* (AD Instruments), utilizando o *software LabChart 7.2* (AD Instruments). Os parâmetros para aquisição do sinal foram: frequência de amostragem de 2000 Hz, filtro passa baixo em 1000 Hz, filtro passa alta em 0,1 Hz e ganho total igual a 1 (FORESTI et al., 2008).

Para processamento do EEG foi realizada a análise espectral para comparar qualitativamente as amplitudes do sinal EEGráfico, ao longo da distribuição das frequências para 21º estímulo, entre o grupo controle *versus* HUF-101.

### 8.3.2.1 HUF-101

Como citado anteriormente, o HUF-101 foi sintetizado pelo grupo do Prof. Dr. Raphael Mechoulam, Universidade Hebraica, em Jerusalém - Israel, e descrita com maiores detalhes por Breuer e colaboradores (2016), envolvendo a fluoração no anel aromático do CBD. O HUF-101 foi diluído em veículo (2% *Tween* 80 e salina).

### 8.3.3 PERFUSÃO E PROCESSAMENTO TECIDUAL

Os animais foram perfundidos respeitando a janela temporal de 24 h após o último estímulo, para processamento tecidual por histoquímica de Prata, para neurodegeneração por apoptose. Tal procedimento não diferiu do protocolo descrito no item 5.3.5, assim como a crioproteção e o congelamento.

Para as análises histoquímicas, os tecidos cerebrais foram cortados a 40 µm no plano coronal em criostato (Microm HM-5005-E) com a temperatura variando entre -18° C e -22° C. Os cortes contendo as lesões correspondentes as pontas dos eletrodos foram colocados em lâminas gelatinizadas (gelatina 0,5% e sulfato de cromo-alumínio 0,05%) para confirmação histológica do posicionamento dos eletrodos, enquanto os demais cortes foram mantidos em placa de cultura com 24 escavações, imersos em solução anticongelante (50% de PBS 50 mM, 30% etilenoglicol e 20% glicerina).

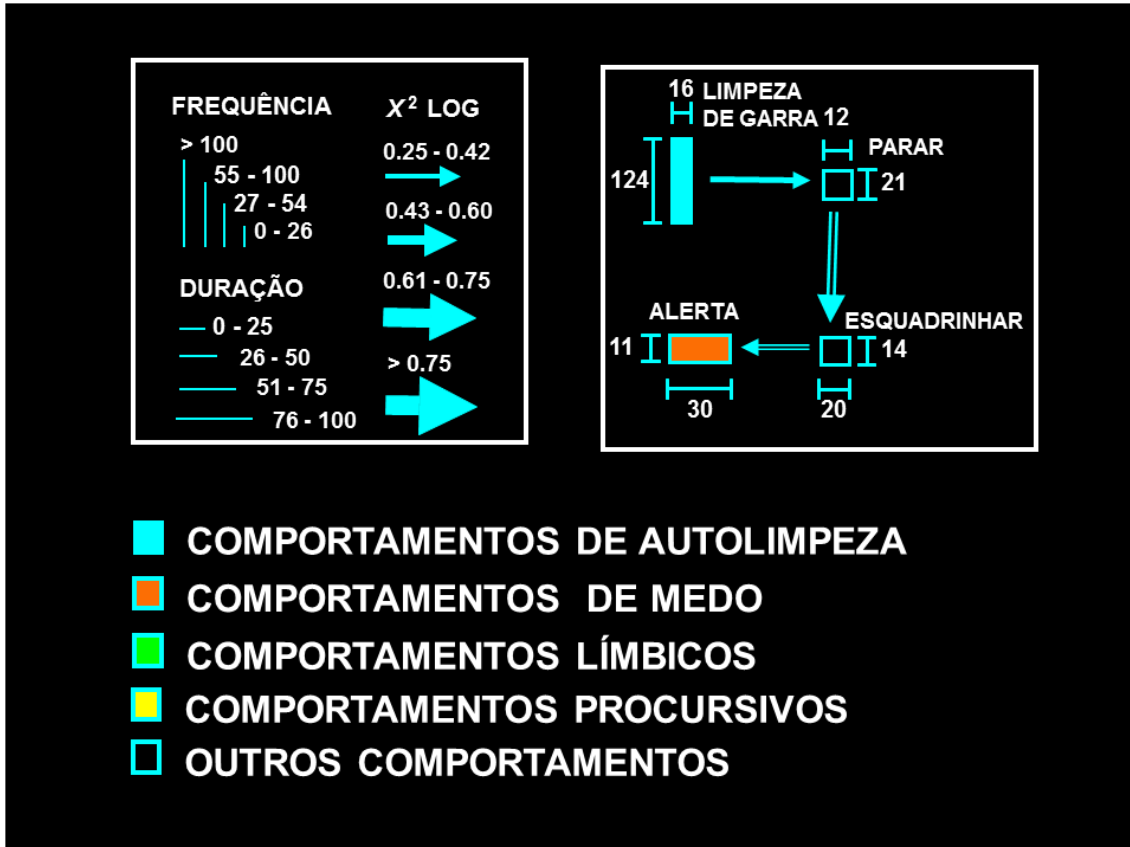
Todo o material (incluindo placas com tecidos em *free floating* e lâminas) foram armazenados no *freezer* -20° C.

---

### 8.3.4 REGISTRO E ANÁLISE COMPORTAMENTAL

Similar à avaliação comportamental do Capítulo 1 (rever item 5.3.6), esta análise utilizou o Índice Límbico ou Índice de Gravidade de Crises Límbicas modificado por Pinel & Rovner (1978; Tabela 2). Foram considerados animais abrasados (*kindled*) aqueles que tiveram a expressão comportamental de pelo menos duas classes 4 ou uma classe 5, durante o protocolo de ARA (1<sup>o</sup>-20<sup>o</sup> estímulo).

Além disso, a análise neuroetológica foi realizada por meio da observação e registro segundo a segundo, de todos os itens comportamentais apresentados pelos animais durante os períodos de observação. Na sequência, os dados coletados foram analisados pelo programa estatístico *ETHOMATIC* (GARCIA-CAIRASCO *et al.*, 1992). Ao final, os comportamentos foram representados graficamente no programa *Power Point* 2010 (*Microsoft*) sob a forma de Fluxogramas, seguindo o padrão de calibração representado na Figura 27. No Fluxograma, cada retângulo representa um comportamento, a altura dos retângulos simboliza a frequência de ocorrência; enquanto a base representa a duração média do comportamento durante a observação e as cores identificam qualitativamente classes relacionadas de comportamentos. As setas indicam a probabilidade de um segundo comportamento ocorrer após um determinado comportamento, seguindo uma calibração com valores crescentes de  $\chi^2$  ( $\log \chi^2 \geq 0,25$ ;  $p < 0,05$ ).



**Figura 27.** Padrão de calibração para confecção dos Fluxogramas (GARCIA-CAIRASCO *et al.*, 1992). Cada retângulo representa um comportamento. A altura dos retângulos simboliza a frequência de ocorrência, e a base, a duração média do comportamento durante a observação. As setas representam valores estatísticos ( $\chi^2 \geq 3,841$ ;  $\log \chi^2 \geq 0,25$ ;  $p < 0,05$ ) que indicam a probabilidade de um segundo comportamento ocorrer após um dado comportamento. As cores utilizadas nos retângulos têm o objetivo de identificar qualitativamente classes relacionadas de comportamentos. A cor das setas representa o ponto de partida das mesmas ao acompanhar a cor do retângulo que origina a interação entre pares comportamentais.

Além disso, os Fluxogramas foram divididos em 3 células, correspondendo aos períodos: (1) PRÉ (*baseline*, corresponde ao período anterior ao estímulo elétrico), (2) ESTÍMULO e (3) PÓS estímulo (período subsequente ao estímulo elétrico), todos com duração de 5 min, com exceção do estímulo que compreende 10 s.

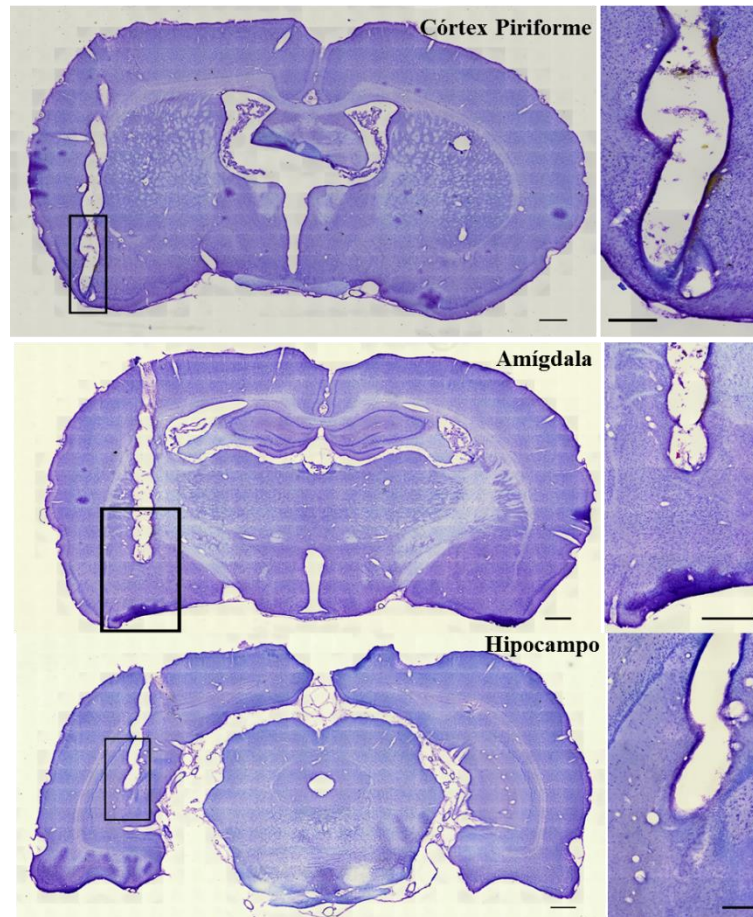
## 8.4 RESULTADOS

### 8.4.1 CONFIRMAÇÃO HISTOLÓGICA

A confirmação histológica constitui parte importante para integrar os animais neste estudo, de fato aleatoriamente em um dos grupos amostrais: Veículo (N= 07) e HUF-101 (N= 07). A Figura 28 ilustra o posicionamento dos eletrodos, nas seguintes



áreas: Córtex Piriforme (1), Complexo Amigdalóide (2) e Formação Hipocampal (3). Além do correto posicionamento dos eletrodos, foram incluídos neste estudo apenas os animais abrasados (*kindled*) durante o protocolo de ARA (1<sup>o</sup>-20<sup>o</sup> estímulo).

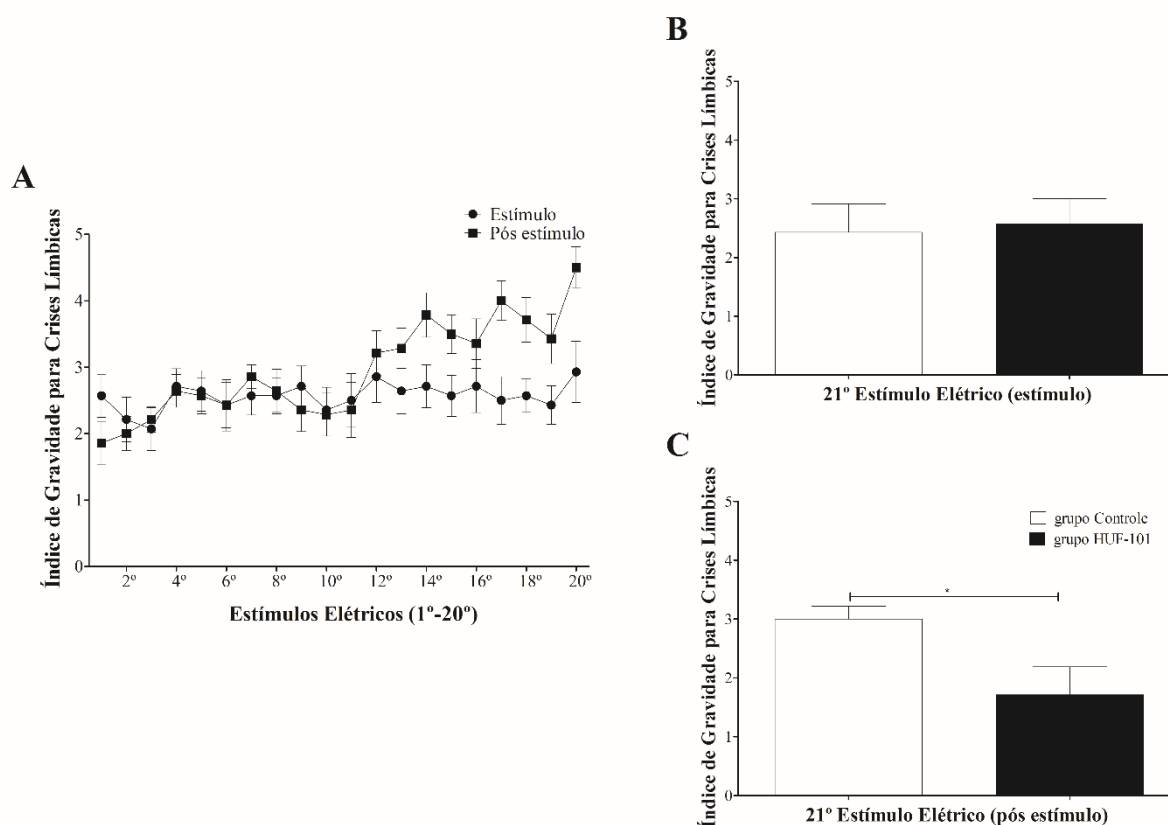


**Figura 28.** Imagem ilustrativa do posicionamento dos eletrodos, nas seguintes áreas: Córtex Piriforme (A), Complexo Amigdalóide (B) e Formação Hipocampal (C), todos no hemisfério esquerdo, evidenciado no *inset* (aumento digital de 4x). Tecido corado com *Nissl*. Todos os tecidos foram submetidos à mesma bateria para realização da histologia.

#### 8.4.2 HUF-101 REDUZIU A GRAVIDADE DAS CRISES LÍMBICAS APÓS O 21<sup>o</sup> ESTÍMULO

A Figura 29A ilustra a evolução do ARA (1<sup>o</sup>-20<sup>o</sup>) para animais de ambos os grupos (N= 14): Veículo e HUF-101. Nessa Figura podemos observar que durante o estímulo, o Índice de Gravidade para Crises Límbicas não altera significativamente ( $p > 0,001$ , Teste de *Friedman*, com pós-teste de *Dunn*), existindo apenas uma pequena oscilação. De fato, essa resposta comportamental similar durante o estímulo, sugere a máxima ativação da área estimulada. Enquanto no período posterior ao estímulo, representado na mesma Figura 29A, podemos observar a característica evolutiva esperada para o ARA, com o progressivo aumento da gravidade das crises (ou seja, a aquisição do abrasamento;

\*\*\* $p < 0,001$ , Teste de *Friedman*, com pós-teste de *Dunn*), incluindo diferenças significativas ao longo dos estímulos (Tabela 10), sugestivo do recrutamento de estruturas adjacentes, em especial mesencefálicas, somadas às alterações neurobiológicas subjacentes ao processo epileptogênico.



**Figura 29.** Efeitos da administração única de HUF-101 nos parâmetros comportamentais da crise límbica induzida pelo Abrasamento Rápido da Amígdala (ARA): (A) Classificação comportamental observada, estímulo a estímulo, durante a evolução do ARA (1°-20° estímulos, N= 14), para os períodos de estímulo (círculo preenchido,  $p > 0,05$ , Teste de *Friedman*, com pós-teste de *Dunn*) e pós estímulo (quadrado preenchido, \*\*\* $p < 0,001$ , Teste de *Friedman*, com pós-teste de *Dunn*). Em eixo Y, média ( $\pm$ EPM) do Índice de Gravidade de Crises Límbicas sugerido por Racine (1972), atingido em cada estímulo (eixo X). (B) Efeito anticonvulsivante do HUF-101 durante o 21° estímulo ( $p > 0,05$ , teste *Mann Whitney*, N= 07/grupo). (C) Efeito anticonvulsivante do HUF-101 após o 21° estímulo (período pós estímulo, \* $p < 0,05$ , teste *Mann Whitney*, N= 07/grupo).

Mais importante, quando esses animais foram injetados com Veículo (N= 07) ou HUF-101 (N= 07), houve redução dos Índices de Gravidade para Crises Límbicas para ambos os grupos (Figura 29B e C), com diferença significativas entre os grupos no período posterior ao estímulo, para os animais que receberam HUF-101 (Figura 29C;  $3,00 \pm 0,21$  versus  $1,71 \pm 0,47$ , para os grupos Controle e HUF-101, respectivamente). Logo, a administração aguda de HUF-101 suprimiu a crise límbica induzida pelo ARA, funcionando como um estímulo modificador de crises. Estes resultados corroboram aos

dados indicando o controle das crises com CBD em vários modelos animais de epilepsia (CILIO; THIELE; DEVINSKY, 2014; DO VAL-DA SILVA et al., 2017; GOBIRA et al., 2015; HILL et al., 2013; HUSSAIN et al., 2015; JONES et al., 2010; MORTATI; DWORETZKY; DEVINSKY, 2007; PORTER; JACOBSON, 2013; SZAFLARSKI et al., 2017; VILELA et al., 2017).

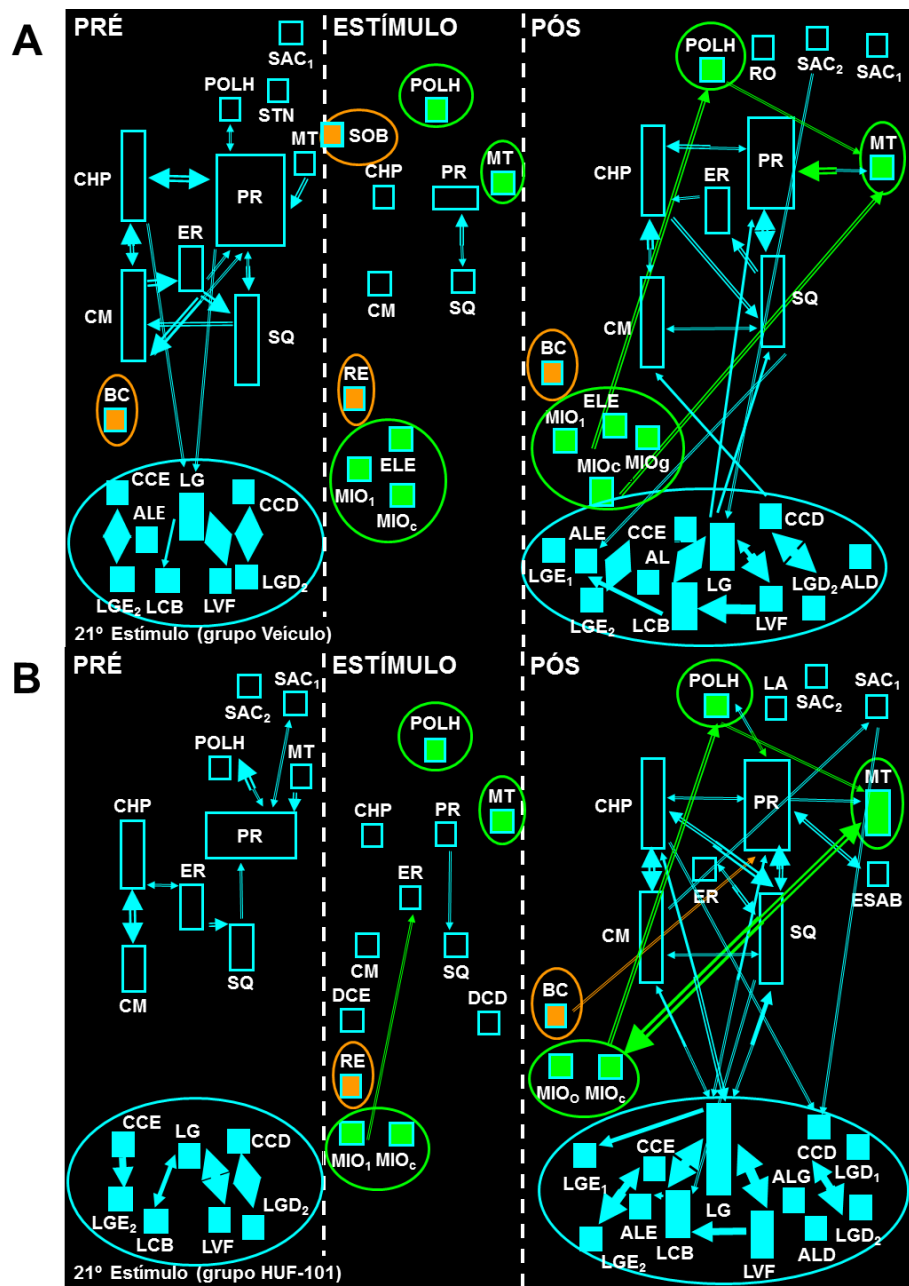
**Tabela 10.** Valor-*p* durante o período pós estímulo, indicando a evolução do Abrasamento Rápido da Amígdala representado na Figura 29.

1° versus 14°	**	3° versus 20°	**
1° versus 17°	**	4° versus 20°	*
1° versus 18°	*	5° versus 20°	*
1° versus 20°	***	6° versus 20°	*
2° versus 14°	*	9° versus 20°	*
2° versus 17°	**	10° versus 17°	*
2° versus 20°	***	10° versus 20°	*
3° versus 17°	*	11° versus 20°	**

Teste de *Friedman*, com pós-teste de *Dunn*: \**p*<0,05; \*\**p*<0,01 e \*\*\**p*<0,001.

#### 8.4.3 ANÁLISE NEUROETOLÓGICA (SEQUÊNCIA COMPORTAMENTAL) CONFIRMA O EFEITO SUPRESSOR DO HUF-101 NAS CRISES LÍMBICAS

Na Figura 30 temos os Fluxogramas dos grupos Veículo (A, esquerda) e HUF-101 (B, direita), ambos do 21° estímulo elétrico, divididos em 3 células, correspondes aos respectivos períodos: PRÉ, ESTÍMULO e PÓS estímulo (conforme descrição do item 8.3.4.). É possível observar no período PRÉ do 21° estímulo (Figura 30A e B, 1° célula) a presença dos cinco comportamentos exploratórios (CHP, CM, ER, PR e SQ), além do número similar de comportamentos de autolimpeza (representados pelos retângulos preenchidos em azul), para o grupo Veículo (08 comportamentos) e HUF-101 (07 comportamentos), somado ao comportamento de BC para o grupo Veículo e alguns comportamentos descritos como outros, incluindo: MT, POHL e particularmente os comportamentos SAC<sub>1</sub> e sacudir o corpo (SAC<sub>2</sub>; *wet dog shakes*), ambos presentes no grupo HUF-101, que de acordo com Rodrigues e colaboradores (2005) estão correlacionados com a supressão de crises em alguns modelos animais de epilepsia. Assim, durante o período PRÉ estímulo os animais injetados com HUF-101 (N= 05) apresentaram um menor número de comportamentos (16 comportamentos) e interações (18), em relação ao controle (18 comportamentos e 24 interações, N= 05).



**Figura 30.** Fluxogramas das sequências comportamentais do 21º estímulo elétrico dos grupos Veículo (A, N= 05), e HUF-101 (B, N= 05). Para os períodos: (1) pré estímulo elétrico com duração de 5 minutos (min; PRÉ); (2) estimulação elétrica de 10 segundos (ESTÍMULO) e (3) pós estimulação elétrica, também com duração de 05 min (PÓS). Retângulos, setas e cores (Figura 25), siglas (Tabela Suplementar 1).

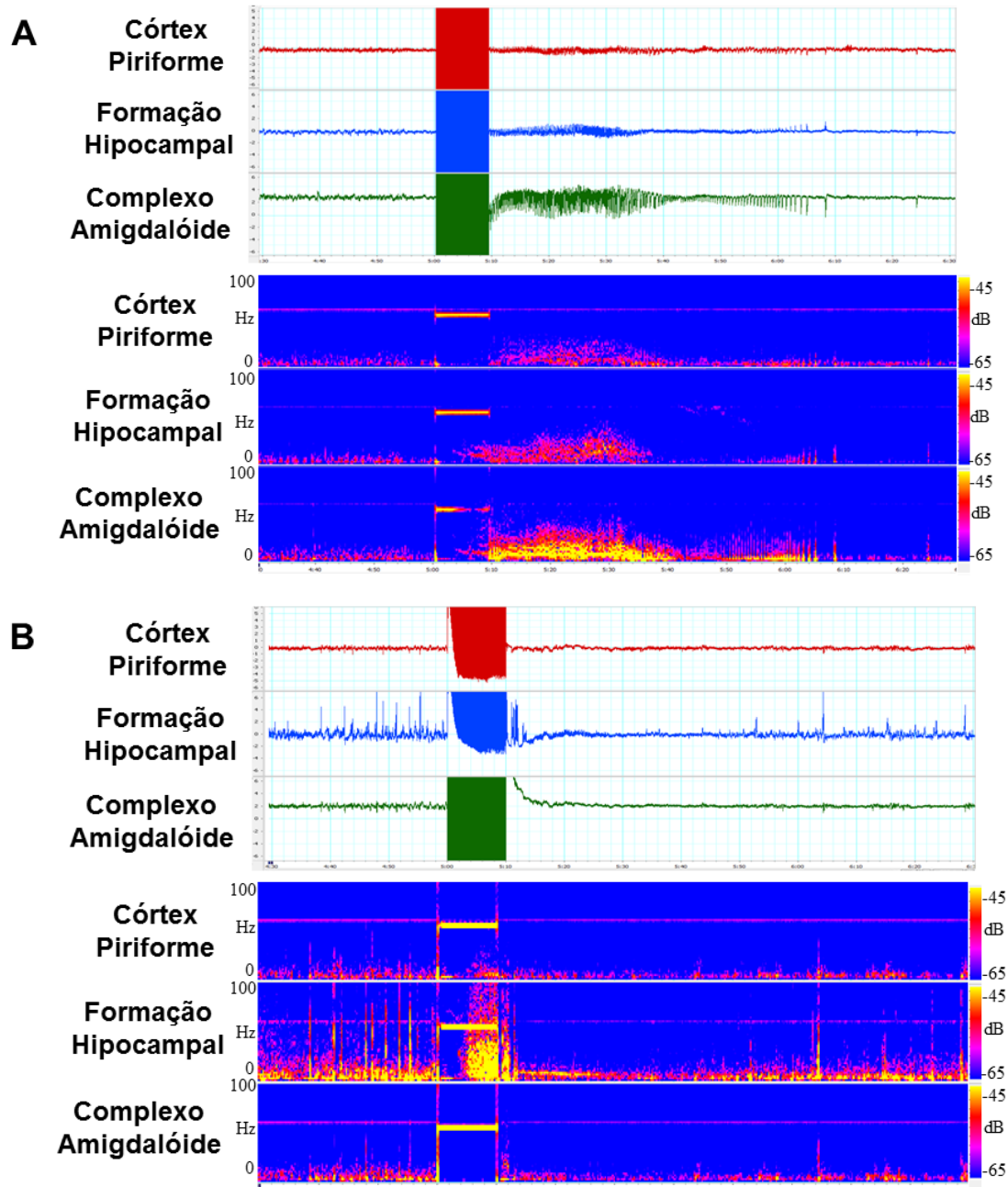
Durante o 21º estímulo elétrico (ESTÍMULO), o grupo Veículo (Figura 30A, N= 05) apresentou SOB e RE além de cinco comportamentos límbicos como: MT, POHL, mioclonia da cabeça (MIO<sub>c</sub>), mioclonia das patas anteriores (MIO<sub>1</sub>) e elevação (ELE), enquanto o grupo HUF-101 (Figura 30B, N= 05) apresentou quatro comportamentos límbicos: MT, POHL, MIO<sub>c</sub> e MIO<sub>1</sub>, além do RE.

No período posterior ao 21º estímulo, para o grupo Veículo (Figura 30A, N= 05) observamos seis comportamentos límbicos (Índice de Gravidade para Crises Límbicas= 5), tais como: MT, POLH, MIO<sub>c</sub>, MIO<sub>1</sub>, ELE e mioclonia generalizada (MIO<sub>g</sub>), assim como oito comportamentos descritos como Outros, incluindo os clássicos comportamentos exploratórios (CHP, CM, ER, PR e SQ), um comportamento de medo (BC) e 11 comportamentos de autolimpeza (com 15 interações). Para o mesmo período, o grupo HUF-101 (Figura 30B, N= 05) apresentou uma expressiva redução do número de comportamentos límbicos (Índice de Gravidade para Crises Límbicas= 2) em relação ao grupo Veículo (Figura 30A), com a presença de quatro comportamentos límbicos (MT, POLH, MIO<sub>c</sub> e mioclonia de orelha [MIO<sub>o</sub>]) e também um comportamento de medo (BC), 8 comportamentos descritos como Outros (retângulos azuis vazados) e 12 comportamentos de autolimpeza (com 15 interações).

Assim, a sequência comportamental indicou que o HUF-101 suprimiu as crises límbicas, particularmente no período posterior ao estímulo (3º célula, PÓS, Figura 30B), confirmando a análise quantitativa para severidade das crises, observado pelo Índice de Gravidade para Crises Límbicas (ver tópico 8.4.2.).

#### **8.4.4 ANÁLISE EEGRÁFICA CONFIRMA O EFEITO ANTICONVULSIVANTE DO HUF-101**

A análise espectral do sinal, ilustrada na Figura 31 confirma o efeito anticonvulsivante (verificado nas Figuras 29C e 30B através da menor amplitude do sinal EEGráfico (eixo Y direita), duração (eixo X) e distribuição das frequências (presença de menores frequências, eixo Y esquerda) para um animal do grupo HUF-101, em relação a outro animal do grupo Veículo, para o mesmo período.



**Figura 31.** Efeitos de uma única dose de HUF-101 no 21º estímulo elétrico: análise espectral confirma o efeito anticonvulsivante do HUF-101 (B), observado pela menor amplitude do sinal EEGráfico (eixo y direita), duração (eixo X) e distribuição das frequências (presença de menores frequências, eixo Y esquerda), comparando a um animal controle (grupo Veículo, A), para o mesmo período.

## 8.5 DISCUSSÃO

A dose única de HUF-101, um derivado sintético do CBD, reduziu significativamente a gravidade das crises límbicas no estímulo teste, em comparação com os ratos tratados com veículo (grupo Controle,  $p < 0,05$ ; teste *Mann Whitney*, Figura 29C). Além disso, a análise detalhada neuroetológica confirmou o efeito supressor do HUF-101

nas crises induzidas pelo ARA, dada a redução da expressão dos comportamentos límbicos (Figura 30B). A análise espectral do EEG também indicou que o HUF-101 reduziu a atividade epileptiforme, demonstrada por comparações das amplitudes e duração do sinal, sobre a distribuição das frequências (com presença de frequências mais baixas) no último estímulo, em relação ao mesmo período para o rato tratado com veículo (Figura 31).

O CBD tem sido uma importante alternativa no tratamento das Epilepsias, particularmente aquelas refratárias ao tratamento farmacológico (SZAFLARSKI; MARTINA BEBIN, 2014). Existe atualmente uma vultuosa parcela de pesquisadores no mundo que investigam diferentes aspectos do CBD, impulsionados pelas fortes evidências anticonvulsivantes e neuroprotetoras (DEVINSKY et al., 2014, 2016; LEO; RUSSO; ELIA, 2016). Historicamente, existem relatos do uso medicinal da *Cannabis* e de seus extratos (presumivelmente com preparações predominantes em THC) em pessoas com Epilepsias, desde 2700 a.C. na Ásia, estendendo ao período medieval (DEVINSKY et al., 2014; FRIEDMAN; SIRVEN, 2017; SZAFLARSKI; MARTINA BEBIN, 2014; THOMAS; CUNNINGHAM, 2018). De fato, dois neurologistas independentes no século 19, Reynolds (1890) e Gowers (1881), documentaram os efeitos da *Cannabis* particularmente nas Epilepsias, baseados nas experiências e estudos de William O'Shaughnessy (1843). Entretanto, dada as preocupações com as propriedades psicoativas da *Cannabis*, somado a fatores raciais, econômicos, políticos e morais, seu uso foi proibido, em praticamente todo o mundo no século XX (THOMAS; CUNNINGHAM, 2018). Mas somente em 2018, o *Food and Drug Administration* (FDA), aprovou o Epidiolex® (*GW Pharmaceuticals*), uma solução oral com CBD purificado, para uso na síndrome de Dravet e Lennox-Gastaut (em pacientes com no mínimo 2 anos). Posteriormente, um relatório publicado em 2018 pela FDA avaliou o efeito, particularmente adverso do CBD, em 1391 pessoas com Epilepsias, no qual foram relatadas 20 mortes, em sua maioria na fase tardia ao início do tratamento, com exposição (mediana) de 275 dias (<<https://www.fda.gov/advisory-committees/peripheral-and-central-nervous-system-drugs-advisory-committee/briefing-information-april-19-2018-meeting-peripheral-and-central-nervous-system-pcns-drugs-advisory>).).

Em geral, há um interesse crescente por medicamentos menos tóxicos e mais naturais, entretanto há também uma polarização na recomendação ou não do uso do CBD e seus derivados. Nesta temática e de particular interesse, os modelos animais



possibilitam manipulações que obviamente por motivos éticos, inviabilizam seu uso na clínica. Assim, notavelmente as pesquisas experimentais são críticas e indicam efeitos importantes, tais como mostrado por Rosenberg e colaboradores (2015) em uma revisão que incluiu 34 estudos com seis diferentes espécies de animais, indicando propriedades anticonvulsivantes do THC em 62% dos estudos, somados aos efeitos pró-convulsivantes (3%), mistos (3%), além da ausência do efeito em 32% dos estudos. Similarmente, outros estudos básicos investigaram os efeitos do CBD, resumidos na Tabela 11.

**Tabela 11.** Efeito do CBD em diferentes modelos animais das Epilepsias.

(VILELA et al., 2017)	CBD (60 mg/kg) suprimiu as crises induzidas pelo PTZ. Adicionalmente o CBD preveniu o aumento da expressão de citocina pró inflamatória. Tais efeitos foram revertidos com antagonistas específicos de CB1, CB2 e TRPV1 (AM251, AM630 e SB366791, respectivamente).
(DO VAL-DA SILVA et al., 2017)	CBD (10 mg/kg, i.p.) teve efeito anticonvulsivante e neuroprotetor nos neurônios hipocâmpais após <i>Status Epilepticus</i> , induzido por pilocarpina. CBD tem efeito anticonvulsivante dependente de dose: (A) Estimulação Elétrica de 6 Hz (164 mg/kg, camundongo), modelo de Eletrochoque Máximo (88,9 mg/kg, rato), <i>Kindling</i> corneal (119 mg/kg, rato), mas não teve efeito no Abrasamento da Amígdala (dose de até 300 mg/kg).
(KLEIN et al., 2017)	CBD (100 mg/kg) reduziu significativamente as crises induzidas por PTZ, além disso, não foram observados efeitos do CBD dependente de ativação serotoninérgica.
(PELZ et al., 2017)	CBD (100 ng, i.c.v.) cronicamente administrado no início do período latente, após o <i>Status Epilepticus</i> , retardou o início das crises recorrentes espontâneas e reduziu a gravidade das crises, similar à administração única de CBD, também no mesmo período.
(HOSSEINZADEH et al., 2016)	Os canais BK influenciam os efeitos anticonvulsivantes do CBD no modelo de PTZ, mas não no modelo de Eletrochoque Máximo. Extratos de <i>Cannabis</i> ricos em CBD e canabidivarina tiveram efeito anticonvulsivante em diferentes modelos <i>in vivo</i> (incluindo <i>Status Epilepticus</i> [coadministrado com Valproato ou Fenobarbital], Crises Audiogênicas, Eletroque Máximo e PTZ).
(SHIRAZI-ZAND et al., 2013)	CBD exerceu efeito anticonvulsivante em crises do lobo temporal, induzidas por pilocarpina e por penicilina em ratos <i>Wistar-Kyoto</i> .
(HILL et al., 2013)	CBD suprimiu a atividade epileptiforme <i>in vitro</i> , somado ao efeito anticonvulsivante <i>in vivo</i> .
(JONES et al., 2012)	Pré-tratamento com CBD preveniu crises induzidas por inibidores de GABA, mas não crises induzidas por antagonistas da glicina.
(JONES et al., 2010)	CBD tem efeitos anticonvulsivos nas Crises Audiogênicas e Eletroque Máximo, ambos modelos de crise parcial com generalização secundária.
(CONSROE et al., 1982)	CBD e a <i>Cannabis sativa</i> protegeu contra Crises Audiogênicas e naquelas induzidas por leptazol, neste último caso também reduziu a mortalidade.
(CONSROE; WOLKIN, 1977)	(CBD) Canabidiol; (i.c.v.) intracerebroventricular; (i.p.) intraperitoneal e (PTZ) pentilenotetrazol.
(CARLINI et al., 1973)	

O CBD em humanos tem importantes efeitos na modulação das crises, em geral com redução da frequência e gravidade, somado à melhora na qualidade de vida, entretanto a maioria dos dados são anedóticos, com metodologias inapropriadas. Em especial, um importante estudo realizado por Devinsky e colaboradores (2016) indicou

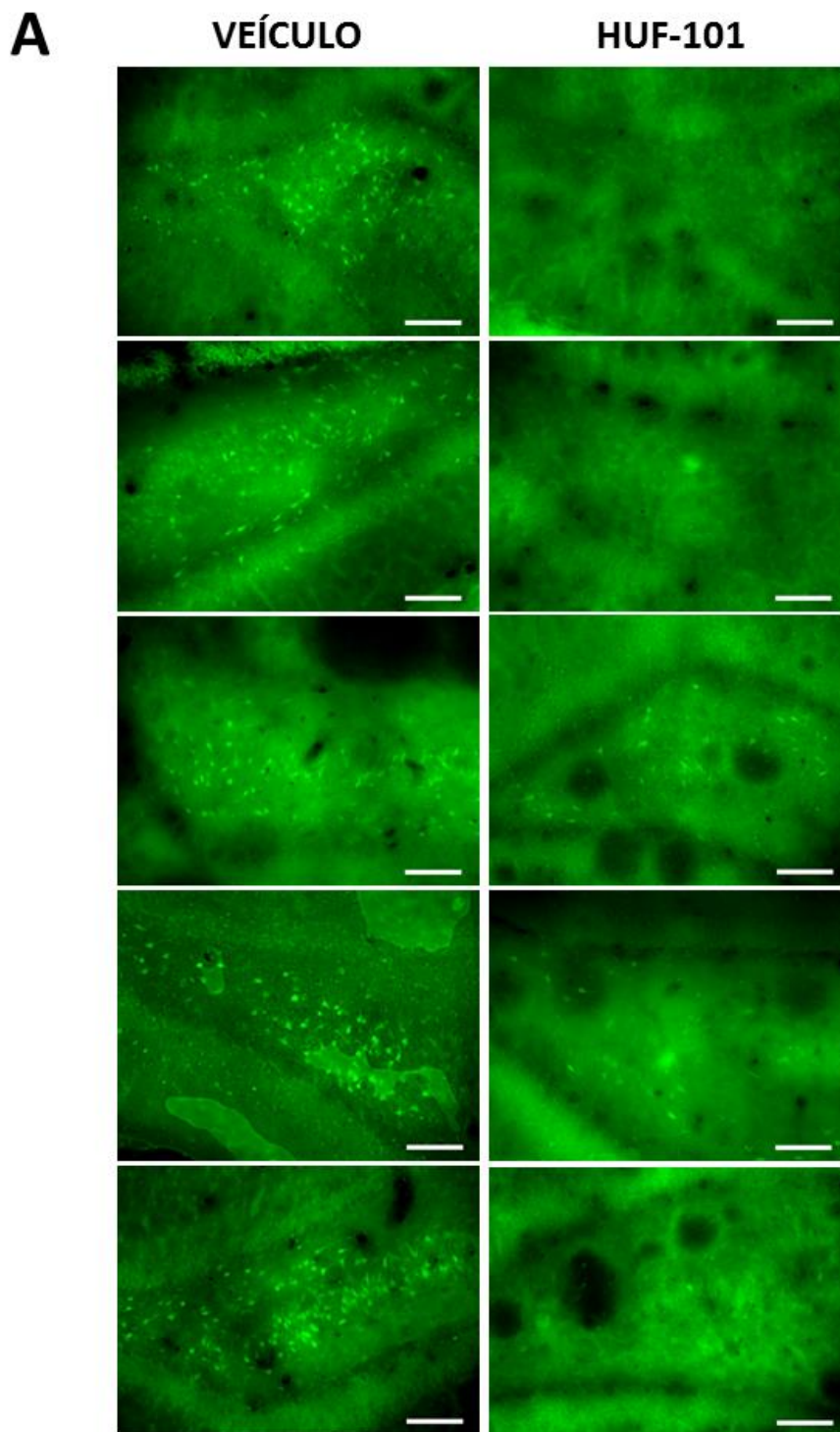


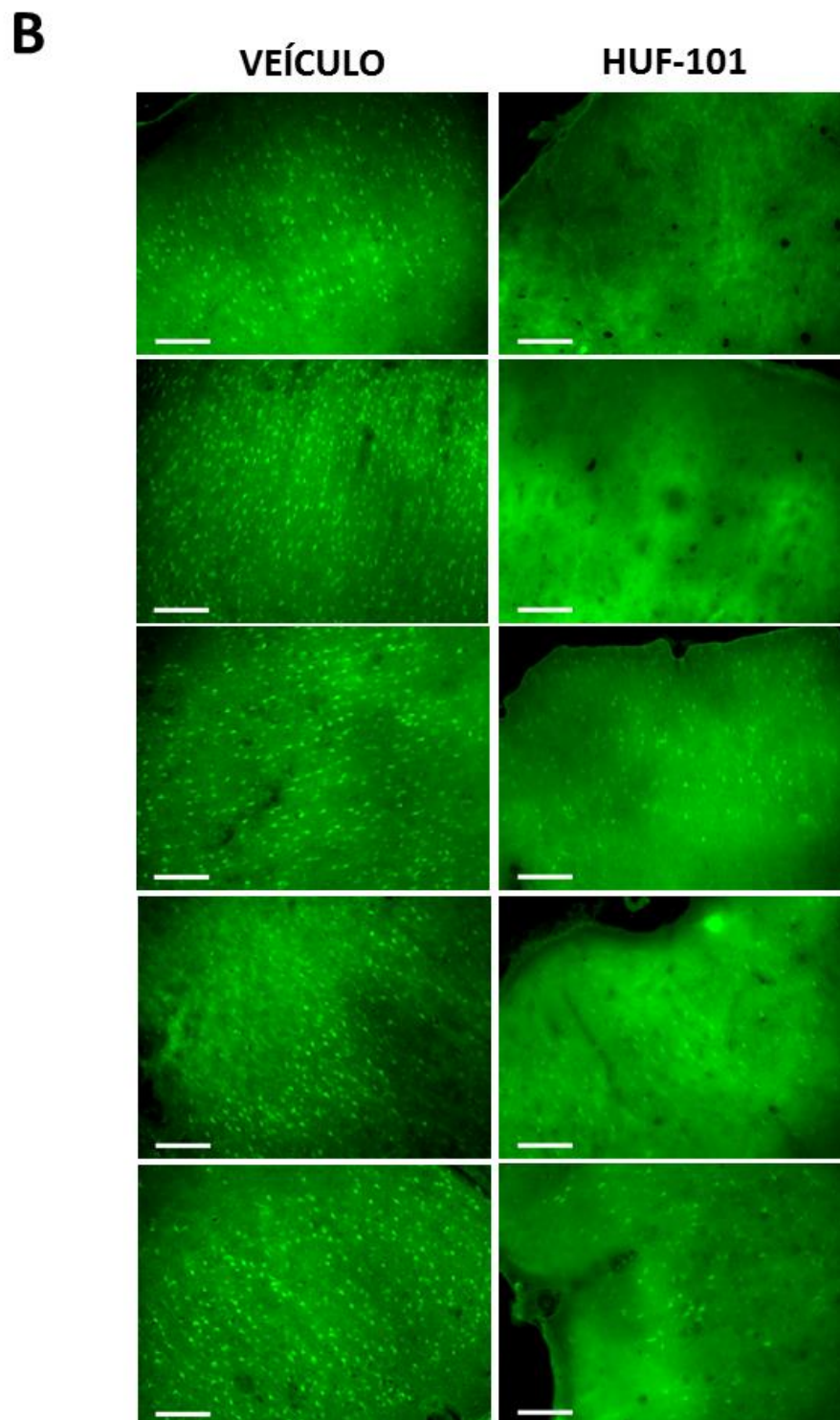
que a adição do CBD ao tratamento farmacológico foi seguro e clinicamente eficaz (com redução significativa na frequência das crises) em crianças e adultos jovens com Epilepsias fármaco resistentes, com a presença dos seguintes efeitos adversos (em 79% da amostra): sonolência, diminuição do apetite, diarreia e fadiga. Entretanto, uma importante preocupação quanto ao uso do CBD no tratamento de condições médicas, incluindo as Epilepsias, é o risco de dependência ao composto (abuso) ou a outras drogas (DEVINSKY et al., 2014). Além disso, a farmacocinética e a toxicidade (particularmente no desenvolvimento cognitivo, físico e comportamental) do CBD em crianças, ainda não são claros (DEVINSKY et al., 2014).

Em concordância com a maioria dos dados que indicam efeitos protetores do CBD nas crises e morte neuronal, nossos dados demonstram que o HUF-101, um derivado fluorado sintético do CBD, reduziu significativamente a gravidade das crises no período posterior ao estímulo teste (21º estímulo elétrico), observado pelo Índice de Gravidade para Crises Límbicas (Figura 29C;  $3,00 \pm 0,21$  versus  $1,71 \pm 0,47$ , para os grupos Veículos e HUF-101, respectivamente). Tais efeitos foram particularmente notados pela análise semi quantitativa, indicando diminuição do número e gravidade dos comportamentos límbicos no período pós estímulo (21º estímulo elétrico, Figura 29B), com a presença dos seguintes comportamentos: MT, POLH, MIO<sub>c</sub> e MIO<sub>o</sub> para o grupo HUF-101, em comparação com 6 comportamentos límbicos (tais como: MT, POLH, MIO<sub>c</sub>, MIO<sub>1</sub>, ELE e MIO<sub>g</sub>), expressados pelos animais controles (grupo Veículo). Além disso, nossos resultados confirmam a atividade modulatória do HUF-101 na excitabilidade neuronal, observada pela redução na amplitude do padrão *ictal* associada à diminuição da duração do sinal no grupo experimental comparado ao grupo Veículo (Figura 31). De fato, além dos efeitos anticonvulsivantes, outros estudos indicaram propriedades antinociceptiva (SILVA et al., 2017), antidepressiva (BREUER et al., 2016), ansiolítica (BREUER et al., 2016), antipsicótica (BREUER et al., 2016) e anticomulsiva (BREUER et al., 2016) do HUF-101, no sistema nervoso central de roedores. E ainda, o HUF-101 promove neuroproteção sensório-motora após lesão periférica, em ratos recém-nascidos (PEREZ et al., 2018).

Nossos achados parecem refletir características inerentes do modelo de Abrasamento da Amígdala, que segundo Ibeas Bih e colaboradores (2015), poderiam estar relacionados a vários alvos moleculares, incluindo inibição da captação sináptica de GABA e redução do cálcio intracelular (com base no perfil anticonvulsivante de fármacos

testados neste modelo; LOSCHER; BRANDT, 2010; LÖSCHER, 2011). Entretanto, como o ARA é um modelo preferencialmente de ictogênese e não epileptogênese (incluindo morte neuronal, como discutido no Capítulo I), testamos o potencial efeito neuroprotetor de HUF-101, em modelo frequentemente associado à perda neuronal significativa (CASTRO et al., 2011; FURTADO et al., 2011), após o *Status Epilepticus* induzido por injeção intrahipocampal de pilocarpina. Logo, o HUF-101 promoveu neuroproteção, indicada pela redução de células FJC<sup>+</sup> em neurônios hipocampais de CA3 e CA1, mas, curiosamente, não no hilus do giro denteado (Figura 32A, coluna da direita), e no Córtex Cerebral (Figura 32B, coluna da direita) comparado a ratos tratados com Veículo (Figura 32B, coluna da esquerda). Adicionalmente dados não mostrados indicaram que a administração aguda de HUF-101 (10 mg/kg i.p.) após o *Kindling* Audiogênico em animais da linhagem *WAR*, não teve efeito significativo nas latências para *wild running* (expressado pelo início da [s] corrida [s], seguida [s] por PU [s] e queda [s] atônica [s]) e crises tônico-clônicas, bem como na gravidade das crises.





**Figura 32.** Histoquímica de Fluoro-Jade C: (A) Hipocampo: coluna da esquerda animais injetados com Veículo e coluna da direita os animais do Grupo HUF-101, (B) Córtex Cerebral: coluna da esquerda animais injetados com Veículo e coluna da direita os animais do Grupo HUF-101. Podemos notar que os animais injetados com HUF-101 tiveram qualitativamente marcação reduzida para neurodegeneração FJC<sup>+</sup> após *Status Epilepticus*, em ambas as áreas: (A) Hipocampo e (B) Córtex Cerebral, evidenciado pela coloração verde (aumento digital de 20 x). Todos os tecidos foram submetidos à mesma bateria de realização da histoquímica. Barra de calibração de 100  $\mu$ m. As imagens foram adquiridas em microscópio de fluorescência *Leica DMI 600B*, com processamento foi realizado com auxílio do *software* aberto *Icy Bioimage* (Instituto Pasteur, Paris, França: <http://icy.bioimageanalysis.org/>).

Em conjunto, nossos achados sugerem que o HUF-101 exerce efeitos modulatórios distintos dependentes do modelo animal, semelhantes aos efeitos (mistos ou contraditórios) descritos na literatura para o CBD. Presumivelmente as ações dos derivados sintéticos do CBD, em particular do HUF-101, parecem basear-se nos mesmos mecanismos do CBD (BREUER et al., 2016). Além disso, o HUF-101 não induz os clássicos efeitos psicoativos (tétrade canabinóide, tais como: hipomotilidade, catalepsia, hipotermia e analgesia) do THC e de outros agonistas do receptores CB1 (SILVA et al., 2017). Apesar da baixa toxicidade, a fluoração do anel aromático do CBD (ou seja, o HUF-101), resulta no aumento da potência farmacológica em cerca de 3 x, o que de fato implica em menores doses terapêuticas (BREUER et al., 2016; PEREZ et al., 2018; SILVA et al., 2017), no entanto, essa proposição precisa ser claramente investigada. Logo, são necessários novos experimentos como a administração crônica, que potencialmente poderá fornecer maior apoio para a promissora eficácia do HUF-101 nas Epilepsias, similarmente aos tratamentos propostos na clínica (aspecto translacional: melhor validade preditiva), além da possível associação com tradicionais fármacos, como o Clobazam (CBD inibe isoformas do citocromo P450, como: CYP2C9 e CYP3A4; GEFREY et al., 2015), que similar aos achados com CBD, poderia potencializar os efeitos anticonvulsivantes (hipótese de sinergia: interação medicamentosa).

De fato, o CBD não é uma panaceia, mas como qualquer outro composto obviamente tem efeitos colaterais (ainda pouco conhecidos; BERGAMASCHI et al., 2011), somado aos mecanismos de ação não totalmente claros (provavelmente polifarmacológico). Logo são necessários mais estudos que possam contribuir para a compreensão do potencial terapêutico dos canabinóides e a modulação do sistema endocanabinóide, com o subsequente licenciamento terapêutico do CBD e derivados, no lugar do uso medicinal paliativo da *Cannabis* para as Epilepsias, privilegiando a segurança (incluindo confiabilidade do seu conteúdo, pureza e dose) e eficácia (THOMAS; CUNNINGHAM, 2018; para acesso ao documentário feita pelo Dr. Sanjay Gupta da CNN, sobre uso medicinal da *Cannabis* e seus derivados, ver < <https://www.bing.com/videos/search?q=CNN+Weed+Documentary&&view=detail&mid=98E4A417E38B9D094AE398E4A417E38B9D094AE3&FORM=VRDGAR>>)

## **8.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

De fato, a administração aguda do derivado fluorado sintético do CBD, o HUF-101 (10 mg/kg i.p.) teve efeitos anticonvulsivantes, observados pela supressão da atividade límbica epileptiforme nas respostas comportamentais e EEGráficas, após o ARA. Dados adicionais e complementares indicaram efeito neuroprotetor do HUF-101 somente após indução do *Status Epilepticus*.

## 9 TABELA SUPLEMENTAR

**TABELA SUPLEMENTAR 1.** Dicionário dos itens comportamentais e suas correspondentes siglas, observados no presente estudo (GARCIA-CAIRASCO et al., 1992).

Siglas	Descrição	Siglas	Descrição	Siglas	Descrição
AL	Autolimpeza frontal	ER	Ereto	MIOg	Mioclonia generalizada
ALD	Autolimpeza direita	GID	Girar à direita	MIOo	Mioclonia de orelha
ALE	Autolimpeza esquerda	GIE	Girar à esquerda	PIV	Pivotear
ALER	Alerta	LA	Lamber	POHL	Piscar os olhos
ALG	Autolimpeza de genitais	LCB	Lavar a cabeça	PR	Parar
BC	Bocejar	LG	Limpeza de garra	PU	Pular
CBC	Cabeceio	LGD <sub>1</sub>	Limpar a garra anterior direita	RE	Recuar
CCD	Coçar à direita	LGD <sub>2</sub>	Limpar a garra posterior direita	RO	Roer
CCE	Coçar à esquerda	LGE <sub>1</sub>	Limpar a garra anterior esquerda	SAC <sub>1</sub>	Sacudir a cabeça
CHP	Cheirar exploratório	LGE <sub>2</sub>	Limpar a garra posterior esquerda	SAC <sub>2</sub>	Sacudir o corpo
CM	Caminhar	LVca	Limpeza da cauda	SOB	Sobressalto
DCD	Dobramento corporal à direita	LVF	Lavar o focinho	SQ	Esquadrinhar
DCE	Dobramento corporal à esquerda	MAST	Mastigar	STN	Estendido
ESAB	Espasmo Abdominal	MIO <sub>1</sub>	Mioclonia de patas anteriores		
ELE	Elevação	MIOc	Mioclonia de cabeça		

---

## 10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMEC, R. E.; MORGAN, H. D. The effect of kindling of different nuclei in the left and right amygdala on anxiety in the rat. **Physiology & behavior**, v. 55, n. 1, p. 1–12, jan. 1994.

ADAMEC, R.; SHALLOW, T. Effects of baseline anxiety on response to kindling of the right medial amygdala. **Physiology & Behavior**, v. 70, n. 1–2, p. 67–80, jul. 2000.

ADAMS, R.; HUNT, M.; CLARK, J. H. Structure of Cannabidiol, a Product Isolated from the Marijuana Extract of Minnesota Wild Hemp. I. **Journal of the American Chemical Society**, v. 62, n. 1, p. 196–200, jan. 1940.

AGURELL, S. et al. Interactions of delta 1-tetrahydrocannabinol with cannabiniol and cannabidiol following oral administration in man. Assay of cannabiniol and cannabidiol by mass fragmentography. **Experientia**, v. 37, n. 10, p. 1090–2, 15 out. 1981.

ALMADA, R. C. et al. Serotonergic mechanisms of the median raphe nucleus-dorsal hippocampus in conditioned fear: Output circuit involves the prefrontal cortex and amygdala. **Behavioural brain research**, v. 203, n. 2, p. 279–87, 5 nov. 2009.

ALMADA, R. C.; COIMBRA, N. C.; BRANDÃO, M. L. Medial prefrontal cortex serotonergic and GABAergic mechanisms modulate the expression of contextual fear: intratelencephalic pathways and differential involvement of cortical subregions. **Neuroscience**, v. 284, p. 988–97, 22 jan. 2015.

APFELBACH, R. et al. The effects of predator odors in mammalian prey species: a review of field and laboratory studies. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 29, n. 8, p. 1123–44, jan. 2005.

APPLEGATE, C. D.; BURCHFIEL, J. L.; KONKOL, R. J. Kindling antagonism: effects of norepinephrine depletion on kindled seizure suppression after concurrent, alternate stimulation in rats. **Experimental neurology**, v. 94, n. 2, p. 379–90, nov. 1986.

APPLEGATE, C. D.; KONKOL, R. J.; BURCHFIEL, J. L. Kindling antagonism : a role for hindbrain norepinephrine in the development of site suppression following concurrent , alternate stimulation. v. 407, p. 212–222, 1987.

ARISI, G. M.; GARCIA-CAIRASCO, N. Doublecortin-positive newly born granule cells of hippocampus have abnormal apical dendritic morphology in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. **Brain research**, v. 1165, p. 126–34, 24 ago. 2007.

ASLA PITKÄNEN ASLA PITKÄNEN PHILIP SCHWARTZKROIN SOLOMON MOSHÉ. **Models of Seizures and Epilepsy**. [s.l.] Elsevier, 2006.



ASOK, A. et al. Immediate early gene and neuropeptide expression following exposure to the predator odor 2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline. v. 248, p. 85–93, 2013.

ASOK, A.; SCHULKIN, J.; ROSEN, J. B. Corticotropin releasing factor type-1 receptor antagonism in the dorsolateral bed nucleus of the stria terminalis disrupts contextually conditioned fear, but not unconditioned fear to a predator odor. **Psychoneuroendocrinology**, v. 70, p. 17–24, 2016.

AYERS, L. W. et al. Freezing to the predator odor 2,4,5 dihydro 2,5 trimethylthiazoline (TMT) is disrupted by olfactory bulb removal but not trigeminal deafferentation. **Behavioural brain research**, v. 253, p. 54–9, 15 set. 2013.

AYERS, L. W. et al. Changes in dam and pup behavior following repeated postnatal exposure to a predator odor (TMT): A preliminary investigation in Long-Evans rats. **Developmental psychobiology**, v. 58, n. 2, p. 176–84, mar. 2016.

BARD, P. A DIENCEPHALIC MECHANISM FOR THE EXPRESSION OF RAGE WITH SPECIAL REFERENCE TO THE SYMPATHETIC NERVOUS SYSTEM. **American Journal of Physiology-Legacy Content**, v. 84, n. 3, p. 490–515, abr. 1928.

BEN-ARI, Y. et al. Diazepam pretreatment reduces distant hippocampal damage induced by intra-amygdaloid injections of kainic acid. **European journal of pharmacology**, v. 52, n. 3–4, p. 419–20, 1 dez. 1978.

BENGZON, J. et al. Apoptosis and proliferation of dentate gyrus neurons after single and intermittent limbic seizures. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 19, p. 10432–7, 16 set. 1997.

BERGAMASCHI, M. M. et al. Safety and side effects of cannabidiol, a Cannabis sativa constituent. **Current drug safety**, v. 6, n. 4, p. 237–49, 1 set. 2011.

BERGSTROM, R. A. et al. Automated identification of multiple seizure-related and interictal epileptiform event types in the EEG of mice. **Scientific reports**, v. 3, p. 1483, jan. 2013.

BERTRAM, E. The Relevance of Kindling for Human Epilepsy. **Epilepsia**, v. 48, n. s2, p. 65–74, abr. 2007.

BETTS, T. Use of aromatherapy (with or without hypnosis) in the treatment of intractable epilepsy—a two-year follow-up study. **Seizure**, v. 12, n. 8, p. 534–538, dez. 2003.

BIALER, M.; WHITE, H. S. Key factors in the discovery and development of new antiepileptic drugs. v. 9, n. JANUARY, 2010.

BINDI, R. P.; BALDO, M. V. C.; CANTERAS, N. S. Roles of the anterior basolateral amygdalar nucleus during exposure to a live predator and to a predator-associated context.

**Behavioural Brain Research**, v. 342, p. 51–56, abr. 2018.

BLANCHARD, D. C. BLANCHARD, G. G. & D. J. Defensive behaviors, fear and anxiety. In: **Hanbook of anxiety and fear**. Nutt (Eds. ed. Amsterdam: Elsevier academic press., 2008.

BLANCHARD, D. C. et al. Failure to produce conditioning with low-dose trimethylthiazoline or cat feces as unconditioned stimuli. **Behavioral Neuroscience**, v. 117, n. 2, p. 360–368, 2003.

BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J.; ROSEN, J. Olfaction and defense. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 32, n. 7, p. 1207–8, set. 2008.

BLANCHARD, D. C.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, R. J. Conditioning and residual emotionality effects of predator stimuli: some reflections on stress and emotion. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 27, n. 8, p. 1177–85, dez. 2003.

BLANCHARD, R. J. et al. Cue and context conditioning of defensive behaviors to cat odor stimuli. v. 25, p. 587–595, 2001.

BOTTERILL, J. J. et al. Aberrant hippocampal neurogenesis after limbic kindling: Relationship to BDNF and hippocampal-dependent memory. **Epilepsy & Behavior**, v. 47, p. 83–92, jun. 2015.

BOWMAN, K. M. Bodily Changes in Pain, Hunger, Fear and Rage. By Walter B. Cannon. 404 pages. ( New York: D. Appleton & Co., 1929. ). **American Journal of Psychiatry**, v. 86, n. 4, p. 770–771, jan. 1930.

BOYLE, J. A. et al. Cross-modal integration of intranasal stimuli: a functional magnetic resonance imaging study. **Neuroscience**, v. 149, n. 1, p. 223–31, 12 out. 2007.

BOZORG, A. M.; BENBADIS, S. R. Essential oils as a cause of breakthrough seizure after temporal lobectomy. **Seizure**, v. 18, n. 8, p. 604–5, out. 2009.

BRAND, G. Olfactory/trigeminal interactions in nasal chemoreception. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 30, n. 7, p. 908–17, jan. 2006.

BRECHBÜHL, J. et al. Mouse alarm pheromone shares structural similarity with predator scents. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 12, p. 4762–7, 19 mar. 2013.

BREUER, A. et al. Fluorinated Cannabidiol Derivatives: Enhancement of Activity in Mice Models Predictive of Anxiolytic, Antidepressant and Antipsychotic Effects. **PloS one**, v. 11, n. 7, p. e0158779, 2016.

BROWN, J. S.; KALISH, H. I.; FARBER, I. E. Conditioned fear as revealed by magnitude of startle response to an auditory stimulus. **Journal of experimental psychology**,

---

v. 41, n. 5, p. 317–28, maio 1951.

BUI, A. D. et al. Dentate gyrus mossy cells control spontaneous convulsive seizures and spatial memory. **Science**, v. 790, n. February, p. 787–790, 2018.

BURKHARD, P. R. et al. Plant-induced seizures: reappearance of an old problem. **Journal of neurology**, v. 246, n. 8, p. 667–70, ago. 1999.

CAMMISULI, S. et al. Effects of extended electrical kindling on exploratory behavior and spatial learning. **Behavioural brain research**, v. 89, n. 1–2, p. 179–90, dez. 1997.

CANNON WB. BODILY CHANGES IN PAIN , HUNGER , FEAR A N D RAGE AN ACCOUNT OF RECENT RE-. 1915.

CANNON WB. Organization for physiological homeostasis. **Physiol Rev**, v. 9, p. 399–431, 1929.

CANTERAS, N. S. et al. Sensing danger through the olfactory system: the role of the hypothalamic dorsal premammillary nucleus. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 32, n. 7, p. 1228–35, set. 2008a.

CANTERAS, N. S. et al. Sensing danger through the olfactory system: The role of the hypothalamic dorsal premammillary nucleus. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 32, n. 7, p. 1228–1235, set. 2008b.

CANTERAS, N. S.; PAVESI, E.; CAROBREZ, A. P. Olfactory instruction for fear: neural system analysis. **Frontiers in neuroscience**, v. 9, p. 276, jan. 2015.

CARLA, J. et al. Epilepsy & Behavior Temporally unstructured electrical stimulation to the amygdala suppresses behavioral chronic seizures of the pilocarpine animal model. v. 36, p. 159–164, 2014.

CARLINI, E. A. et al. Letter: Cannabidiol and Cannabis sativa extract protect mice and rats against convulsive agents. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 25, n. 8, p. 664–5, ago. 1973.

CASTRO, G. P. et al. Wistar audiogenic rats display abnormal behavioral traits associated with artificial selection for seizure susceptibility. **Epilepsy & Behavior**, v. 71, p. 243–249, jun. 2017.

CASTRO, O. W. et al. Comparative neuroanatomical and temporal characterization of FluoroJade-positive neurodegeneration after status epilepticus induced by systemic and intrahippocampal pilocarpine in Wistar rats. **Brain research**, v. 1374, p. 43–55, 16 fev. 2011.

CAVALHEIRO, E. A. The pilocarpine model of epilepsy. **Italian journal of neurological sciences**, v. 16, n. 1–2, p. 33–7, [s.d.].

CEZARIO, A. F. et al. Hypothalamic sites responding to predator threats - the role of

the dorsal premammillary nucleus in unconditioned and conditioned antipredatory defensive behavior. **European Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 5, p. 1003–1015, set. 2008.

CHO, K.-O. et al. Aberrant hippocampal neurogenesis contributes to epilepsy and associated cognitive decline. **Nature communications**, v. 6, p. 6606, jan. 2015.

CILIO, M. R.; THIELE, E. A.; DEVINSKY, O. The case for assessing cannabidiol in epilepsy. **Epilepsia**, v. 55, n. 6, p. 787–90, jun. 2014.

COLESHILL, S. G. et al. Material-specific recognition memory deficits elicited by unilateral hippocampal electrical stimulation. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 24, n. 7, p. 1612–6, 18 fev. 2004.

CONSROE, P. et al. Effects of cannabidiol on behavioral seizures caused by convulsant drugs or current in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 83, n. 3–4, p. 293–298, set. 1982.

CONSROE, P. F.; WOOD, G. C.; BUCHSBAUM, H. Anticonvulsant nature of marihuana smoking. **JAMA**, v. 234, n. 3, p. 306–7, 20 out. 1975.

CONSROE, P.; WOLKIN, A. Cannabidiol--antiepileptic drug comparisons and interactions in experimentally induced seizures in rats. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 201, n. 1, p. 26–32, abr. 1977.

COTA, V. R. et al. Epilepsy & Behavior Distinct patterns of electrical stimulation of the basolateral amygdala influence pentylenetetrazole seizure outcome. **Epilepsy and Behavior**, v. 14, n. 1, p. 26–31, 2009.

CRUZ, S. L. et al. Effects of inhaled toluene and 1,1,1-trichloroethane on seizures and death produced by N-methyl-D-aspartic acid in mice. **Behavioural brain research**, v. 140, n. 1–2, p. 195–202, 18 mar. 2003.

CUNHA, A. O. S. et al. Inhibition of long-term potentiation in the schaffer-CA1 pathway by repetitive high-intensity sound stimulation. **Neuroscience**, v. 310, p. 114–27, 3 dez. 2015.

CUNHA, J. M. et al. Chronic administration of cannabidiol to healthy volunteers and epileptic patients. **Pharmacology**, v. 21, n. 3, p. 175–85, 1980.

CURTIS, A. L. et al. Neuropharmacology Predator stress engages corticotropin-releasing factor and opioid systems to alter the operating mode of locus coeruleus norepinephrine neurons. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 4, p. 1737–1745, 2012.

DAILEY, J. W.; NARITOKU, D. K. Antidepressants and Seizures : Clinical Anecdotes Overshadow Neuroscience. v. 2952, n. 96, p. 1323–1329, 1996.

DANZER, S. C. Contributions of Adult-Generated Granule Cells to Hippocampal

Pathology in Temporal Lobe Epilepsy: A Neuronal Bestiary. **Brain Plasticity**, v. 3, n. 2, p. 169–181, 2018.

DAVIS, M. Pharmacological analysis of fear-potentiated startle. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, v. 26, n. 3, p. 235–60, mar. 1993.

DAY, H. E. W.; MASINI, C. V; CAMPEAU, S. The pattern of brain c-fos mRNA induced by a component of fox odor, 2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline (TMT), in rats, suggests both systemic and processive stress characteristics. **Brain research**, v. 1025, n. 1–2, p. 139–51, 29 out. 2004.

DE DEUS, J. L. et al. A single episode of high intensity sound inhibits long-term potentiation in the hippocampus of rats. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 14094, 26 out. 2017.

DE KLOET, E. R.; JOËLS, M.; HOLSBOER, F. Stress and the brain: from adaptation to disease. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 6, n. 6, p. 463–75, jun. 2005.

DELFINO-PEREIRA, P. et al. Intense olfactory stimulation blocks seizures in an experimental model of epilepsy. **Epilepsy and Behavior**, v. 79, 2018a.

DELFINO-PEREIRA, P. et al. Intense olfactory stimulation blocks seizures in an experimental model of epilepsy. **Epilepsy & Behavior**, v. 79, p. 213–224, fev. 2018b.

DEVINSKY, O. et al. Cannabidiol: Pharmacology and potential therapeutic role in epilepsy and other neuropsychiatric disorders. **Epilepsia**, v. 55, n. 6, p. 791–802, jun. 2014.

DEVINSKY, O. et al. Cannabidiol in patients with treatment-resistant epilepsy: an open-label interventional trial. **The Lancet. Neurology**, v. 15, n. 3, p. 270–8, mar. 2016.

DIAS SOARES, D. et al. Fox odour affects corticosterone release but not hippocampal serotonin reuptake and open field behaviour in rats. **Brain research**, v. 961, n. 1, p. 166–70, 24 jan. 2003.

DIELENBERG, R. A.; MCGREGOR, I. S. Defensive behavior in rats towards predatory odors: a review. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 25, n. 7–8, p. 597–609, dez. 2001.

DO VAL-DA SILVA, R. A. et al. Protective Effects of Cannabidiol against Seizures and Neuronal Death in a Rat Model of Mesial Temporal Lobe Epilepsy. **Frontiers in pharmacology**, v. 8, p. 131, 2017.

DOEGITO, E. et al. New Techniques for Preparing Submicronic Emulsions - Application to Amphotericin-B. **Stp Pharma Sciences**, v. 4, n. 2, p. 155–162, abr. 1994.

DORETTO, M. C. et al. Quantitative study of the response to genetic selection of the Wistar audiogenic rat strain (WAR). **Behavior genetics**, v. 33, n. 1, p. 33–42, jan. 2003.

DUTRA MORAES, M. F.; GALVIS-ALONSO, O. Y.; GARCIA-CAIRASCO, N. Audiogenic kindling in the Wistar rat: A potential model for recruitment of limbic structures. **Epilepsy Research**, v. 39, n. 3, p. 251–259, 2000.

EADIE, M. Epilepsy—from the Sakikku to hughlings Jackson. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 2, n. 2, p. 156–162, abr. 1995.

EBERT, U.; LÖSCHER, W. Differences in mossy fibre sprouting during conventional and rapid amygdala kindling of the rat. **Neuroscience letters**, v. 190, n. 3, p. 199–202, 12 maio 1995.

EBERT, U.; LÖSCHER, W. Strong olfactory stimulation reduces seizure susceptibility in amygdala-kindled rats. **Neuroscience Letters**, v. 287, n. 3, p. 199–202, jun. 2000a.

EBERT, U.; LÖSCHER, W. Strong olfactory stimulation reduces seizure susceptibility in amygdala-kindled rats. **Neuroscience letters**, v. 287, n. 3, p. 199–202, 30 jun. 2000b.

EFRON, R. The effect of olfactory stimuli in arresting uncinata fits. **Brain : a journal of neurology**, v. 79, n. 2, p. 267–81, jun. 1956.

EFRON, R. The conditioned inhibition of uncinata fits. **Brain : a journal of neurology**, v. 80, n. 2, p. 251–62, jun. 1957.

ELIAS, L. L. K.; DORIVAL CAMPOS, A.; MOREIRA, A. C. The opposite effects of short- and long-term salt loading on pituitary adrenal axis activity in rats. **Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme**, v. 34, n. 4, p. 207–11, abr. 2002.

ENDRES, T.; APFELBACH, R.; FENDT, M. Behavioral Changes Induced in Rats by Exposure to Trimethylthiazoline , a Component of Fox Odor. **Behavioral neuroscience**, v. 119, n. 4, p. 1004–1010, ago. 2005.

ENDRES, T.; FENDT, M. Conditioned behavioral responses to a context paired with the predator odor trimethylthiazoline. **Behavioral neuroscience**, v. 121, n. 3, p. 594–601, jun. 2007.

ENGEL J, BIRBECK GL, DIOP AG, JAIN S, P. A. **EPILEPSY : GLOBAL ISSUES FOR THE PRACTICING NEUROLOGIST**. New York: Demos Medical.: [s.n.].

ENGEL, J. Concepts of epilepsy. **Epilepsia**, v. 36 Suppl 1, p. S23-9, jan. 1995.

ENGEL, J. et al. Practice parameter: temporal lobe and localized neocortical resections for epilepsy: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology, in association with the American Epilepsy Society and the American Association of Neuro. **Neurology**, v. 60, n. 4, p. 538–47, 25 fev. 2003.

ENGLLOT, D. J.; BLUMENFELD, H. Consciousness and epilepsy : why are complex-

---

partial seizures complex ? v. 177, n. 09, p. 147–170, 2009.

FAZAN, R. et al. Changes in autonomic control of the cardiovascular system in the Wistar audiogenic rat (WAR) strain. **Epilepsy & behavior : E&B**, v. 22, n. 4, p. 666–70, dez. 2011.

FAZAN, R. et al. Evaluation of Cardiovascular Risk Factors in the Wistar Audiogenic Rat (WAR) Strain. **PLoS one**, v. 10, n. 6, p. e0129574, jan. 2015.

FEINSTEIN, B.; GLEASON, C. A.; LIBET, B. Stimulation of Locus Coeruleus in Man. **Stereotactic and Functional Neurosurgery**, v. 52, n. 1, p. 26–41, 1989.

FENDT, M. et al. TMT-induced autonomic and behavioral changes and the neural basis of its processing. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 29, n. 8, p. 1145–56, jan. 2005.

FENDT, M.; ENDRES, T. 2,3,5-Trimethyl-3-thiazoline (TMT), a component of fox odor - just repugnant or really fear-inducing? **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 32, n. 7, p. 1259–66, set. 2008.

FENDT, M.; ENDRES, T.; APFELBACH, R. Temporary Inactivation of the Bed Nucleus of the Stria Terminalis But Not of the Amygdala Blocks Freezing Induced by Trimethylthiazoline , a Component of Fox Feces. v. 23, n. 1, p. 23–28, 2003.

FILE, S. E. et al. Dissociation between behavioral and corticosterone responses on repeated exposures to cat odor. **Physiology & Behavior**, v. 54, n. 6, p. 1109–1111, dez. 1993.

FISHER, R. S. Animal models of the epilepsies. **Brain research. Brain research reviews**, v. 14, n. 3, p. 245–78, 1989.

FISHER, R. S. et al. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). **Epilepsia**, v. 46, n. 4, p. 470–2, abr. 2005a.

FISHER, R. S. et al. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). **Epilepsia**, v. 46, n. 4, p. 470–2, abr. 2005b.

FISHER, R. S. et al. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. **Epilepsia**, v. 55, n. 4, p. 475–82, 12 abr. 2014.

FISHER, R. S. et al. Instruction manual for the ILAE 2017 operational classification of seizure types. **Epilepsia**, v. 58, n. 4, p. 531–542, abr. 2017.

FITZGERALD, P. J. Is elevated norepinephrine an etiological factor in some cases of epilepsy? **Seizure**, v. 19, n. 6, p. 311–8, jul. 2010.

FORESTI, M. **Efeito da quelação de zinco no desenvolvimento de crises epiléticas límbicas no modelo de abrasamento elétrico rápido da amígdala.** [s.l: s.n.].

FORESTI, M. L. et al. Chelatable zinc modulates excitability and seizure duration in the amygdala rapid kindling model. **Epilepsy research**, v. 79, n. 2–3, p. 166–72, maio 2008.

FORTES-MARCO, L. et al. Avoidance and contextual learning induced by a kairomone, a pheromone and a common odorant in female CD1 mice. **Frontiers in neuroscience**, v. 9, p. 336, 2015.

FOURNIER, N. M. et al. The effect of amygdala kindling on hippocampal neurogenesis coincides with decreased reelin and DISC1 expression in the adult dentate gyrus. **Hippocampus**, v. 20, n. 5, p. 659–71, maio 2010.

FOURNIER, N. M. et al. Impaired recruitment of seizure-generated neurons into functional memory networks of the adult dentate gyrus following long-term amygdala kindling. v. 244, p. 96–104, 2013a.

FOURNIER, N. M. et al. Impaired recruitment of seizure-generated neurons into functional memory networks of the adult dentate gyrus following long-term amygdala kindling. **Experimental Neurology**, v. 244, p. 96–104, jun. 2013b.

FRIEDMAN, D.; SIRVEN, J. I. Historical perspective on the medical use of cannabis for epilepsy: Ancient times to the 1980s. **Epilepsy & Behavior**, v. 70, p. 298–301, maio 2017.

FURTADO, M. A. et al. Study of spontaneous recurrent seizures and morphological alterations after status epilepticus induced by intrahippocampal injection of pilocarpine. **Epilepsy & behavior : E&B**, v. 20, n. 2, p. 257–66, mar. 2011.

FURTADO, M. DE A. et al. Behavioral, morphologic, and electroencephalographic evaluation of seizures induced by intrahippocampal microinjection of pilocarpine. **Epilepsia**, v. 43 Suppl 5, p. 37–9, jan. 2002.

GALLIOT, E. et al. Fear-like behavioral responses in mice in different odorant environments: Trigeminal versus olfactory mediation under low doses. **Behavioural processes**, v. 90, n. 2, p. 161–6, jun. 2012.

GALVIS-ALONSO, O. Y.; CORTES DE OLIVEIRA, J. A.; GARCIA-CAIRASCO, N. Limbic epileptogenicity, cell loss and axonal reorganization induced by audiogenic and amygdala kindling in wistar audiogenic rats (WAR strain). **Neuroscience**, v. 125, n. 3, p. 787–802, jan. 2004.

GAONI, Y.; MECHOULAM, R. Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. **Journal of the American Chemical Society**, v. 86, n. 8, p. 1646–1647, abr. 1964.

GARCIA-CAIRASCO, N., PEREIRA, P.D., BERTTI-DUTRA, P., OLIVEIRA, J.A.C., DEL VECCHIO, F., MEDEIROS, D. C. ET AL. **Behavioral, EEGraphic and chemical**



---

**characterization of the anticonvulsant effects of the predator odor (TMT) in the rapid electrical kindling, a model of temporal lobe epilepsy.** Barcelone: [s.n.].

GARCIA-CAIRASCO, N. et al. New insights into behavioral evaluation of audiogenic seizures. A comparison of two ethological methods. **Behavioural brain research**, v. 48, n. 1, p. 49–56, 8 maio 1992.

GARCIA-CAIRASCO, N. et al. Neuroethological and morphological (Neo-Timm staining) correlates of limbic recruitment during the development of audiogenic kindling in seizure susceptible Wistar rats. **Epilepsy Research**, v. 26, n. 1, p. 177–192, 1996.

GARCIA-CAIRASCO, N. et al. Reduced exploratory activity of audiogenic seizures susceptible Wistar rats. **Physiology & behavior**, v. 64, n. 5, p. 671–4, jul. 1998.

GARCIA-CAIRASCO, N. et al. Epilepsy & Behavior The Wistar Audiogenic Rat ( WAR ) strain and its contributions to epileptology and related comorbidities : History and perspectives. **Epilepsy & Behavior**, 2017.

GARCIA-CAIRASCO, N.; TERRA, V. C.; DORETTO, M. C. Midbrain substrates of audiogenic seizures in rats. **Behavioural brain research**, v. 58, n. 1–2, p. 57–67, 20 dez. 1993.

GEFFREY, A. L. et al. Drug-drug interaction between clobazam and cannabidiol in children with refractory epilepsy. **Epilepsia**, v. 56, n. 8, p. 1246–1251, ago. 2015.

GIORGI, F. S. et al. The role of norepinephrine in epilepsy: from the bench to the bedside. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 28, n. 5, p. 507–24, set. 2004.

GIRE, D. H. et al. Information for decision-making and stimulus identification is multiplexed in sensory cortex. n. June, 2013.

GOBIRA, P. H. et al. Cannabidiol, a Cannabis sativa constituent, inhibits cocaine-induced seizures in mice: Possible role of the mTOR pathway and reduction in glutamate release. **Neurotoxicology**, v. 50, p. 116–21, set. 2015.

GODDARD, G. V. The kindling model of epilepsy. **Trends in Neurosciences**, v. 6, n. July, p. 275–279, 1983.

GODDARD, G. V. Development of epileptic seizures through brain stimulation at low intensity. **Nature**, v. 214, n. 5092, p. 1020–1, 3 jun. 1967.

GODDARD, G. V; MCINTYRE, D. C.; LEECH, C. K. A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. **Experimental neurology**, v. 25, n. 3, p. 295–330, nov. 1969.

GODOY, L. D. et al. A comprehensive overview on stress neurobiology: Basic concepts and clinical implications. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 12, 2018a.

GODOY, L. D. et al. Multimodal early-life stress induces biological changes associated

to psychopathologies. **Hormones and Behavior**, v. 100, p. 69–80, abr. 2018b.

GOTTFRIED, J. A. Central mechanisms of odour object perception. v. 11, n. SepTemBeR, 2010.

GROSS, C. T.; CANTERAS, N. S. The many paths to fear. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 13, n. 9, p. 651–8, set. 2012.

GUIMARÃES, F. S. et al. Antianxiety effect of cannabidiol in the elevated plus-maze. **Psychopharmacology**, v. 100, n. 4, p. 558–9, 1990.

GUINTO, G.; GUINTO-NISHIMURA, Y. Ancient Trepanations. **World Neurosurgery**, v. 81, n. 2, p. 298–299, fev. 2014.

H. GASTAUT, J. L. GASTAUT, G. E. G. E S.; SANCHEZ, AND G. R. F. Relative Frequency of Different Types of Epilepsy: A Study Employing the Classification of the International League Against Epilepsy. p. 457–461, 1975.

HACQUEMAND, R. et al. Comparison between low doses of TMT and cat odor exposure in anxiety- and fear-related behaviors in mice. **Behavioural brain research**, v. 238, p. 227–31, 1 fev. 2013.

HACQUEMAND, R.; JACQUOT, L.; BRAND, G. Comparative Fear-Related Behaviors to Predator Odors (TMT and Natural Fox Feces) before and after Intranasal ZnSO(4) Treatment in Mice. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 4, p. 188, jan. 2010.

HANNESSON, D. K. et al. Anterior perirhinal cortex kindling produces long-lasting effects on anxiety and object recognition memory. **The European journal of neuroscience**, v. 21, n. 4, p. 1081–90, fev. 2005.

HANNESSON, D. K. et al. Amygdaloid kindling is anxiogenic but fails to alter object recognition or spatial working memory in rats. **Epilepsy & behavior : E&B**, v. 13, n. 1, p. 52–61, jul. 2008.

HANNESSON, D. K.; MOHAPEL, P.; CORCORAN, M. E. Dorsal hippocampal kindling selectively impairs spatial learning/short-term memory. **Hippocampus**, v. 11, n. 3, p. 275–86, jan. 2001.

HEBB, A. L. . et al. Exposure of mice to a predator odor increases acoustic startle but does not disrupt the rewarding properties of VTA intracranial self-stimulation. **Brain Research**, v. 982, n. 2, p. 195–210, ago. 2003.

HESS, W. R.; BRÜGGER, M. Das subkortikale Zentrum der affektiven Abwehrreaktion. [The subcortical center for affective defense reactions.]. **Helvetica Physiologica et Pharmacologica Acta**, v. 1, 1, p. 33–52, 1943.

HILL, A. J. et al. Phytocannabinoids as novel therapeutic agents in CNS disorders.

---

**Pharmacology & therapeutics**, v. 133, n. 1, p. 79–97, jan. 2012.

HILL, T. D. M. et al. Cannabidiol-rich cannabis extracts are anticonvulsant in mouse and rat via a CB1 receptor-independent mechanism. **British journal of pharmacology**, v. 170, n. 3, p. 679–92, out. 2013.

HOLMES, M. M.; GALEA, L. A. M. Defensive behavior and hippocampal cell proliferation: differential modulation by naltrexone during stress. **Behavioral neuroscience**, v. 116, n. 1, p. 160–8, fev. 2002.

HORII, Y. et al. Exposure to TMT odor affects adrenal sympathetic nerve activity and behavioral consequences in rats. **Behavioural brain research**, v. 214, n. 2, p. 317–22, 25 dez. 2010.

HOSSEINZADEH, M. et al. Cannabidiol Post-Treatment Alleviates Rat Epileptic-Related Behaviors and Activates Hippocampal Cell Autophagy Pathway Along with Antioxidant Defense in Chronic Phase of Pilocarpine-Induced Seizure. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 58, n. 4, p. 432–440, 6 abr. 2016.

HUGHES, J. R.; ANDY, O. J. The human amygdala. I. Electrophysiological responses to odorants. **Electroencephalography and Clinical Neurophysiology**, v. 46, n. 4, p. 428–443, abr. 1979.

HUGHLINGS-JACKSON, J. ON A PARTICULAR VARIETY OF EPILEPSY (“INTELLECTUAL AURA”), ONE CASE WITH SYMPTOMS OF ORGANIC BRAIN DISEASE. **Brain**, v. 11, n. 2, p. 179–207, 1888.

HUMMEL T, HENKEL S, NEGOIAS S, GALVÁN JRB, BOGDANOV V, H.; P, HALLMEYER-ELGNER S, GERBER J, REUNER U, H. A. Olfactory bulb volume in patients with temporal lobe epilepsy. **Epilepsia**, v. 54, n. 2, p. 1004–1008, 2013.

HUSSAIN, S. A. et al. Perceived efficacy of cannabidiol-enriched cannabis extracts for treatment of pediatric epilepsy: A potential role for infantile spasms and Lennox-Gastaut syndrome. **Epilepsy & behavior : E&B**, v. 47, p. 138–41, jun. 2015.

IBEAS BIH, C. et al. Molecular Targets of Cannabidiol in Neurological Disorders. **Neurotherapeutics**, v. 12, n. 4, p. 699–730, 12 out. 2015.

IKEGAYA, Y.; SAITO, H.; ABE, K. High-frequency stimulation of the basolateral amygdala facilitates the induction of long-term potentiation in the dentate gyrus in vivo. **Neuroscience research**, v. 22, n. 2, p. 203–7, maio 1995.

ILIK, F.; PAZARLI, A. C. Reflex Epilepsy Triggered by Smell. **Clinical EEG and neuroscience**, v. 46, n. 3, p. 263–5, jul. 2015.

JANITZKY, K. et al. TMT predator odor activated neural circuit in C57BL / 6J mice

indicates TMT-stress as a suitable model for uncontrollable intense stress. **Brain research**, v. 1599, p. 1–8, 2015a.

JANITZKY, K. et al. TMT predator odor activated neural circuit in C57BL/6J mice indicates TMT-stress as a suitable model for uncontrollable intense stress. **Brain Research**, v. 1599, p. 1–8, mar. 2015b.

JANITZKY, K. et al. TMT predator odor activated neural circuit in C57BL/6J mice indicates TMT-stress as a suitable model for uncontrollable intense stress. **Brain Research**, v. 1599, p. 1–8, mar. 2015c.

JASEJA, H. Scientific basis behind traditional practice of application of “shoe-smell” in controlling epileptic seizures in the eastern countries. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, v. 110, n. 6, p. 535–538, jun. 2008.

JASEJA, H. Application of “shoe-smell” in controlling epileptic attacks: its origin. **Medical hypotheses**, v. 74, n. 1, p. 210, jan. 2010.

JESSBERGER, S. et al. Epigenetic modulation of seizure-induced neurogenesis and cognitive decline. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 27, n. 22, p. 5967–75, 30 maio 2007.

JIANG, Y. et al. Molecular profiling of activated olfactory neurons identifies odorant receptors for odors in vivo. **Nature neuroscience**, v. 18, n. 10, 2015.

JOBE, P. C.; BROWNING, R. A. The serotonergic and noradrenergic effects of antidepressant drugs are anticonvulsant, not proconvulsant. **Epilepsy & behavior : E&B**, v. 7, n. 4, p. 602–19, dez. 2005.

JOBE, P. C.; DAILEY, J. W. Genetically Epilepsy-Prone Rats ( GEPRs ) in Drug Research. v. 6, n. 3, p. 241–260, 2000.

JOËLS, M.; BARAM, T. Z. The neuro-symphony of stress. v. 10, n. juNE, p. 459–466, 2009.

JONES, N. A. et al. Cannabidiol displays antiepileptiform and antiseizure properties in vitro and in vivo. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 332, n. 2, p. 569–77, fev. 2010.

JONES, N. A. et al. Cannabidiol exerts anti-convulsant effects in animal models of temporal lobe and partial seizures. **Seizure**, v. 21, n. 5, p. 344–52, jun. 2012.

JUNG, K.-H. et al. Continuous cytosine-b-D-arabinofuranoside infusion reduces ectopic granule cells in adult rat hippocampus with attenuation of spontaneous recurrent seizures following pilocarpine-induced status epilepticus. **The European journal of neuroscience**, v. 19, n. 12, p. 3219–26, jun. 2004.

JUNG, K.-H. et al. Cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib, inhibits the altered hippocampal neurogenesis with attenuation of spontaneous recurrent seizures following pilocarpine-induced status epilepticus. **Neurobiology of Disease**, v. 23, n. 2, p. 237–246, ago. 2006.

KANDRATAVICIUS, L. et al. Animal models of epilepsy: use and limitations. p. 1693–1705, 2014.

KANNER, A. M. Can neurobiological pathogenic mechanisms of depression facilitate the development of seizure disorders? **Lancet neurology**, v. 11, n. 12, p. 1093–102, dez. 2012.

KLEIN, B. D. et al. Evaluation of Cannabidiol in Animal Seizure Models by the Epilepsy Therapy Screening Program (ETSP). **Neurochemical research**, v. 42, n. 7, p. 1939–1948, jul. 2017.

KOBAYAKAWA, K. et al. Innate versus learned odour processing in the mouse olfactory bulb. **Nature**, v. 450, n. 7169, p. 503–8, 22 nov. 2007.

KROOK-MAGNUSON, E. et al. On-demand optogenetic control of spontaneous seizures in temporal lobe epilepsy. **Nature communications**, v. 4, p. 1376, 2013.

KUMAR, G. et al. Early life stress enhancement of limbic epileptogenesis in adult rats: mechanistic insights. **PLoS one**, v. 6, n. 9, p. e24033, 2011.

KURAMOTO, S. et al. Injection of muscimol, a GABA<sub>A</sub> agonist into the anterior thalamic nucleus, suppresses hippocampal neurogenesis in amygdala-kindled rats. **Neurological research**, v. 31, n. 4, p. 407–13, maio 2009.

LACRUZ, M. E. et al. Single pulse electrical stimulation of the hippocampus is sufficient to impair human episodic memory. **Neuroscience**, v. 170, n. 2, p. 623–32, 13 out. 2010.

LASKA, M. et al. Detecting danger—or just another odorant? Olfactory sensitivity for the fox odor component 2,4,5-trimethylthiazoline in four species of mammals. **Physiology & Behavior**, v. 84, n. 2, p. 211–215, fev. 2005a.

LASKA, M. et al. Detecting danger--or just another odorant? Olfactory sensitivity for the fox odor component 2,4,5-trimethylthiazoline in four species of mammals. **Physiology & behavior**, v. 84, n. 2, p. 211–5, 15 fev. 2005b.

LEDOUX, J. E. Emotion circuits in the brain. **Annual review of neuroscience**, v. 23, p. 155–84, 2000.

LEITE, J. P.; GARCIA-CAIRASCO, N.; CAVALHEIRO, E. A. New insights from the use of pilocarpine and kainate models. **Epilepsy research**, v. 50, n. 1–2, p. 93–103, jun. 2002.

LEO, A.; RUSSO, E.; ELIA, M. Cannabidiol and epilepsy: Rationale and therapeutic

---

potential. **Pharmacological Research**, v. 107, p. 85–92, maio 2016.

LI, X. et al. Electrical stimulation of the olfactory mucosa : An alternative treatment for the temporal lobe epilepsy ? v. 74, p. 24–26, 2010.

LI, Z.; RICHTER-LEVIN, G. Stimulus intensity-dependent modulations of hippocampal long-term potentiation by basolateral amygdala priming. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 6, 2012.

LIN, D. et al. Functional identification of an aggression locus in the mouse hypothalamus. **Nature**, v. 470, n. 7333, p. 221–6, 10 fev. 2011.

LITVIN, Y.; BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. Vocalization as a social signal in defensive behavior. In: [s.l: s.n.]. p. 151–157.

LONGRIGG, J. Epilepsy in ancient Greek medicine — the vital step. **Seizure**, p. 12–21, 2000.

LÖSCHER, W. Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease-modifying drugs . A comparison of the pharmacology of kindling and post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy. v. 50, p. 105–123, 2002.

LÖSCHER, W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. **Seizure: European Journal of Epilepsy**, v. 20, n. 5, p. 359–368, 2011.

LÖSCHER, W. et al. New avenues for anti-epileptic drug discovery and development. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 12, n. 10, p. 757–76, out. 2013.

LÖSCHER, W. Fit for purpose application of currently existing animal models in the discovery of novel epilepsy therapies. **Epilepsy research**, v. 126, p. 157–84, out. 2016.

LÖSCHER, W. Animal Models of Seizures and Epilepsy: Past, Present, and Future Role for the Discovery of Antiseizure Drugs. **Neurochemical research**, v. 42, n. 7, p. 1873–1888, jul. 2017.

LOSCHER, W.; BRANDT, C. Prevention or Modification of Epileptogenesis after Brain Insults: Experimental Approaches and Translational Research. **Pharmacological Reviews**, v. 62, n. 4, p. 668–700, dez. 2010.

LÖSCHER, W.; BRANDT, C. Prevention or modification of epileptogenesis after brain insults: experimental approaches and translational research. **Pharmacological reviews**, v. 62, n. 4, p. 668–700, dez. 2010.

LÖSCHER, W.; EBERT, U. The role of the piriform cortex in kindling. **Progress in neurobiology**, v. 50, n. 5–6, p. 427–81, dez. 1996.

LOTHMAN, E. W. et al. Kindling with rapidly recurring hippocampal seizures. **Brain**

**research**, v. 360, n. 1–2, p. 83–91, 23 dez. 1985.

LUNA, V. M.; PETTIT, D. L. B r i e f c o m m u n i c a t i o n s inhibition in the primary olfactory cortex. p. 533–535, 2010.

LUNARDI, M. S. et al. Olfactory stimulation induces delayed responses in epilepsy. **Epilepsy & behavior : E&B**, v. 61, p. 90–96, 23 jun. 2016.

MARESCAUX, C. et al. Kindling of audiogenic seizures in Wistar rats: an EEG study. **Experimental neurology**, v. 97, n. 1, p. 160–8, jul. 1987.

MARTINEZ, R. C. et al. Amygdalar roles during exposure to a live predator and to a predator-associated context. **Neuroscience**, v. 172, p. 314–28, 13 jan. 2011.

MCCORRY, L. K. Physiology of the Autonomic Nervous System. v. 71, n. 4, 2007.

MCGREGOR, I. S. et al. Not all “predator odours” are equal: cat odour but not 2,4,5 trimethylthiazoline (TMT; fox odour) elicits specific defensive behaviours in rats. **Behavioural brain research**, v. 129, n. 1–2, p. 1–16, 1 fev. 2002.

MCNAMARA, J. O. et al. The kindling model of epilepsy: a review. **Progress in neurobiology**, v. 15, n. 2, p. 139–59, jan. 1980.

MCNAMARA, J. O. Cellular and molecular basis of epilepsy. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 14, n. 6, p. 3413–25, jun. 1994.

MCNAMARA, J. O. Emerging insights into the genesis of epilepsy. **Nature**, v. 399, n. 6738 Suppl, p. A15-22, 24 jun. 1999.

MCNAMARA, R. K. et al. Limbic seizures, but not kindling, reversibly impair place learning in the Morris water maze. **Behavioural brain research**, v. 50, n. 1–2, p. 167–75, 28 set. 1992.

MECHOULAM, R. et al. Cannabidiol--recent advances. **Chemistry & biodiversity**, v. 4, n. 8, p. 1678–92, ago. 2007.

MECHOULAM, R.; SHVO, Y. Hashish—I. **Tetrahedron**, v. 19, n. 12, p. 2073–2078, jan. 1963.

MEDEIROS, D. D. C.; MORAES, M. F. D. Focus on desynchronization rather than excitability: A new strategy for intraencephalic electrical stimulation. **Epilepsy & behavior : E&B**, 25 jan. 2014.

MEDEIROS, D. DE C. et al. Epilepsy & Behavior Anatomically dependent anticonvulsant properties of temporally-coded electrical stimulation. v. 23, p. 294–297, 2012.

MEDICINA, E. P. DE; BOTUCATU, R. LIMBIC SEIZURES PRODUCED BY PILOCARPINE IN RATS : BEHAVIOURAL , ELECTROENCEPHALOGRAPHIC AND

NEUROPATHOLOGICAL STUDY Behavioural , electroencephalographic and neuropathological responses to increasing doses of pilocarpine ( 100--400 mg / kg ) administered . v. 9, p. 315–335, 1983.

MERCERÓN-MARTÍNEZ, D. et al. Amygdala electrical stimulation inducing spatial memory recovery produces an increase of hippocampal bdnf and arc gene expression. **Brain research bulletin**, v. 124, p. 254–61, 2016.

MING, G.; SONG, H. Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain: Significant Answers and Significant Questions. **Neuron**, v. 70, n. 4, p. 687–702, maio 2011.

MOBERLY, A. H. et al. Olfactory inputs modulate respiration-related rhythmic activity in the prefrontal cortex and freezing behavior. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 1528, 18 abr. 2018.

MORALES, J. C. et al. A new rapid kindling variant for induction of cortical epileptogenesis in freely moving rats. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 8, p. 200, 2014.

MORRIS, R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. **Journal of neuroscience methods**, v. 11, n. 1, p. 47–60, maio 1984.

MORRIS, R. G. M. et al. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. **Nature**, v. 297, n. 5868, p. 681–683, 24 jun. 1982.

MORROW, B. A. et al. The predator odor , TMT , displays a unique , stress-like pattern of dopaminergic and endocrinological activation in the rat. **Brain Research**, v. 864, n. 1, p. 146–151, 2000a.

MORROW, B. A. et al. The predator odor, TMT, displays a unique, stress-like pattern of dopaminergic and endocrinological activation in the rat. **Brain Research**, v. 864, n. 1, p. 146–151, maio 2000b.

MORROW, B. A.; ELSWORTH, J. D.; ROTH, R. H. Fear-like biochemical and behavioral responses in rats to the predator odor, TMT, are dependent on the exposure environment. **Synapse (New York, N.Y.)**, v. 46, n. 1, p. 11–8, out. 2002.

MORROW, B. A.; ROTH, R. H.; ELSWORTH, J. D. TMT, a predator odor, elevates mesoprefrontal dopamine metabolic activity and disrupts short-term working memory in the rat. **Brain research bulletin**, v. 52, n. 6, p. 519–23, ago. 2000.

MORTATI, K.; DWORETZKY, B.; DEVINSKY, O. Marijuana: an effective antiepileptic treatment in partial epilepsy? A case report and review of the literature. **Reviews in neurological diseases**, v. 4, n. 2, p. 103–6, 2007.

NAKAGAWA, E. et al. Enhancement of progenitor cell division in the dentate gyrus triggered by initial limbic seizures in rat models of epilepsy. **Epilepsia**, v. 41, n. 1, p. 10–8, jan.



2000.

NARITOKU, D. K. et al. Repetition of audiogenic seizures in genetically epilepsy-prone rats induces cortical epileptiform activity and additional seizure behaviors. **Experimental neurology**, v. 115, n. 3, p. 317–24, mar. 1992.

NASCA, C. et al. Exposure to predator odor and resulting anxiety enhances the expression of the  $\alpha 2 \delta$  subunit of voltage-sensitive calcium channels in the amygdala. **Journal of Neurochemistry**, v. 125, n. 5, p. 649–656, jun. 2013.

NEVALAINEN, O. et al. Epilepsy-related clinical characteristics and mortality: a systematic review and meta-analysis. **Neurology**, v. 83, n. 21, p. 1968–77, 18 nov. 2014.

NGUYEN, M. Q.; RYBA, N. J. P. A smell that causes seizure. **PloS one**, v. 7, n. 7, p. e41899, jan. 2012a.

NGUYEN, M. Q.; RYBA, N. J. P. A smell that causes seizure. **PloS one**, v. 7, n. 7, p. e41899, jan. 2012b.

NIEMINEN SA, SIRVIÖ J, TEITTINEN K, PITKÄNEN A, AIRAKSINEN MM, R. P. Amygdala Kindling Increased Fear-Response , but Did Not Impair Spatial Memory in Rats. **Physiology & behavior**, v. 51, p. 845–849, 1992.

NIKAIDO, Y.; NAKASHIMA, T. Effects of environmental novelty on fear-related behavior and stress responses of rats to emotionally relevant odors. **Behavioural brain research**, v. 199, n. 2, p. 241–6, 16 maio 2009.

NOBELS JL, AVOLI M, ROGAWSKI MA, OLSEN RW, D.-E. A. **Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies**. 4th. ed. [s.l: s.n.].

O'SHAUGHNESSY W. B. On the Preparations of the Indian Hemp, or Gunjah: Cannabis Indica Their Effects on the Animal System in Health, and their Utility in the Treatment of Tetanus and other Convulsive Diseases. **Provincial Medical Journal and Retrospect of the Medical Sciences**, v. 5, n. 123, p. 363–369, 1843.

OWCZAREK, K.; JĘDRZEJCZAK, J. Christianity and epilepsy. **Neurologia i neurochirurgia polska**, v. 47, n. 3, p. 271–7, [s.d.].

PARENT, J. M. et al. Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 17, n. 10, p. 3727–38, 15 maio 1997.

PARENT, J. M. et al. Increased dentate granule cell neurogenesis following amygdala kindling in the adult rat. **Neuroscience letters**, v. 247, n. 1, p. 9–12, 8 maio 1998.

PARENT, J. M.; KRON, M. M. **Neurogenesis and Epilepsy**. [s.l: s.n.].

PARENT, J. M.; LOWENSTEIN, D. H. Seizure-induced neurogenesis: are more new neurons good for an adult brain? **Progress in brain research**, v. 135, p. 121–31, jan. 2002.

PARENT, J. M.; MURPHY, G. G. Mechanisms and functional significance of aberrant seizure-induced hippocampal neurogenesis. **Epilepsia**, v. 49, p. 19–25, 2008.

PARK, J.-H. et al. Repeated brief epileptic seizures by pentylenetetrazole cause neurodegeneration and promote neurogenesis in discrete brain regions of freely moving adult rats. **Neuroscience**, v. 140, n. 2, p. 673–684, 2006.

PAXINOS, G; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates, Fourth Edition. San Diego: Paxinos G, Watson C (Eds). 1997.

PEKCEC, A. et al. Modulation of neurogenesis by targeted hippocampal irradiation fails to affect kindling progression. **Hippocampus**, v. 21, n. 8, p. 866–76, ago. 2011.

PELZ, M. C. et al. Assessing the role of serotonergic receptors in cannabidiol's anticonvulsant efficacy. **Epilepsy & Behavior**, v. 73, p. 111–118, ago. 2017.

PENTKOWSKI, N. S. et al. Effects of lesions to the dorsal and ventral hippocampus on defensive behaviors in rats. **The European journal of neuroscience**, v. 23, n. 8, p. 2185–96, abr. 2006.

PEREZ, M. et al. Neuronal preservation and reactive gliosis attenuation following neonatal sciatic nerve axotomy by a fluorinated cannabidiol derivative. **Neuropharmacology**, v. 140, p. 201–208, 2018.

PHILLIP C. JOBE, PRAVIN K. MISHRA, RONALD A. BROWNING, C. W.; LEAH E. ADAMS-CURTIS, K. H. K. A. J. W. D. Noradrenergic Abnormalities in the Genetically Rat. v. 35, n. 94, p. 493–504, 1994.

PHILLIP C. JOBE. Behavior Common pathogenic mechanisms between depression and epilepsy : an experimental perspective. v. 4, p. 14–24, 2003.

PICOT, M.-C. et al. The prevalence of epilepsy and pharmaco-resistant epilepsy in adults: a population-based study in a Western European country. **Epilepsia**, v. 49, n. 7, p. 1230–8, jul. 2008.

PINEL, J. P.; ROVNER, L. I. Experimental epileptogenesis: kindling-induced epilepsy in rats. **Experimental neurology**, v. 58, n. 2, p. 190–202, 15 jan. 1978a.

PINEL, J. P.; ROVNER, L. I. Experimental epileptogenesis: kindling-induced epilepsy in rats. **Experimental neurology**, v. 58, n. 2, p. 190–202, 15 jan. 1978b.

PITKÄNEN, A. Therapeutic approaches to epileptogenesis--hope on the horizon. **Epilepsia**, v. 51 Suppl 3, p. 2–17, jul. 2010.

PITKÄNEN, A. et al. Epileptogenesis. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**,

---

v. 5, n. 10, 18 set. 2015.

PITKÄNEN, A.; LUKASIUK, K. Molecular and cellular basis of epileptogenesis in symptomatic epilepsy. **Epilepsy & behavior : E&B**, v. 14 Suppl 1, p. 16–25, jan. 2009.

PORTER, B. E.; JACOBSON, C. Report of a parent survey of cannabidiol-enriched cannabis use in pediatric treatment-resistant epilepsy. **Epilepsy & behavior : E&B**, v. 29, n. 3, p. 574–7, dez. 2013.

RACINE, R. J. Modification of seizure activity by electrical stimulation. I. After-discharge threshold. **Electroencephalography and clinical neurophysiology**, v. 32, n. 3, p. 269–79, mar. 1972a.

RACINE, R. J. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. **Electroencephalography and clinical neurophysiology**, v. 32, n. 3, p. 281–94, mar. 1972b.

RAEDT, R. et al. Radiation of the rat brain suppresses seizure-induced neurogenesis and transiently enhances excitability during kindling acquisition. **Epilepsia**, v. 48, n. 10, p. 1952–63, out. 2007.

RALE, A. et al. CART neuropeptide modulates the extended amygdalar CeA-vBNST circuit to gate expression of innate fear. **Psychoneuroendocrinology**, v. 85, p. 69–77, nov. 2017.

RAMPIN, O. et al. Where is the TMT? GC-MS analyses of fox feces and behavioral responses of rats to fear-inducing odors. **Chemical senses**, v. 43, n. 2, p. 105–115, 2018.

REDMOND, A. J. et al. Selective activation of the A10, but not A9, dopamine neurons in the rat by the predator odor, 2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline. **Neuroscience letters**, v. 328, n. 3, p. 209–12, 16 ago. 2002.

REKTOR, I. et al. Epilepsy, behavior, and art (Epilepsy, Brain, and Mind, part 1). **Epilepsy & Behavior**, v. 28, n. 2, p. 261–282, ago. 2013.

RESTREPO, D.; HELLIER, J. L.; SALCEDO, E. Complex metabolically demanding sensory processing in the olfactory system: Implications for epilepsy. **Epilepsy and Behavior**, p. 6–11, 7 out. 2013.

REYNOLDS, J. R. ON THE THERAPEUTICAL USES AND TOXIC EFFECTS OF CANNABIS INDICA. **The Lancet**, v. 135, n. 3473, p. 637–638, mar. 1890.

RIBEIRO-BARBOSA, E. R. et al. An alternative experimental procedure for studying predator-related defensive responses. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 8, p. 1255–1263, jan. 2005.

RODRIGUES, M. C. A. et al. Correlation between shaking behaviors and seizure

severity in five animal models of convulsive seizures. **Epilepsy & behavior : E&B**, v. 6, n. 3, p. 328–36, maio 2005.

ROMCY-PEREIRA, R. N.; GARCIA-CAIRASCO, N. Hippocampal cell proliferation and epileptogenesis after audiogenic kindling are not accompanied by mossy fiber sprouting or Fluoro-Jade staining. **Neuroscience**, v. 119, n. 2, p. 533–46, jan. 2003.

ROOT, C. M. et al. The participation of cortical amygdala in innate, odour-driven behaviour. **Nature**, v. 515, n. 7526, p. 269–73, 13 nov. 2014.

ROSEN, J. B. The neurobiology of conditioned and unconditioned fear: a neurobehavioral system analysis of the amygdala. **Behavioral and cognitive neuroscience reviews**, v. 3, n. 1, p. 23–41, mar. 2004.

ROSEN, J. B. et al. Analysis of behavioral constraints and the neuroanatomy of fear to the predator odor trimethylthiazoline: a model for animal phobias. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 32, n. 7, p. 1267–76, set. 2008.

ROSEN, J. B.; ASOK, A.; CHAKRABORTY, T. The smell of fear: innate threat of 2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline, a single molecule component of a predator odor. **Frontiers in neuroscience**, v. 9, p. 292, jan. 2015.

ROSEN, J. B.; WEST, E. A.; DONLEY, M. P. Not all rat strains are equal: differential unconditioned fear responses to the synthetic fox odor 2,4,5-trimethylthiazoline in three outbred rat strains. **Behavioral neuroscience**, v. 120, n. 2, p. 290–7, abr. 2006.

ROSENBERG, E. C. et al. Cannabinoids and Epilepsy. **Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics**, v. 12, n. 4, p. 747–68, out. 2015.

ROSSETTI, F. et al. EEG wavelet analyses of the striatum-substantia nigra pars reticulata-superior colliculus circuitry: audiogenic seizures and anticonvulsant drug administration in Wistar audiogenic rats (War strain). **Epilepsy research**, v. 72, n. 2–3, p. 192–208, dez. 2006.

RYVLIN, P.; RHEIMS, S. Epilepsy surgery: eligibility criteria and presurgical evaluation. **Dialogues in clinical neuroscience**, v. 10, n. 1, p. 91–103, jan. 2008.

SAITO, H. et al. Immobility responses are induced by photoactivation of single glomerular species responsive to fox odour TMT. **Nature communications**, v. 8, p. 16011, 2017.

SANTOS-MAGALHÃES, N. S. et al. Colloidal carriers for benzathine penicillin G: nanoemulsions and nanocapsules. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 208, n. 1–2, p. 71–80, nov. 2000.

---

SANTOS, J. M. et al. Pharmacological dissociation of moderate and high contextual fear as assessed by freezing behavior and fear-potentiated startle. **European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology**, v. 15, n. 2, p. 239–46, mar. 2005.

SARAIVA, L. R. et al. Combinatorial effects of odorants on mouse behavior. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 23, p. E3300-6, 7 jun. 2016.

SAYIN, U. et al. Spontaneous seizures and loss of axo-axonic and axo-somatic inhibition induced by repeated brief seizures in kindled rats. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 23, n. 7, p. 2759–68, 1 abr. 2003.

SCHARFMAN, H.; GOODMAN, J.; MCCLOSKEY, D. Ectopic Granule Cells of the Rat Dentate Gyrus. **Developmental Neuroscience**, v. 29, n. 1–2, p. 14–27, 2007.

SCOTT, B. W. et al. Kindling-induced neurogenesis in the dentate gyrus of the rat. **Neuroscience letters**, v. 248, n. 2, p. 73–6, 29 maio 1998.

SHERAFAT, M. A. et al. Kindling-induced learning deficiency and possible cellular and molecular involved mechanisms. **Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology**, v. 34, n. 6, p. 883–90, jun. 2013.

SHETTY, A. K. Hippocampal injury-induced cognitive and mood dysfunction, altered neurogenesis, and epilepsy: can early neural stem cell grafting intervention provide protection? **Epilepsy & behavior : E&B**, v. 38, p. 117–24, set. 2014.

SHIRASAKI, Y. et al. Validation studies on blood collection from the jugular vein of conscious mice. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS**, v. 51, n. 3, p. 345–51, maio 2012.

SHIRAZI-ZAND, Z. et al. The role of potassium BK channels in anticonvulsant effect of cannabidiol in pentylenetetrazole and maximal electroshock models of seizure in mice. **Epilepsy & Behavior**, v. 28, n. 1, p. 1–7, jul. 2013.

SHORVON, S. The evolution of epilepsy theory and practice at the National Hospital for the Relief and Cure of Epilepsy, Queen Square between 1860 and 1910. **Epilepsy & behavior : E&B**, v. 31, p. 228–42, fev. 2014.

SILVA-FILHO, A. R.; PIRES, M. L.; SHIOTSUKI, N. Anticonvulsant and convulsant effects of organic solvents. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 41, n. 1, p. 79–82, jan. 1992.

SILVA, N. R. et al. Antinociceptive effects of HUF-101, a fluorinated cannabidiol

derivative. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 79, n. Pt B, p. 369–377, 2017.

SIMONATO, M. et al. The challenge and promise of anti-epileptic therapy development in animal models. **The Lancet. Neurology**, v. 13, n. 9, p. 949–60, set. 2014.

SKALLI, S.; SOULAYMANI BENCHEIKH, R. Epileptic seizure induced by fennel essential oil. **Epileptic disorders : international epilepsy journal with videotape**, v. 13, n. 3, p. 345–7, set. 2011.

SMITH, P. D. et al. Seizures, not hippocampal neuronal death, provoke neurogenesis in a mouse rapid electrical amygdala kindling model of seizures. **Neuroscience**, v. 136, n. 2, p. 405–15, 2005.

SMITH, P. D. et al. Functional dentate gyrus neurogenesis in a rapid kindling seizure model. **The European journal of neuroscience**, v. 24, n. 11, p. 3195–203, dez. 2006.

SPINELLA, M. Herbal Medicines and Epilepsy: The Potential for Benefit and Adverse Effects. **Epilepsy & behavior : E&B**, v. 2, n. 6, p. 524–532, dez. 2001.

STAFSTROM, C. E. Seizures in a 7-month-old child after exposure to the essential plant oil thuja. **Pediatric neurology**, v. 37, n. 6, p. 446–8, dez. 2007.

STAPLES, L. G. et al. Neural activation during cat odor-induced conditioned fear and ‘trial 2’ fear in rats. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 8, p. 1265–1277, jan. 2005.

STAPLES, L. G. et al. Cat odor, but not trimethylthiazoline (fox odor), activates accessory olfactory and defense-related brain regions in rats. **Neuroscience**, v. 151, n. 4, p. 937–47, 19 fev. 2008.

STAPLES, L. G.; MCGREGOR, I. S. Defensive responses of Wistar and Sprague-Dawley rats to cat odour and TMT. v. 172, p. 351–354, 2006.

SUTHANA, N. et al. Memory Enhancement and Deep-Brain Stimulation of the Entorhinal Area. **New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 6, p. 502–510, 9 fev. 2012.

SUTULA, T. et al. Deficits in Radial Arm Maze Performance in Kindled Rats : Evidence for Long-Lasting Memory Dysfunction Induced by Repeated Brief Seizures. n. December, 1995.

SZAFLARSKI, J. P.; MARTINA BEBIN, E. Cannabis, cannabidiol, and epilepsy — From receptors to clinical response. **Epilepsy & Behavior**, v. 41, p. 277–282, dez. 2014.

SZAFLARSKI, M. et al. Social correlates of health status, quality of life, and mood states in patients treated with cannabidiol for epilepsy. **Epilepsy & behavior : E&B**, v. 70, n. Pt B, p. 364–369, 2017.

- 
- T. TAKAHASHI. Seizures induced by odorous stimuli. **Clin EEG**, v. 17, p. 769, 1975.
- TAKAHASHI, L. K. et al. Predator odor-induced conditioned fear involves the basolateral and medial amygdala. **Behavioral Neuroscience**, v. 121, n. 1, p. 100–110, fev. 2007.
- TAKAHASHI, L. K. Olfactory systems and neural circuits that modulate predator odor fear. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 8, n. March, p. 72, jan. 2014.
- TANK, A. W.; LEE WONG, D. Peripheral and central effects of circulating catecholamines. **Comprehensive Physiology**, v. 5, n. 1, p. 1–15, jan. 2015.
- TEJADA, J. et al. The epilepsies: complex challenges needing complex solutions. **Epilepsy & behavior : E&B**, v. 26, n. 3, p. 212–28, mar. 2013a.
- TEJADA, J. et al. The epilepsies: Complex challenges needing complex solutions. **Epilepsy & Behavior**, v. 26, n. 3, p. 212–228, mar. 2013b.
- TEMKIN O. **The Falling Sickness: A History of Epilepsy from the Greeks to the Beginnings of Modern Neurology**. 4th. ed. [s.l: s.n.].
- TERRA, V. C.; GARCIA-CAIRASCO, N. Neuroethological evaluation of audiogenic seizures and audiogenic-like seizures induced by microinjection of bicuculline into the inferior colliculus. II. Effects of nigral clobazam microinjections. **Behavioural brain research**, v. 52, n. 1, p. 19–28, 30 nov. 1992.
- TERRA, V. C.; GARCIA-CAIRASCO, N. NMDA-dependent audiogenic seizures are differentially regulated by inferior colliculus subnuclei. **Behavioural brain research**, v. 62, n. 1, p. 29–39, 30 maio 1994.
- THOMAS, R. H.; CUNNINGHAM, M. O. Cannabis and epilepsy. **Practical neurology**, v. 18, n. 6, p. 465–471, dez. 2018.
- THOMAS, R.; URBAN, J.; PETERSON, D. Acute exposure to predator odor elicits a robust increase in corticosterone and a decrease in activity without altering proliferation in the adult rat hippocampus. **Experimental Neurology**, v. 201, n. 2, p. 308–315, out. 2006.
- TILELLI, C. Q. et al. Different types of status epilepticus lead to different levels of brain damage in rats. **Epilepsy & behavior : E&B**, v. 7, n. 3, p. 401–10, nov. 2005.
- TONNER, P. H.; BEIN, B. Classic electroencephalographic parameters: Median frequency, spectral edge frequency etc. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 20, n. 1, p. 147–159, mar. 2006.
- TOTOLA, L. T. et al. Impaired central respiratory chemoreflex in an experimental genetic model of epilepsy. **The Journal of Physiology**, v. 595, n. 3, p. 983–999, fev. 2017.
- TOTOLA, L. T. et al. Amygdala rapid kindling impairs breathing in response to

chemoreflex activation. **Brain research**, v. 1718, p. 159–168, 1 set. 2019.

TSUTSUI, J. et al. Neuroethological evaluation of audiogenic seizures and audiogenic-like seizures induced by microinjection of bicuculline into the inferior colliculus. I. Effects of midcollicular knife cuts. **Behavioural brain research**, v. 52, n. 1, p. 7–17, 30 nov. 1992.

TURSKI, W. A. et al. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. **Behavioural brain research**, v. 9, n. 3, p. 315–35, set. 1983.

UEMATSU, A. et al. Developmental trajectories of amygdala and hippocampus from infancy to early adulthood in healthy individuals. **PloS one**, v. 7, n. 10, p. e46970, 2012.

ULLAH, F. et al. Relevance of dorsomedial hypothalamus, dorsomedial division of the ventromedial hypothalamus and the dorsal periaqueductal gray matter in the organization of freezing or oriented and non-oriented escape emotional behaviors. **Behavioural brain research**, v. 293, p. 143–52, 15 out. 2015.

ULLAH, F. et al. Connexions between the dorsomedial division of the ventromedial hypothalamus and the dorsal periaqueductal grey matter are critical in the elaboration of hypothalamically mediated panic-like behaviour. **Behavioural brain research**, v. 319, p. 135–147, 2017.

UMEOKA, E. H. L. et al. Functional characterization of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of the Wistar Audiogenic Rat (WAR) strain. **Brain research**, v. 1381, p. 141–7, 24 mar. 2011a.

UMEOKA, E. H. L. et al. Functional characterization of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of the Wistar Audiogenic Rat (WAR) strain. **Brain research**, v. 1381, p. 141–7, 24 mar. 2011b.

VALENTINE, P. A.; FREMIT, S. L.; TESKEY, G. C. Sensory stimulation reduces seizure severity but not afterdischarge duration of partial seizures kindled in the hippocampus at threshold intensities. **Neuroscience Letters**, v. 388, n. 1, p. 33–38, 4 nov. 2005.

VERNET-MAURY, E. **Trimethyl-thiazoline in fox feces: a natural alarming substance for the rat**. Washington, DC: [s.n.].

VERNET-MAURY, E.; POLAK, E. H.; DEMAEL, A. Structure-activity relationship of stress-inducing odorants in the rat. **Journal of chemical ecology**, v. 10, n. 7, p. 1007–18, jul. 1984.

VILELA, L. R. et al. Anticonvulsant effect of cannabidiol in the pentylenetetrazole model: Pharmacological mechanisms, electroencephalographic profile, and brain cytokine levels. **Epilepsy & behavior : E&B**, v. 75, p. 29–35, 2017.



---

VONCK, K. et al. Long-term Amygdalohippocampal Stimulation for Refractory Temporal Lobe Epilepsy. p. 556–565, 2002.

W.R. GOWERS. **Epilepsy and other chronic convulsive diseases**. William Wo ed. London: [s.n.].

WALLACE, K. J.; ROSEN, J. B. Predator odor as an unconditioned fear stimulus in rats: Elicitation of freezing by trimethylthiazoline, a component of fox feces. **Behavioral Neuroscience**, v. 114, n. 5, p. 912–922, 2000.

WIEBE, S. Epidemiology of Temporal Lobe Epilepsy. p. 6–10, 2000.

WIEBE, S. et al. A randomized, controlled trial of surgery for temporal-lobe epilepsy. **The New England journal of medicine**, v. 345, n. 5, p. 311–8, 2 ago. 2001.

WILSON, J. V; REYNOLDS, E. H. Texts and documents. Translation and analysis of a cuneiform text forming part of a Babylonian treatise on epilepsy. **Medical history**, v. 34, n. 2, p. 185–98, abr. 1990.

WOLF, P. Epilepsy and the sensory systems. **Epilepsy Currents**, v. 16, n. 6, p. 369–372, 2016.

WOOD, R. W. et al. Anticonvulsant and antipunishment effects of toluene. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 230, n. 2, p. 407–12, ago. 1984.

WULSIN, A. C. et al. Functional disruption of stress modulatory circuits in a model of temporal lobe epilepsy. **PloS one**, v. 13, n. 5, p. e0197955, 2018.

YACUBIAN, E. M. T. **Epilepsia da antiguidade ao segundo milênio: saindo das sombras**. [s.l: s.n.].

YANG, H. et al. Laterodorsal tegmentum interneuron subtypes oppositely regulate olfactory cue-induced innate fear. **Nature neuroscience**, v. 19, n. 2, p. 283–9, fev. 2016.

YANG, L.-X. et al. Unilateral low-frequency stimulation of central piriform cortex delays seizure development induced by amygdaloid kindling in rats. **Neuroscience**, v. 138, n. 4, p. 1089–96, jan. 2006.

ZANELATI, T. V et al. Antidepressant-like effects of cannabidiol in mice: possible involvement of 5-HT<sub>1A</sub> receptors. **British journal of pharmacology**, v. 159, n. 1, p. 122–8, jan. 2010.

ZANGROSSI, H.; FILE, S. E. Behavioral consequences in animal tests of anxiety and exploration of exposure to cat odor. **Brain Research Bulletin**, v. 29, n. 3–4, p. 381–388, set. 1992.

ZIBROWSKI, E. M.; VANDERWOLF, C. H. Oscillatory fast wave activity in the rat piriform cortex: relations to olfaction and behavior. **Brain research**, v. 766, n. 1–2, p. 39–49,

178

22 ago. 1997.

---

**TABELA COMPLEMENTAR 1.** Dicionário dos itens comportamentais e suas correspondentes siglas, observados no presente estudo (GARCIA-CAIRASCO et al., 1992).

<b>Port</b>	<b>Descrição</b>	<b>Port</b>	<b>Descrição</b>	<b>Port</b>	<b>Descrição</b>
AL	Autolimpeza frontal	DEID	Deitar	OPIS	Opistotonus
ALD	Autolimpeza direita	EL	Elevação	POHL	Piscar os olhos
ALE	Autolimpeza esquerda	ER	Ereto	PIV <sub>1</sub>	Pivotear
ALER	Alerta	ECL	Espasmo clônico	PR	Parar
ALG	Autolimpeza de genitais	FCB	Flexão de cabeça	PU	Pular
AP	Apnéia	GID	Girar à direita	QT	Queda atônica
BC	Bocejar	GIE	Girar à esquerda	RE	Recuar
CBC	Cabeceio	HP <sub>1</sub>	Hiperextensão de patas anteriores	RO	Roer
CCD	Coçar à direita	IMO	Imobilidade pós-ictal	SAC <sub>1</sub>	Sacudir a cabeça
CCE	Coçar à esquerda	LA	Lamber	SAC <sub>2</sub>	Sacudir o corpo
CG	Congelar	LCB	Lavar a cabeça	SAL	Salivação
CHP	Cheirar exploratório	LG	Limpeza de garra	SCR	Defecar
CM	Caminhar	LGD1	Limpar a garra anterior direita	SOB	Sobressalto
COR	Correr	LGD2	Limpar a garra posterior direita	SQ	Esquadrinhar
CVCg	Convulsão clônica generalizada	LGE1	Limpar a garra anterior esquerda	STN	Estendido
CVCp	Convulsão clônica parcial	LGE2	Limpar a garra posterior esquerda	TQ	Taquipnéia
CVC1	Conv. Cl. Sincrônicas pata anterior	LVF	Lavar o focinho		
CVC2	Conv. Cl. Sincrônicas pata posterior	MIO <sub>1</sub>	Mioclonia de patas anteriores		
CVT	Convulsão tônica-clônica	MIOc	Mioclonia de cabeça		
DCE	Dobramento corporal à esquerda	MAST	Mastigar		

## 11 ANEXOS

### 1. ARTIGO PUBLICADO DURANTE DOUTORADO:

## **Intense olfactory stimulation blocks seizures in an experimental model of epilepsy**

**Authors:** Polianna Delfino-Pereira<sup>a#</sup>, Poliana Bertti-Dutra<sup>a,b#</sup>, Eduardo Henrique de Lima Umeoka<sup>a,b</sup>, José Antônio Cortes de Oliveira<sup>b</sup>, Victor Rodrigues Santos<sup>b</sup>, Artur Fernandes<sup>b,c</sup>, Simone Saldanha Marroni<sup>a,b</sup>, Flávio Del Vecchio<sup>b</sup>, Norberto Garcia-Cairasco<sup>a,b\*</sup>

#### **Affiliations:**

<sup>a</sup>Neurosciences and Behavioral Sciences Department, Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo, Brazil  
Hospital das Clínicas  
Campus Universitário S/N  
4° Andar  
Ribeirão Preto – SP, Brazil  
CEP: 14048-900

<sup>b</sup>Physiology Department, Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo, Brazil.  
Prédio Central  
Avenida dos Bandeirantes, 3900  
Monte Alegre  
Ribeirão Preto – SP, Brazil  
CEP: 14049-900

<sup>c</sup>Genetic Department, Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo, Brazil.  
Avenida dos Bandeirantes, 3900  
Monte Alegre  
Ribeirão Preto – SP, Brazil  
CEP: 14049-900

#These authors contributed equally

\*Corresponding author

#### **Norberto Garcia-Cairasco, MSc, PhD**

Physiology Department  
Ribeirão Preto School of Medicine – University of São Paulo  
Avenida dos Bandeirantes, 3900  
Ribeirão Preto – SP, Brazil  
CEP: 14049-900  
<ngcairas@usp.br>

Polianna Delfino-Pereira, MSc <polidelfino@yahoo.com.br>  
Poliana Bertti-Dutra, PhD <pbertti@yahoo.com.br>  
Eduardo Henrique de Lima Umeoka, PhD <eduardoumeoka@gmail.com>  
José Antônio Cortes de Oliveira, BSc <jacolive@usp.br>  
Victor Rodrigues Santos, PhD <victorrsantos@gmail.com>  
Artur Fernandes, PhD <fernandes.artur@gmail.com>  
Simone Saldanha Marroni, PhD <smarroni@hotmail.com>  
Flávio Del Vecchio, BSc <flaviodv@usp.br>

**Abstract (273 words)**

There are reports of patients whose epileptic seizures are prevented by means of olfactory stimulation. Similar findings were described in animal models of epilepsy, such as the electrical kindling of amygdala, where olfactory stimulation with toluene (TOL) suppressed seizures in most rats, even when the stimuli were 20% above the threshold to evoke seizures in already kindled animals. The *Wistar Audiogenic Rat (WAR)* strain is a model of tonic-clonic seizures induced by acute acoustic stimulation, although it also expresses limbic seizures when repeated acoustic stimulation occurs – a process known as audiogenic kindling (AK). The aim of this study was to evaluate whether or not the olfactory stimulation with TOL would interfere on the behavioral expression of brainstem (acute) and limbic (chronic) seizures in the *WAR* strain. For this, animals were exposed to TOL or saline (SAL) and subsequently exposed to acoustic stimulation in two conditions that generated: I) acute audiogenic seizures (only one acoustic stimulus, without previous seizure experience before of the odor test), and II) after audiogenic kindling (20 acoustic stimuli [2 daily] before of the protocol test). We observed a decrease in the seizure severity index of animals exposed only to TOL in both conditions, with TOL presented 20 seconds before the acoustic stimulation in both protocols. These findings were confirmed by behavioral sequential analysis (neuroethology), which clearly indicated an exacerbation of clusters of specific behaviors such as exploration and grooming (self-cleaning), as well as significant decrease in the expression of brainstem and limbic seizures in response to TOL. Thus, these data demonstrate that TOL, a strong olfactory stimulus, has anticonvulsant properties, detected by the decrease of acute and AK seizures in *WARs*.

**Key-words:** *Wistar Audiogenic Rat (WAR)*; Brainstem Seizures; Limbic Seizures; Audiogenic Kindling; Olfactory Stimulation; Neuroethology.

**Abbreviations**

AK: Audiogenic Kindling;  
cm: Centimeters;  
cSI: Categorized Brainstem Severity Index;  
EEG: Electroencephalogram;  
LI: Limbic Index;  
NMDA: N-Methyl-D-Aspartate;  
PRE: Periods before acoustic stimuli, with duration of 01 minute;  
POST: Periods after acoustic stimuli or TCV, also with duration of 01 minute;  
PTZ: Pentylentetrazol;  
s: Seconds  
SAL: Saline;  
SAL-AK 60 group: Animals in which the acoustic stimulation was performed 60 s after SAL exposure;  
SAL-NS group: Saline group;  
SAL-SOUND group: Animals exposed to SAL with subsequent acoustic stimulation;  
SEM: Standard Error of the Mean;  
SOUND: Periods of acoustic stimuli, with maximum duration of 1 minute or until the TCV;  
TCV: Tonic-Clonic Convulsion;  
TOL: Toluene;  
TOL-NS group: Toluene group;  
TOL-AK 20: Animals in which the acoustic stimulation was performed 20 s after TOL exposure;  
TOL-AK 60: Animals in which the acoustic stimulation was performed 60 s after TOL exposure;  
TOL-SOUND group: Animals exposed to TOL with subsequent acoustic stimulation;  
TLE: Temporal Lobe Epilepsy;

---

TMT: 2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline;  
WAR: *Wistar Audiogenic Rat*;  
WR: Wild running;  
 $\chi^2$ : Chi-Square Test.

For a complete list of acronyms related to behavioral items described in the flowcharts, see Supplementary Table 1.

## INTRODUCTION

Epilepsy is a chronic neurological disease characterized by the presence of any of the following conditions: (1) at least two unprovoked seizures (or reflex) occurring in >24 hour apart; (2) one unprovoked seizure (or reflex) with probability (at least 60%) of occurrence of further similar seizures in the next 10 years; or (3) in case of diagnosis of an epilepsy syndrome [1]. Seizures are characterized by abnormal excessive activity and/or synchrony of brain neurons [2–5], normally self-limited [5].

According to the World Health Organization (2017), the epilepsy affect approximately 50 million people worldwide [6], representing 1–2% of the world population [3,7,8]; being the Temporal Lobe Epilepsy (TLE) the most common epilepsy syndrome in adults [8–10]. Its occurrence is preceded by an early life insult followed by a latent period, when seizures are not usual, but changes occur in the structure and physiology of the brain that predispose to development of subsequent seizures [3,11].

Pharmacological and surgical treatments represent an important therapeutic option for seizures control by preventing seizure recurrence [8,12], reversing motor and cognitive consequences and enhancing quality of life [8]. Among 20-40% of individuals with TLE are resistant to current pharmacological treatments [6,13–16], and an important part of these are non-eligible for surgery [17–19]. Although much has been made toward the improvement of epilepsy diagnosis and treatment, the proportion of refractory patients (those unresponsive to medical therapy), in addition to magnitude of the negative socioeconomic impact of the epilepsy, evidence the need of a strongly integrated basic and clinical research to develop new therapies [12].

The involvement of olfactory structures with TLE is known for quite some time [20,21]. Some studies have shown that olfactory sensations could indicate the paroxysmic seizures onset in patients with TLE, a symptom described as aura [20–24], and that the peripheral sensory stimulation, such as an olfactory stimulus is able to modulate those seizures: suppressing or inhibiting [9,10,20,25–32] or even inducing them, such as in the reflex epilepsy [29,33–42].

---

In a landmark report, Efron [28] described that the olfactory stimulation was able to prevent the occurrence of seizures in a patient with epilepsy, producing satisfactory results even when the same patient with an aura of strong olfactory odor (jazmin) was conditioned herself to that odor, in such a way that the simple evocation of the olfactory memory was able to prevent her seizures expression [28]. In that scenario, other alternative treatment for seizure control is the use of volatile plant oils, including essential oils [26,30] known as aromatherapy, which has been used to help people who have symptoms suggestive of early seizures (the auras) [26]. The use of certain essential oils can reduce the seizure occurrence or its severity, while others may trigger seizures [9,10]. Moreover, in India and eastern countries it is described since ancient times the exotic seizure control using the “shoe-smell” [9,10] as first aid technique, for example, in an emergency situation in the street, to block seizures.

In the electrical kindling of the amygdala, an animal model of TLE, Ebert & Löscher [37] showed that the exposure to olfactory stimulation for 15 seconds (s) with TOL suppressed seizures in most rats, even with electrical stimulation 20% above of the threshold.. In other experimental model induced by pentylenetetrazol (PTZ, 200 mg/kg, in mice) the pretreatment with TOL by intraperitoneal injection, prevented the occurrence of tonic extension phase and increased the latency to seizure onset depending on the dose. Moreover, TOL inhalation (2 hours before injection of PTZ and 0 to 4 hours after injection) in subconvulsant concentrations prevented the death of the animals after PTZ injection (110 mg/kg). In fact, in mice, PTZ induced convulsions characterized by the following behaviors: straub tail, clonus, tonic hindlimb extension and death [32]. Thus, the effects of acute exposure to TOL can change the susceptibility to seizures depending particularly on the dose, as assessed in other models such as electroshock [43], seizures produced by N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) [25] or those induced by manipulations of different ligand-gated ion channels [44]. In general, lower doses of TOL may protect against seizure events, while higher doses are known to induce convulsive effects [43].

In this context, it is essential to (A) validate the effectiveness of TOL in the therapeutic response (anticonvulsant substance) at least in other animal models of epilepsy, (B) establish parameters for administration, (C) provide insight "tools" for preclinical research to facilitate the development of new therapies, especially for those patients whose seizures are refractory or resistant, and (D) stimulate discussion between the scientific and pharmaceutical community in order to promote the research on the anticonvulsant action mechanisms of this compound. In fact, more than the TOL molecule itself, the use of the olfactory stimulation (odor therapy) to

modulate or even block seizures is an important issue to be understood, as a potential anticonvulsant and antiepileptogenic mechanism.

The induction of seizures with genetic animal models of reflex epilepsy to evaluate new antiepileptic drugs is a strategy widely used [45]. The *Wistar Audiogenic Rat (WAR)* [46,47] is an audiogenic reflex epilepsy animal model, derived from inbreeding of genetically selected rats susceptible to audiogenic seizures. In this strain, the acute high intensity acoustic stimulation induces brainstem-dependent seizures which are behaviorally expressed by running in circles, jumping, atonic falling (wild running, WR) and tonic-clonic convulsion (TCV) with both activation of the inferior and superior colliculus [46,48–52]. Beyond that, with repeated acoustic stimuli (audiogenic kindling - AK), these animals present brainstem seizures, but there is also recruitment of new circuits over time with the presence of limbic seizures [47,51,53–60] behaviorally expressed by facial automatisms, myoclonic spasms of head, fore and hind legs, in addition to rearing and falling. So, the *WAR* strain is an important experimental model with predisposition to two modalities of seizures, representing an important advantage in the study of the neurobiology of epilepsy, particularly to test potential therapies, such as the response to an olfactory stimulus, in this case TOL.

Considering the evidence from the literature about the control or blockade of seizures by olfactory stimulation, in patients and rodents, we thus aimed to evaluate whether or not the olfactory stimulation with TOL would interfere on the behavioral expression of brainstem (acute) and limbic (chronic) seizures in the *WAR* strain.

## **METHODS**

### **Ethics Statement**

All the experimental protocols of this study were carried out according to the recommendations for animal experimentation of the Brazilian Society for Neuroscience and Behavior that are based on international guidelines on the ethical use of animals, from the Society for Neuroscience. The experimental protocols were approved by the Ethics Committee in Animal Research of Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo (Protocol: 172/2010). All efforts were made to minimize the suffering of the animals.

### **Animals**

Male *WARs* (n=70), weighing 250-350 grams, were bred and maintained at the Vivarium of the Physiology Department of the Ribeirão Preto School of Medicine. The animals



were kept in controlled temperature ( $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) on light/dark cycle of 12/12 hours (light on at 7 a.m. and light off at 7 p.m.), with access to food and water *ad libitum* and stored in polyethylene cages with chrome iron cover (40.5 x 33.5 x 21 centimeters, cm) in groups of up to 6 rats per cage. After the experimental procedures (described below), the rats were euthanized.

### **Protocol 1: TOL effect on acute audiogenic seizures**

Male *WARs* (n=35) were exposed for 15 s to 0.9% saline (SAL) or TOL. Another group (n=12) of *WARs* was only exposed to the odorants [groups: SAL (n=6) and TOL (n=6)], to identify and evaluate their behavior. The other 23 animals were exposed to SAL or TOL and 20 s later were submitted to acoustic stimulation (see item: 0 [groups: SAL-SOUND (n=10) and TOL-SOUND (n=13)]).

### **Protocol 2: TOL effect in Audiogenic Kindling (AK)**

Thirty-five male *WARs*, underwent the AK (see item: 2.7). Before the 21<sup>st</sup> acoustic stimulation each rat inhaled 0.9% SAL, for 15 s (group: SAL-AK 60, n=6) or TOL, and the acoustic stimulation was performed 20 s or 60 s after TOL exposure (groups: TOL-AK 20, n=9 and TOL-AK 60, n=9). Therefore, only the 24 animals that displayed limbic seizures during the AK were tested on the 21<sup>st</sup> stimulation.

### **Olfactory Exposure**

For olfactory stimulation we followed the protocol by Ebert & Löscher [31]. Briefly, a cotton piece soaked in TOL (100%, C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>, molecular weight 92.14 - Merck Chemical Industry, Rio de Janeiro – Brazil) or 0.9% SAL - was placed into a glass chamber (volume= 338.4 cm<sup>3</sup>). This chamber remained capped for about 5 minutes, and one of the experimenters opened it and kept the animals with the snout near (less than 5 cm) the soaked cotton for 15 s. Then, each rat was taken to the acoustic stimulation chamber and the transfer between environments lasted 20 seconds to all protocols.

### **TOL**

TOL (Methylbenzene; Toluol; Benzene, methyl-; 108-88-3; Phenylmethane), with the molecular formula C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>3</sub> or C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>, is a volatile aromatic hydrocarbon. It has the following characteristics: it is a colorless liquid, water-insoluble with the typical smell related to paint thinners, irritant, and highly flammable. This chemical compound is mainly used as precursor to other chemicals products in the industry and as solvent [61].

---

## Acoustic Stimuli

In order to acoustically stimulate the animals, they were placed individually into a cylindrical acrylic chamber (30 cm diameter x 32 cm height), located inside an acoustic isolated wood box with a glass window in the front which allows the observation and recording. There was a small speaker (tweeter) on top of the acrylic chamber connected to an amplifier and a computer that was triggered manually in order to play a 5000 to 20000 Hertz sound with an intensity of 116-120 decibels.

All animals were subjected to the acoustic stimulus by 1 minute or until the TCV [51,53,54,60].

## Audiogenic Kindling

This protocol consists in 20 acoustic stimuli applied twice a day during 10 consecutive days [47,53,54], between 08:00–09:00 a.m. and 04:00–05:00 p.m.. The parameters used for stimulation are similar to those described for acute audiogenic seizures (see section 2.6 above).

## Behavioral Analysis

Filming was carried out throughout the period in which the animals were inside the sound stimulation chamber in order to allow the behavioral analysis.

Seizures were classified according to seizure severity indexes: tonic-clonic seizures by the Categorized Brainstem Severity Index (cSI; 1-8) [62,63] and limbic seizures by the Racine scale modified by Pinel & Rovner [64,65] (limbic index, LI; 1-8) (Table 1).

The statistical analysis associated to neuroethology (flowcharts) provides frequency, mean duration of each behavior and statistical interaction between behavioral pairs (dyads) [66]. After the analysis, behaviors were graphically represented using the program Power Point 2010 (Microsoft), in the form of flowcharts. The flowcharts were built for the sum of similar periods, indicating behaviors (frequency and duration), behavioral sequence, and interactions (when they occurred), using a calibration pattern represented in Figure 3A. Rectangle and ellipse colors help to identify groups of behavioral categories (clusters) and were used only for behavioral clusters illustration and aesthetic purposes. Behaviors were mutually exclusive; that is, each moment corresponded to only one behavior. Behaviors and their temporal sequence were recorded according to a Behavioral Glossary (Supplementary Table 1).

For Protocol 1 the neuroethological analysis was performed for two periods: 1- SOUND: during the sound stimulus, and 2- POST: 01 minute after-sound stimulation (the so-called postictal period). The animals of Protocol 1 were not subjected to recording of the PRE

period because after the olfactory exposure the animals were transferred immediately to the stimulation chamber and the sound was played.

For Protocol 2 the duration of the periods analyzed were different according to the groups. For SAL-AK 60 and TOL-AK 60 groups were analyzed the following periods: 1- PRE- 40 s before sound, 2- SOUND- during the sound stimulus, and 3- POST: 01 minute after-sound stimulation (the so-called postictal period). In the TOL-AK 20 group the PRE period was recorded but it lasted 05 s, while the SOUND and POST periods were recorded similarly to the others groups.

### **Statistical Analysis**

Critical seizure behaviors were quantified using the WR and TCV latencies. These analyses were performed as previously described by Garcia-Cairasco et al [57]. Seizure severity was quantified through the already mentioned cSI [62] and LI [64]. The statistical analysis of those behavioral data was done with the Mann Whitney test.

Data from olfactory stimulation with TOL after AK were analyzed comparing the cSI and the LI corresponding to 21<sup>st</sup> stimulus, with each previous stimulus applied during the AK, using Repeated Measures ANOVA with Dunnett's Multiple Comparison Test. In addition to the treatment, the effects of AK development for the different groups were considered during analysis.

All these data were shown as means±standard error of the mean (±SEM). Analysis and figures were performed with GraphPad Prism version 5.0. Significance level was set at  $p<0.05$ .

Neuroethological statistical analysis was applied to detect frequency, duration and strength of statistical association between pairs of behaviors (dyadic interaction) calculated by a chi-square test ( $\chi^2$ ). The interactions were considered significant if  $\chi^2 \geq 3.84$ ,  $\log \chi^2 \geq 0.25$ ;  $p<0.05$  [66].

## **2. RESULTS**

### **Protocol 1: TOL effect on acute audiogenic seizures**

As explained in the Methods (section 2.3), of the 35 animals, some received only the olfactory stimulation with SAL (n=6, SAL-NS group) or with TOL (n=6, TOL-NS group) without the subsequent acoustic stimulation. Additionally, the remaining animals were exposed to a single acoustic stimulus after olfactory stimulation (SAL-SOUND group, n=10 or TOL-SOUND group, n=13).

The SAL and TOL-NS groups presented exploratory and grooming behaviors (Figure 3B and 3C) that will be further explained in detail during the neuroethological analysis.

In SAL-SOUND group, 10 out of 10 animals (100%) presented seizures with the cSI varying from 3 to 7, moreover only 1 out of 10 rats (10%) did not evolve to tonic convulsion (cSI<4). In the TOL-SOUND group, 6 out of 13 rats (46.15%) did not present seizures (cSI=0). In the other 7 rats (53.84%) in which the seizures were observed, 4 (30.76%) of them not presented TCV (cSI<4) and only 3 (23.07%) showed severe seizures (cSI<7). Thus, the cSI of TOL-SOUND group was significantly lower than the SAL-SOUND (Mean of 6.100 and 1.923 to SAL-SOUND and TOL-SOUND groups, respectively, with SEM of  $\pm 0.4333$  in the SAL-SOUND group and  $\pm 0.6146$  in the TOL-SOUND group;  $p < 0.001$ ; Mann Whitney test - Figure 2A), evidencing the complete blockade of seizures in almost half of the rats and also the pronounced suppression in seizure severity detected in the other animals of this first group.

Figure 2B illustrates the latency for the first WR. Note that the average latency for the WR is higher in the TOL-SOUND group, but without statistical significance when compared to SAL-SOUND group. Thus, TOL did not affect the latency for the first WR.

Figure 2C shows that similar to WR the latency for TCV was not statistically different when the SAL-SOUND and TOL-SOUND groups were compared, despite of the tendency for higher latency in the TOL-SOUND group.

Thus, despite of the tendency to increase of latencies for WR and TCV observed in the TOL-SOUND group, the main finding was the significant decrease of cSI ( $p < 0.0004$ ) after TOL exposure, as a result of the blockade of seizures, as well as the seizure attenuation in these animals.

In Figure 3 are the flowcharts representing the behaviors observed in the SAL-NS (3B) and TOL-NS (3C) groups. Since in this case the acoustic stimulus was not present, these animals did not show any seizure behaviors. As expected, in the NO SOUND and POST periods, there were only exploratory behaviors (blue) with some statistical interactions. Interesting data observed in TOL-NS group are grooming behaviors involving the animals face and forelimbs (GRH, LIC, GRF), which were present during the whole 2 periods (NO SOUND and SOUND), while in the SAL-NS group those were detected only during NO SOUND period. Other finding was the pronounced interactions between these items in the NO SOUND period of SAL-NS group, as well as in the TOL-NS group, but in this case only in the POST period.

Also in Figure 3 it is possible to verify the potential anticonvulsant effect of TOL (Figure 3E) during and after the sound (TOL-SOUND group), when compared with control (SAL-SOUND group) (Figure 3D) expressed by increased number of exploratory behaviors (blue)

and absence of limbic seizures (green) in TOL-SOUND group. Furthermore, this group also had more statistical interactions between the exploratory (blue) and WR behaviors (yellow) during SOUND, in relation to SAL-SOUND group.

In the post stimulation period (POST, Figure 3), it is possible to notice in the TOL-SOUND group (Figure 3E) an increase of exploratory and grooming (self-cleaning) behaviors (blue), in addition to presence of *wet dog shake* behavior (WDS), added to significant increase in interactions between them. In the SAL-SOUND group (Figure 3D) there was a pronounced expression of tonic behaviors (red), as well as statistical interactions between some of them, which were not observed in the TOL-SOUND group (Figure 3E).

As a pattern of seizure progress in the WAR strain it is usual to observe tonic seizure (red) after the WR behaviors (yellow), usually followed by a generalized clonic seizure, without expressive statistical interactions between the WR items (yellow). Such pattern occurred in the SAL-SOUND group but not in the TOL-SOUND group. The last experimental group had an increase in number and statistical value of interactions between WR behaviors (yellow) during the SOUND, followed by lack of interactions (in fact a fragmented seizure pattern) between tonic-clonic behaviors (red) during the POST period. Therefore, there was a clear change in behavioral expression when TOL was used before sound, demonstrating the permanence in a repeating cycle of a group of behaviors, that usually only precedes the tonic behaviors (red) and this explains the occurrence of lower values in cSI in these animals.

## **Protocol 2: TOL effect in AK**

The behavioral evolution during AK in the WAR strain is shown in Figures 4 and 5. In accordance with previous observations [51,53–55,57,60], we verified in all groups, that the WAR strain exposed to AK expresses even more severe seizures because of the presence of brainstem seizures and subsequent limbic seizures. Together, these results indicate a pattern of seizures propagation, with the recruitment of limbic structures by the brainstem network.

The cSI of the SAL-AK 60 group (n=6) went from 2-7 in the 20<sup>th</sup> (6 out of 6 animals; 100%) to 2-7 in the 21<sup>st</sup> AK (5 out of 6 animals; 83.33%). So, the cSI of 21<sup>st</sup> AK was not lower than the previous AK indexes ( $p>0.05$ ; Figure 4A). There was no difference between stimuli during the AK development ( $p>0.05$ ; Figure 4A).

In contrast, it was possible to observe in the TOL-AK 20 group (n=9), that the cSI varied from 2-8 at the 20<sup>th</sup> (9 out of 9 animals; 100%) to zero (6 out of 9 animals; 66.66%) or 2-3 (3 out of 9 animals; 33.33%) at the 21<sup>st</sup> AK. This finding shows a significant reduction in the cSI

of the 21<sup>st</sup> AK compared to all previous cSI, except at the 5<sup>th</sup>, 16<sup>th</sup> and 17<sup>th</sup> stimulus (Figure 4B), with significant differences between stimuli (\*\* $p < 0.01$ , Figure 4B).

While in TOL-AK 60 group (n=9) the cSI went from 2-7 at the 20<sup>th</sup> (8 out of 9 animals; 88.88%) stimulus to 2-7 at the 21<sup>st</sup> AK (7 out of 9 animals; 77.77%), without differences between the 21<sup>st</sup> with the previous AK indexes ( $p > 0.05$ ; Figure 4C), but with statistical differences between stimuli ( $*p < 0.05$ ; Figure 4C).

The IL of the SAL-AK 60 group (n=6) went from 2-3 at the 20<sup>th</sup> (3 out of 6 animals; 50%) to 2 at the 21<sup>st</sup> AK (3 out of 6 animals; 50%), without difference from 21<sup>st</sup> with the previous AK ( $p > 0.05$ ; Figure 4A), but with difference between stimuli ( $*p < 0.05$ ; Figure 4A).

TOL-AK 20 group (n=9) presented the IL in the 20<sup>th</sup> equal the 2-3 (6 out of 9 animals; 66.66%), and at the 21<sup>st</sup> AK, zero (7 out of 9 animals; 77.77%), with significant difference between at the 21<sup>st</sup> and the 19<sup>th</sup> stimulus ( $*p < 0.05$ ; Figure 4B), and also between stimuli ( $***p < 0.001$ ; Figure 4B).

Meanwhile, in the TOL-AK 60 group (n=9), the IL went from 2-4 in the 20<sup>th</sup> (6 out of 9 animals; 66.66%) to 2-3 at the 21<sup>st</sup> AK (6 out of 9 animals; 66.66%), without difference from 21<sup>st</sup> with the previous AK ( $p > 0.05$ ; Figure 4C), but with difference between stimuli ( $***p < 0.001$ ; Figure 4C).

In summary (and as previously described), during the periodic induction of audiogenic seizures in AK protocol, there was a gradual reduction in the cSI values with a concomitant increase in the LI, as shown by behavioral analysis. This decrease in the indexes was especially important for the cSI, when the TOL was presented 20 seconds before of the 21<sup>st</sup> stimulus.

In

Figure 5 are the flowcharts of the SAL-AK 60 group evidencing the behaviors (rectangles) and their statistical interactions (arrows) found during the 20<sup>th</sup> (

Figure 5A) and 21<sup>st</sup> (

Figure 5B) stimuli of the AK. At the PRE period, exploratory and grooming (self-cleaning) behaviors (blue) were predominant. During sound stimulation (SOUND), the exploratory behaviors (blue) continued, with appearance of WR behaviors (yellow) and limbic seizures (green). In the post-sound period (POST) it is possible to observe the presence of exploratory behaviors (blue), limbic seizures (green) and tonic-clonic behaviors (red).

Figure 5 represents the sum of the seizures from the TOL-AK 20 group in the 20<sup>th</sup> (Figure 5C) and 21<sup>st</sup> (

Figure 5D) stimuli. During the 21<sup>st</sup> sound stimulation (SOUND), note the increase of the interactions (arrows) between exploratory behaviors (blue) and the presence of grooming (self-cleaning) behaviors (blue) with high interaction between them. In the post-sound period (POST), also in the 21<sup>st</sup> stimulation, observe the absence of interactions between tonic behaviors (red) and limbic seizures (green) when compared with the 20<sup>th</sup> stimulus (

Figure 5C).

The flowcharts from of TOL-AK 60 group illustrate the behavioral findings at the 20<sup>th</sup> (

Figure 5E) and the 21<sup>st</sup> (

Figure 5F) stimuli during the AK. It is possible to see at the 21<sup>st</sup> compared to 20<sup>th</sup> stimulus, that during the sound stimulation (SOUND) there was an increase of interactions between exploratory behaviors (blue), with reduction of the limbic (green) and WR (yellow) behaviors, as well as the appearance of interactions between grooming (blue, self-cleaning) behaviors (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**E and 5F).

TOL olfactory exposure after AK led to a decrease in cSI and also the changes in the pattern of behavioral expression of seizure, especially in TOL-AK 20 group, as described in detail in the flowcharts using the neuroethological approach (

Figure 5C and 5D). These changes include the exacerbation of exploratory (blue) and grooming (blue) in the presence of sound, and reduction of expression or interactions between WR behaviors (yellow); as well as in the limbic (green) and in the brainstem (tonic-clonic, red) seizures, in the sound and post-sound periods.

### 3. DISCUSSION

In the present study, there is strong evidence that the olfactory stimulation with TOL provoked changes in the behavioral expression of brainstem and limbic seizures in the WAR strain, by preventing them or significantly decreasing their severity.

At present, the neurophysiological mechanisms and the knowledge needed to understand epilepsy treatment with odorants are still unknown [29]. In that direction, our current findings add to the limited data of the literature which indicate that the olfactory stimulation modulates the epileptic activity, suppressing or inhibiting it [9,10,20,26–32,43].

Consistent with this, our initial hypothesis is that sensory stimulation could interfere in synchronization typical of seizure activity, hampering its ability to recruit (or propagate to) structures that transmit ictal alterations to other regions [10,30,31]. In this context, a recent study indicated that piriform cortex cells respond selectively to a great variety of odorants,

among them TOL [67], suggesting that signal processing in the olfactory cortex for TOL [31,68,69], can interfere with the activation of an ensemble of neurons that appear to be important for seizure mechanisms, resulting in discrete activation patterns which would explain its effect on decreasing seizure activity [31] and/or temporary blocking the progression of seizures to other olfactory and cortical networks, and vice versa [69].

Thus, our initial explanation for the current data suggests that the communication between ictogenic structures can be important to networkwise synchronization and amplification of paroxysmal activity. In fact, different sensory modalities, for example: olfactory and auditory systems can activate different peripheral nerves and neural pathways that seem to converge to the same functional anatomical networks (e.g: piriform cortex), resulting in some cases into ictogenic changes (creating pro-epileptic environment) or in others in non-ictogenic changes (creating an anti-epileptic environment, our current case) [70].

Another explanation is based on the acute neural depressor effect of TOL [71–74], similar to barbiturates [74,75], alcohol [74–76] and benzodiazepines [32,74,75]. The idea would be that TOL, an organic solvent, could share cellular actions in voltage-gated and ligand-gated ion channels, summarized below in Table 2 (for full review, see [77]. In this sense, TOL would exert compensatory effects in the functional expression of important cellular proteins (voltage-gated and ligand-gated ion channels) that control neuronal excitability [76,77].

With the identification of some of the molecular effects of TOL, various research groups investigated the metabolic and neurochemical changes associated with TOL exposure [77] as also shown in Table 2. So, a potential link between our current data and those mentioned in Table 2 is the complex neurochemical scenario from classical pharmacological studies indicating that changes in the brain activity and in these neurotransmitter systems are usually utilized as targets for antiepileptic drugs [13,78–83].

In addition to anticonvulsant effects [25,31,32,43,44], TOL also exerts antidepressant-like activity [84], anxiolytic-like properties [32,85–87] and increase or decrease in locomotor activity at low and at high concentrations, respectively [88–92].

Moreover this, TOL can induce important adverse reactions such as: reduction of learning [87,90,91], decreasing of short- and long-term memory [90,91,93,94], alteration of nociception (dependent of species) [25,87,90,95]. Furthermore, the TOL can cause motor incoordination [91,93] and hypothermia [93,96].

It is well-described that irritative, harmful and pungent odors such as TOL induce the activation of the trigeminal system [35,97–102] through chemoreceptors that reach the surface of the nasal epithelium and form synapses with the afferent trigeminal nerve fibers [97]. So,



once TOL is inhaled, occurs the primary activation of the central nervous system [25,86]. Therefore, it is not surprising that the anticonvulsant effect of TOL can also be correlated with trigeminal action. Considering this potent antiepileptic effect, little research was developed in recent decades to assess the trigeminal nerve stimulation in the epilepsy [103–111].

These results are in accordance with observations of the involvement of olfactory systems (that includes the trigeminal system) with TLE. Gowers (1881) described that the use of strong odor, such as ammonia or amyl nitrite was effective in contention of the seizures [20]. In quite intriguing and classical studies, Efron [27,28] demonstrated that not only a specific odorant (jazmin) was able to act as potent anticonvulsant, but imaginary recollection (memory) of that specific odor by the patient also was able to abort seizures. In that direction and context, more than 40 years later, Ebert & Löscher [31], reported that in an experimental model of TLE, amygdala seizures were attenuated (behavioral and EEGraphic), after the previous exposure to TOL (or ammonia), because (in their interpretation) at the time of the electrical stimulation in already kindled animals, the piriform cortex would be “busy” processing TOL, hampering the seizures propagation from the amygdala complex to the piriform cortex. So, clinical and experimental studies [9,10,20,26–32,43], provide a scientific support for the results obtained in the current study, demonstrating that the olfactory stimulation can influence the process of seizures, interfering, for example, in their behavioral expression.

Taken together, TOL appears to act as anticonvulsant substance through a combination of factors that potentially includes: (1) antagonism of circuits, with TOL exerting its role through activation of opposite networks, the ones associated to olfactory processing and those fundamental to the expression of seizures, (2) pharmacological effect of TOL and (3) trigeminal nerve stimulation.

In summary, our results showed a clear confirmation of well-known functional anatomical relationship between olfactory system and seizures circuits (particularly involved in TLE). They also showed that the olfactory stimulation with TOL interfere in the behavioral expression of seizures in the *WAR* strain, blocking or decreasing their severity with strong support of the above mentioned studies.

In that direction, despite of TOL olfactory exposure be (A) a noninvasive strategy, (B) presents anticonvulsant effects (efficacy) and (C) has a good cost-effectiveness, the safety concerning its use prevents its administration, in order to, avoid its acute and chronic adverse effects. In the other hand, our results exposed new behavioral details of TOL anticonvulsant effect, providing a data platform for the study of epilepsy, which may encourage the search for

the action mechanisms of TOL (and others olfactory stimuli), to aid in the identification of new alternative treatment strategies.

The general goal of our study was to investigate the inhibitory mechanisms of TOL [31] in another model of epilepsy (acute and chronic audiogenic seizures in *WARs*).

Finally, this study demonstrated that the olfactory stimulation can represent an additional alternative in the pool of anticonvulsant therapeutic approaches. It is clear that, much needs to be done to understand the action mechanisms of TOL in seizures control, but this study represents a partial component that will contribute to the understanding the efficacy of odors in the behavioral seizure response and it will add data to the existing literature, with potential translational impact.

Among the limitations of this study, we can include: (A) not monitoring of the seizures by video-electroencephalography (video-EEG), (B) methods to TOL exposure without control of chemical saturation chamber. However, it seems not methodologically viable to add other investigations to this already extensive protocol of behavioral analysis, executed in two modalities of seizures.

Ongoing important studies include the verification of the neuroanatomy of cellular activation induced by TOL through c-Fos immunohistochemistry analysis, to confirm if the pronounced difference detected by the behavioral response is also remarkable in terms of brain neuronal function. Moreover, considering the complexity of the epilepsy, further efforts are needed to try to understand why could certain odors and sometimes the same odor (usually in different concentrations) can both precipitate or arrest seizures [29,112,113], in especial those with origin in the temporal lobe.

Preliminary data of our group indicated that 2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline (TMT), a biological relevance odor, “predator odor” reduced both the behavioral and the EEGraphic seizure activity [114,115], in amygdala rapid kindling [116], a model of TLE.

#### **4. CONCLUSIONS**

The olfactory stimulation with TOL prior to acute audiogenic seizures and after AK interfered in the behavioral expression in the *WAR* strain. We observed a blockade or decrease in acute audiogenic seizures severity (cSI). For AK the decrease in the severity of brainstem and limbic seizures was documented respectively, by the decrease in the cSI and LI indexes, especially when TOL was presented 20 s before at the 21<sup>st</sup> stimulus. This decrease was confirmed by detailed behavioral assessment (neuroethology) that showed changes such as the exacerbation of exploratory and grooming (self-cleaning) behaviors in the presence of sound,

with decrease in the expression of WR behaviors, as well as in the brainstem and in the limbic seizures. These data demonstrate that TOL, a strong olfactory stimulus, has anticonvulsant properties, detected by the decrease of acute and chronic (AK) seizures in WARs. Accordingly, intense olfactory stimulation may represent an additional alternative to anticonvulsant therapy, as it has been clearly shown with amygdala electrical kindling [31] and in clinical studies [27,28].

### **Declaration of Responsibility and Conflict of Interests**

The authors declare no conflict of interest with the subject discussed in this article.

### **Author's contributions**

**Polianna Delfino-Pereira** and **Poliana Bertti Dutra**: experimental procedures, data analysis and manuscript preparation. **Eduardo Henrique de Lima Umeoka**: experimental procedures, data analysis and manuscript review. **José Antônio Cortes de Oliveira**: experimental procedures and data analysis. **Victor Rodrigues Santos** and **Artur Fernandes**: experimental procedures and manuscript review. **Simone Saldanha Marroni** and **Flávio Del Vecchio**: experimental procedures. **Norberto Garcia-Cairasco**: experimental design, advice on execution of experimental protocols/methods, laboratory structure (including animals and reagents) and manuscript review and correction.

**Financial Support:** FAPESP (2012/18637-2; 2012/18563-9, 2007/50261-4), CNPq (305883/2014-3), FAPESP-Cinapce (2005/56447-7), CAPES-PROEX-Physiology, CAPES-PROEX-Neurology and FAEPA.

**Acknowledgments:** To all members of the Neurophysiology and Experimental Neuroethology Laboratory (LNNE) and to the Epilepsy Externally Modified (EpExMo) Project, for their support.

## **5. REFERENCES**

[1] Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, et al. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* 2014;55:475–82. doi:10.1111/epi.12550.

[2] Fisher RS, van Emde Boas W, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, et al. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the

International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia* 2005;46:470–2. doi:10.1111/j.0013-9580.2005.66104.x.

- [3] McNamara JO. Emerging insights into the genesis of epilepsy. *Nature* 1999;399:A15-22.
- [4] McNamara JO. Cellular and molecular basis of epilepsy. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 1994;14:3413–25.
- [5] Engel J. Concepts of epilepsy. *Epilepsia* 1995;36 Suppl 1:S23-9.
- [6] WHO | Epilepsy. WHO n.d. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/en/> (accessed July 13, 2017).
- [7] Annegers JF. The epidemiology of epilepsy. In: Wyllie E, editor. *Treat. Epilepsy Princ. Pract.* Lippincott, Philadelphia, PA: 2001, p. 131–8.
- [8] Engel J, Birbeck GL, Diop AG, Jain S PA. *EPILEPSY : GLOBAL ISSUES FOR THE PRACTICING NEUROLOGIST*. New York: Demos Medical.: 2005.
- [9] Jaseja H. Scientific basis behind traditional practice of application of “shoe-smell” in controlling epileptic seizures in the eastern countries. *Clin Neurol Neurosurg* 2008;110:535–8. doi:10.1016/j.clineuro.2008.02.006.
- [10] Jaseja H. Application of “shoe-smell” in controlling epileptic attacks: its origin. *Med Hypotheses* 2010;74:210. doi:10.1016/j.mehy.2009.07.026.
- [11] Chang BS, Lowenstein DH. Epilepsy. *N Engl J Med* 2003;349:1257–66. doi:10.1056/NEJMra022308.
- [12] Cota VR, Drabowski BMB, de Oliveira JC, Moraes MFD. The epileptic amygdala: Toward the development of a neural prosthesis by temporally coded electrical stimulation. *J Neurosci Res* 2016;94:463–85. doi:10.1002/jnr.23741.
- [13] Löscher W, Klitgaard H, Twyman RE, Schmidt D. New avenues for anti-epileptic drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov* 2013;12:757–76. doi:10.1038/nrd4126.
- [14] Simonato M, Brooks-Kayal AR, Engel J, Galanopoulou AS, Jensen FE, Moshé SL, et al. The challenge and promise of anti-epileptic therapy development in animal models. *Lancet Neurol* 2014;13:949–60. doi:10.1016/S1474-4422(14)70076-6.
- [15] Picot M-C, Baldy-Moulinier M, Daurès J-P, Dujols P, Crespel A. The prevalence of epilepsy and pharmaco-resistant epilepsy in adults: a population-based study in a Western European country. *Epilepsia* 2008;49:1230–8. doi:10.1111/j.1528-1167.2008.01579.x.
- [16] Nevalainen O, Ansakorpi H, Simola M, Raitanen J, Isojärvi J, Artama M, et al. Epilepsy-related clinical characteristics and mortality: a systematic review and meta-analysis. *Neurology* 2014;83:1968–77. doi:10.1212/WNL.0000000000001005.
- [17] Wiebe S, Blume WT, Girvin JP, Eliasziw M. A randomized, controlled trial of surgery for temporal-lobe epilepsy. *N Engl J Med* 2001;345:311–8. doi:10.1056/NEJM200108023450501.
- [18] Ryvlin P, Rheims S. Epilepsy surgery: eligibility criteria and presurgical evaluation. *Dialogues Clin Neurosci* 2008;10:91–103.

- [19] Engel J, Wiebe S, French J, Sperling M, Williamson P, Spencer D, et al. Practice parameter: temporal lobe and localized neocortical resections for epilepsy: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology, in association with the American Epilepsy Society and the American Association of Neuro. *Neurology* 2003;60:538–47. doi:10.1212/01.WNL.0000055086.35806.2D.
- [20] W.R. Gowers. *Epilepsy and other chronic convulsive diseases*. William Wo. London: 1881.
- [21] HUGHLINGS-JACKSON J. ON A PARTICULAR VARIETY OF EPILEPSY (“INTELLECTUAL AURA”), ONE CASE WITH SYMPTOMS OF ORGANIC BRAIN DISEASE. *Brain* 1888;11:179–207. doi:10.1093/brain/11.2.179.
- [22] Chen C, Shih Y-H, Yen D-J, Lirng J-F, Guo Y-C, Yu H-Y, et al. Olfactory auras in patients with temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 2003;44:257–60.
- [23] Hong S-C, Holbrook EH, Leopold DA, Hummel T. Distorted olfactory perception: a systematic review. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 2012;132 Suppl:S27-31. doi:10.3109/00016489.2012.659759.
- [24] Acharya V, Acharya J, Lüders H. Olfactory epileptic auras. *Neurology* 1998;51:56–61.
- [25] Cruz SL, Gauthereau MY, Camacho-Muñoz C, López-Rubalcava C, Balster RL. Effects of inhaled toluene and 1,1,1-trichloroethane on seizures and death produced by N-methyl-D-aspartic acid in mice. *Behav Brain Res* 2003;140:195–202.
- [26] BETTS T. Use of aromatherapy (with or without hypnosis) in the treatment of intractable epilepsy—a two-year follow-up study. *Seizure* 2003;12:534–8. doi:10.1016/S1059-1311(03)00161-4.
- [27] EFRON R. The effect of olfactory stimuli in arresting uncinata fits. *Brain J Neurol* 1956;79:267–81.
- [28] EFRON R. The conditioned inhibition of uncinata fits. *Brain J Neurol* 1957;80:251–62.
- [29] Lunardi MS, Lin K, Mameniškienė R, Beniczky S, Bogacz A, Braga P, et al. Olfactory stimulation induces delayed responses in epilepsy. *Epilepsy Behav EB* 2016;61:90–6. doi:10.1016/j.yebeh.2016.05.022.
- [30] Valentine P a., Fremit SL, Teskey GC. Sensory stimulation reduces seizure severity but not afterdischarge duration of partial seizures kindled in the hippocampus at threshold intensities. *Neurosci Lett* 2005;388:33–8. doi:10.1016/j.neulet.2005.06.028.
- [31] Ebert U, Löscher W. Strong olfactory stimulation reduces seizure susceptibility in amygdala-kindled rats. *Neurosci Lett* 2000;287:199–202.
- [32] Wood RW, Coleman JB, Schuler R, Cox C. Anticonvulsant and antipunishment effects of toluene. *J Pharmacol Exp Ther* 1984;230:407–12.
- [33] Bozorg AM, Benbadis SR. Essential oils as a cause of breakthrough seizure after temporal lobectomy. *Seizure* 2009;18:604–5. doi:10.1016/j.seizure.2009.06.001.
- [34] Burkhard PR, Burkhardt K, Haenggeli CA, Landis T. Plant-induced seizures: reappearance of an old problem. *J Neurol* 1999;246:667–70.

- [35] Hughes JR, Andy OJ. The human amygdala. I. Electrophysiological responses to odorants. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1979;46:428–43. doi:10.1016/0013-4694(79)90144-5.
- [36] Ilik F, Pazarli AC. Reflex Epilepsy Triggered by Smell. *Clin EEG Neurosci* 2015;46:263–5. doi:10.1177/1550059414533540.
- [37] Nguyen MQ, Ryba NJP. A smell that causes seizure. *PloS One* 2012;7:e41899. doi:10.1371/journal.pone.0041899.
- [38] Skalli S, Soulaymani Bencheikh R. Epileptic seizure induced by fennel essential oil. *Epileptic Disord Int Epilepsy J Videotape* 2011;13:345–7. doi:10.1684/epd.2011.0451.
- [39] Spinella M. Herbal Medicines and Epilepsy: The Potential for Benefit and Adverse Effects. *Epilepsy Behav EB* 2001;2:524–32. doi:10.1006/ebep.2001.0281.
- [40] Stafstrom CE. Seizures in a 7-month-old child after exposure to the essential plant oil thuja. *Pediatr Neurol* 2007;37:446–8. doi:10.1016/j.pediatrneurol.2007.07.008.
- [41] T. Takahashi. Seizures induced by odorous stimuli. *Clin EEG* 1975;17:769.
- [42] Restrepo D, Hellier JL, Salcedo E. Complex metabolically demanding sensory processing in the olfactory system: Implications for epilepsy. *Epilepsy Behav* 2013;6–11. doi:10.1016/j.yebeh.2013.08.036.
- [43] Silva-Filho AR, Pires ML, Shiotsuki N. Anticonvulsant and convulsant effects of organic solvents. *Pharmacol Biochem Behav* 1992;41:79–82.
- [44] Chan M-H, Lee C-C, Chen H-H. Effects of toluene on seizures induced by convulsants acting at distinct ligand-gated ion channels. *Toxicol Lett* 2006;160:179–84. doi:10.1016/j.toxlet.2005.07.002.
- [45] Löscher W. Fit for purpose application of currently existing animal models in the discovery of novel epilepsy therapies. *Epilepsy Res* 2016;126:157–84. doi:10.1016/j.epilepsyres.2016.05.016.
- [46] Doretto MC, Fonseca CG, Lôbo RB, Terra VC, Oliveira JAC, Garcia-Cairasco N. Quantitative study of the response to genetic selection of the Wistar audiogenic rat strain (WAR). *Behav Genet* 2003;33:33–42.
- [47] 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;71, Part B:250–73. doi:10.1016/j.yebeh.2017.04.001.
- [48] Terra VC, Garcia-Cairasco N. Neuroethological evaluation of audiogenic seizures and audiogenic-like seizures induced by microinjection of bicuculline into the inferior colliculus. II. Effects of nigral clobazam microinjections. *Behav Brain Res* 1992;52:19–28.
- [49] Garcia-Cairasco N, Terra VC, Doretto MC. Midbrain substrates of audiogenic seizures in rats. *Behav Brain Res* 1993;58:57–67.
- [50] Terra VC, Garcia-Cairasco N. NMDA-dependent audiogenic seizures are differentially regulated by inferior colliculus subnuclei. *Behav Brain Res* 1994;62:29–39.
- [51] Dutra Moraes MF, Galvis-Alonso OY, Garcia-Cairasco N. Audiogenic kindling in the Wistar rat: a potential model for recruitment of limbic structures. *Epilepsy Res* 2000;39:251–9.

- [52] Tsutsui J, Terra VC, Oliveira JA, Garcia-Cairasco N. Neuroethological evaluation of audiogenic seizures and audiogenic-like seizures induced by microinjection of bicuculline into the inferior colliculus. I. Effects of midcollicular knife cuts. *Behav Brain Res* 1992;52:7–17.
- [53] Cunha AOS, de Oliveira JAC, Almeida SS, Garcia-Cairasco N, Leão RM. Inhibition of long-term potentiation in the schaffer-CA1 pathway by repetitive high-intensity sound stimulation. *Neuroscience* 2015;310:114–27. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.09.040.
- [54] Doretto MC, Cortes-de-Oliveira JA, Rossetti F, Garcia-Cairasco N. Role of the superior colliculus in the expression of acute and kindled audiogenic seizures in Wistar audiogenic rats. *Epilepsia* 2009;50:2563–74. doi:10.1111/j.1528-1167.2009.02164.x.
- [55] Galvis-Alonso OY, Cortes De Oliveira JA, Garcia-Cairasco N. Limbic epileptogenicity, cell loss and axonal reorganization induced by audiogenic and amygdala kindling in wistar audiogenic rats (WAR strain). *Neuroscience* 2004;125:787–802. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.01.042.
- [56] Garcia-Cairasco N. A critical review on the participation of inferior colliculus in acoustic-motor and acoustic-limbic networks involved in the expression of acute and kindled audiogenic. *Hear Res* 2002;168:208–22.
- [57] Garcia-Cairasco N, Wakamatsu H, Oliveira J a C, Gomes ELT, Del Bel E a., Mello LE a M. Neuroethological and morphological (Neo-Timm staining) correlates of limbic recruitment during the development of audiogenic kindling in seizure susceptible Wistar rats. *Epilepsy Res* 1996;26:177–92.
- [58] 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;97:160–8.
- [59] Naritoku DK, Mecozzi LB, Aiello MT, Faingold CL. Repetition of audiogenic seizures in genetically epilepsy-prone rats induces cortical epileptiform activity and additional seizure behaviors. *Exp Neurol* 1992;115:317–24.
- [60] Romcy-Pereira RN, Garcia-Cairasco N. Hippocampal cell proliferation and epileptogenesis after audiogenic kindling are not accompanied by mossy fiber sprouting or Fluoro-Jade staining. *Neuroscience* 2003;119:533–46.
- [61] Pubchem. toluene n.d. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1140> (accessed July 19, 2017).
- [62] Rossetti F, Rodrigues MCA, de Oliveira JAC, Garcia-Cairasco N. EEG wavelet analyses of the striatum-substantia nigra pars reticulata-superior colliculus circuitry: audiogenic seizures and anticonvulsant drug administration in Wistar audiogenic rats (War strain). *Epilepsy Res* 2006;72:192–208. doi:10.1016/j.epilepsyres.2006.08.001.
- [63] Garcia-Cairasco N, Wakamatsu H, Oliveira JA, Gomes EL, Del Bel EA, Mello LE. Neuroethological and morphological (Neo-Timm staining) correlates of limbic recruitment during the development of audiogenic kindling in seizure susceptible Wistar rats. *Epilepsy Res* 1996;26:177–92.
- [64] Pinel JP, Rovner LI. Experimental epileptogenesis: kindling-induced epilepsy in rats. *Exp Neurol* 1978;58:190–202.
- [65] Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. I. After-discharge threshold. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1972;32:269–79.

- [66] Garcia-Cairasco N, Doretto MC, Prado RP, Jorge BP, Terra VC, Oliveira JA. New insights into behavioral evaluation of audiogenic seizures. A comparison of two ethological methods. *Behav Brain Res* 1992;48:49–56.
- [67] Zhan C, Luo M. Diverse Patterns of Odor Representation by Neurons in the Anterior Piriform Cortex of Awake Mice 2010;30:16662–72. doi:10.1523/JNEUROSCI.4400-10.2010.
- [68] Zibrowski EM, Vanderwolf CH. Oscillatory fast wave activity in the rat piriform cortex: relations to olfaction and behavior. *Brain Res* 1997;766:39–49.
- [69] Vaughan DN, Jackson GD. The piriform cortex and human focal epilepsy. *Front Neurol* 2014;5:259. doi:10.3389/fneur.2014.00259.
- [70] Vismar MS, Forcelli PA, Skopin MD, Gale K, Koubeissi MZ. The piriform, perirhinal, and entorhinal cortex in seizure generation. *Front Neural Circuits* 2015;9:27. doi:10.3389/fncir.2015.00027.
- [71] Rees DC, Coggeshall E, Balster RL. Inhaled toluene produces pentobarbital-like discriminative stimulus effects in mice. *Life Sci* 1985;37:1319–25.
- [72] Bowen SE. Time course of the ethanol-like discriminative stimulus effects of abused inhalants in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2009;91:345–50. doi:10.1016/j.pbb.2008.08.005.
- [73] Geller I, Hartmann RJ, Mendez V, Gause EM. Toluene inhalation and anxiolytic activity: possible synergism with diazepam. *Pharmacol Biochem Behav* 1983;19:899–903.
- [74] Evans EB, Balster RL. CNS depressant effects of volatile organic solvents. *Neurosci Biobehav Rev* 1991;15:233–41. doi:10.1016/S0149-7634(05)80003-X.
- [75] Cruz SL, Mirshahi T, Thomas B, Balster RL, Woodward JJ. Effects of the abused solvent toluene on recombinant N-methyl-D-aspartate and non-N-methyl-D-aspartate receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;286:334–40.
- [76] Bale AS, Tu Y, Carpenter-Hyland EP, Chandler LJ, Woodward JJ. Alterations in glutamatergic and gabaergic ion channel activity in hippocampal neurons following exposure to the abused inhalant toluene. *Neuroscience* 2005;130:197–206. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.08.040.
- [77] Cruz SL, Rivera-García MT, Woodward JJ. Review of toluene action: clinical evidence, animal studies and molecular targets. *J Drug Alcohol Res* 2014;3. doi:10.4303/jdar/235840.
- [78] Fisher JL. The effects of stiripentol on GABA(A) receptors. *Epilepsia* 2011;52 Suppl 2:76–8. doi:10.1111/j.1528-1167.2011.03008.x.
- [79] Kwan P, Sills GJ, Brodie MJ. The mechanisms of action of commonly used antiepileptic drugs. *Pharmacol Ther* 2001;90:21–34.
- [80] Rogawski MA, Löscher W. The neurobiology of antiepileptic drugs for the treatment of nonepileptic conditions. *Nat Med* 2004;10:685–92. doi:10.1038/nm1074.
- [81] Stephen LJ, Brodie MJ. Pharmacotherapy of epilepsy: newly approved and developmental agents. *CNS Drugs* 2011;25:89–107. doi:10.2165/11584860-000000000-00000.



- [82] van Veenendaal TM, IJff DM, Aldenkamp AP, Hofman PAM, Vlooswijk MCG, Rouhl RPW, et al. Metabolic and functional MR biomarkers of antiepileptic drug effectiveness: A review. *Neurosci Biobehav Rev* 2015;59:92–9. doi:10.1016/j.neubiorev.2015.10.004.
- [83] White HS, Smith MD, Wilcox KS. Mechanisms of action of antiepileptic drugs. *Int Rev Neurobiol* 2007;81:85–110. doi:10.1016/S0074-7742(06)81006-8.
- [84] Cruz SL, Soberanes-Chávez P, Páez-Martínez N, López-Rubalcava C. Toluene has antidepressant-like actions in two animal models used for the screening of antidepressant drugs. *Psychopharmacology (Berl)* 2009;204:279–86. doi:10.1007/s00213-009-1462-2.
- [85] Bowen SE, Wiley JL, Balster RL. The effects of abused inhalants on mouse behavior in an elevated plus-maze. *Eur J Pharmacol* 1996;312:131–6.
- [86] López-Rubalcava C, Hen R, Cruz SL. Anxiolytic-like actions of toluene in the burying behavior and plus-maze tests: differences in sensitivity between 5-HT(1B) knockout and wild-type mice. *Behav Brain Res* 2000;115:85–94.
- [87] Páez-Martínez N, Cruz SL, López-Rubalcava C. Comparative study of the effects of toluene, benzene, 1,1,1-trichloroethane, diethyl ether, and flurothyl on anxiety and nociception in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003;193:9–16.
- [88] Batis JC, Hannigan JH, Bowen SE. Differential effects of inhaled toluene on locomotor activity in adolescent and adult rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2010;96:438–48. doi:10.1016/j.pbb.2010.07.003.
- [89] Bowen SE, Balster RL. A direct comparison of inhalant effects on locomotor activity and schedule-controlled behavior in mice. *Exp Clin Psychopharmacol* 1998;6:235–47.
- [90] Huerta-Rivas A, López-Rubalcava C, Sánchez-Serrano SL, Valdez-Tapia M, Lamas M, Cruz SL. Toluene impairs learning and memory, has antinociceptive effects, and modifies histone acetylation in the dentate gyrus of adolescent and adult rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2012;102:48–57. doi:10.1016/j.pbb.2012.03.018.
- [91] Lo P-S, Wu C-Y, Sue H-Z, Chen H-H. Acute neurobehavioral effects of toluene: involvement of dopamine and NMDA receptors. *Toxicology* 2009;265:34–40. doi:10.1016/j.tox.2009.09.005.
- [92] Riegel AC, French ED. An electrophysiological analysis of rat ventral tegmental dopamine neuronal activity during acute toluene exposure. *Pharmacol Toxicol* 1999;85:37–43.
- [93] Chan M-H, Chung S-S, Stoker AK, Markou A, Chen H-H. Sarcosine attenuates toluene-induced motor incoordination, memory impairment, and hypothermia but not brain stimulation reward enhancement in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 2012;265:158–65. doi:10.1016/j.taap.2012.10.004.
- [94] Win-Shwe T-T, Fujimaki H. Acute administration of toluene affects memory retention in novel object recognition test and memory function-related gene expression in mice. *J Appl Toxicol JAT* 2012;32:300–4. doi:10.1002/jat.1693.
- [95] Cruz SL, Páez-Martínez N, Pellicer F, Salazar LA, López-Rubalcava C. Toluene increases acute thermnociception in mice. *Behav Brain Res* 2001;120:213–20.

- [96] Paez-Martinez N, Aldrete-Audiffred J, Gallardo-Tenorio A, Castro-Garcia M, Estrada-Camarena E, Lopez-Rubalcava C. Participation of GABAA, GABA(B) receptors and neurosteroids in toluene-induced hypothermia: evidence of concentration-dependent differences in the mechanism of action. *Eur J Pharmacol* 2013;698:178–85. doi:10.1016/j.ejphar.2012.10.004.
- [97] Munger SD, Leinders-Zufall T, Zufall F. Subsystem organization of the mammalian sense of smell. *Annu Rev Physiol* 2009;71:115–40. doi:10.1146/annurev.physiol.70.113006.100608.
- [98] Galliot E, Laurent L, Hacquemand R, Pourié G, Millot J-L. Fear-like behavioral responses in mice in different odorant environments: Trigeminal versus olfactory mediation under low doses. *Behav Processes* 2012;90:161–6. doi:10.1016/j.beproc.2012.01.002.
- [99] Doty RL, Brugger WE, Jurs PC, Orndorff MA, Snyder PJ, Lowry LD. Intranasal Trigeminal Stimulation from Odorous Volatiles : Psychometric Responses from Anosmic and Normal Humans I 1978;20:175–85.
- [100] Cometto-Muñiz JE, Cain WS, Abraham MH, Gola JM. Ocular and nasal trigeminal detection of butyl acetate and toluene presented singly and in mixtures. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol* 2001;63:233–44.
- [101] Hacquemand R, Jacquot L, Brand G. Comparative Fear-Related Behaviors to Predator Odors (TMT and Natural Fox Feces) before and after Intranasal ZnSO(4) Treatment in Mice. *Front Behav Neurosci* 2010;4:188. doi:10.3389/fnbeh.2010.00188.
- [102] Jacquot L, Pourié G, Buron G, Monnin J, Brand G. Effects of toluene inhalation exposure on olfactory functioning: behavioral and histological assessment. *Toxicol Lett* 2006;165:57–65. doi:10.1016/j.toxlet.2006.01.018.
- [103] Fanselow EE, Reid AP, Nicolelis MA. Reduction of pentylentetrazole-induced seizure activity in awake rats by seizure-triggered trigeminal nerve stimulation. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 2000;20:8160–8.
- [104] DeGiorgio CM, Shewmon DA, Whitehurst T. Trigeminal nerve stimulation for epilepsy. *Neurology* 2003;61:421–2.
- [105] DeGiorgio CM, Soss J, Cook IA, Markovic D, Gornbein J, Murray D, et al. Randomized controlled trial of trigeminal nerve stimulation for drug-resistant epilepsy. *Neurology* 2013;80:786–91. doi:10.1212/WNL.0b013e318285c11a.
- [106] Pop J, Murray D, Markovic D, DeGiorgio CM. Acute and long-term safety of external trigeminal nerve stimulation for drug-resistant epilepsy. *Epilepsy Behav EB* 2011;22:574–6. doi:10.1016/j.yebeh.2011.06.024.
- [107] Soss J, Heck C, Murray D, Markovic D, Oviedo S, Corrale-Leyva G, et al. A prospective long-term study of external trigeminal nerve stimulation for drug-resistant epilepsy. *Epilepsy Behav EB* 2015;42:44–7. doi:10.1016/j.yebeh.2014.10.029.
- [108] DeGiorgio CM, Shewmon A, Murray D, Whitehurst T. Pilot study of trigeminal nerve stimulation (TNS) for epilepsy: a proof-of-concept trial. *Epilepsia* 2006;47:1213–5. doi:10.1111/j.1528-1167.2006.00594.x.

- [109] Cook IA, Kealey CP, DeGiorgio CM. The potential use of trigeminal nerve stimulation in the treatment of epilepsy. *Ther Deliv* 2015;6:273–5. doi:10.4155/tde.14.120.
- [110] Wang Q-Q, Zhu L-J, Wang X-H, Zuo J, He H-Y, Tian M-M, et al. Chronic Trigeminal Nerve Stimulation Protects Against Seizures, Cognitive Impairments, Hippocampal Apoptosis, and Inflammatory Responses in Epileptic Rats. *J Mol Neurosci* 2016;59:78–89. doi:10.1007/s12031-016-0736-5.
- [111] Zare M, Salehi M, Mahvari J, Najafi MR, Moradi A, Pour MH, et al. Trigeminal nerve stimulation: A new way of treatment of refractory seizures. *Adv Biomed Res* 2014;3:81. doi:10.4103/2277-9175.127994.
- [112] Beniczky S, Guaranha MSB, Conradsen I, Singh MB, Rutar V, Lorber B, et al. Modulation of epileptiform EEG discharges in juvenile myoclonic epilepsy: an investigation of reflex epileptic traits. *Epilepsia* 2012;53:832–9. doi:10.1111/j.1528-1167.2012.03454.x.
- [113] Wolf P. From precipitation to inhibition of seizures: rationale of a therapeutic paradigm. *Epilepsia* 2005;46 Suppl 1:15–6. doi:10.1111/j.0013-9580.2005.461005.x.
- [114] Delfino-Pereira P, Bertti-Dutra P, Oliveira J A C, Del Vecchio F, Medeiros D C, Cestari D Met al. Behavioral, EEGraphic and chemical characterization of the anticonvulsant effects of the predator odor (TMT) in the rapid electrical kindling, a model of temporal lobe epilepsy. 32<sup>nd</sup> International Epilepsy Congress, Barcelona. 2017.
- [115] Garcia-Cairasco N, Pereira P D, Bertti Dutra P, Cortes de Oliveira J A, Del Vecchio F, Moreira Cestari D, et al. Anticonvulsant effect of the predator odor (TMT) in the fast Electrical Amygdala kindling. An experimental model of temporal lobe epilepsy 2016.
- [116] Foresti ML, Arisi GM, Fernandes A, Tilelli CQ, Garcia-Cairasco N. Chelatable zinc modulates excitability and seizure duration in the amygdala rapid kindling model. *Epilepsy Res* 2008;79:166–72. doi:10.1016/j.eplepsyres.2008.02.004.
- [117] Rivera-García MT, López-Rubalcava C, Cruz SL. Preclinical characterization of toluene as a non-classical hallucinogen drug in rats: participation of 5-HT, dopamine and glutamate systems. *Psychopharmacology (Berl)* 2015;232:3797–808. doi:10.1007/s00213-015-4041-8.
- [118] Bale AS, Smothers CT, Woodward JJ. Inhibition of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by the abused solvent, toluene. *Br J Pharmacol* 2002;137:375–83. doi:10.1038/sj.bjp.0704874.
- [119] Beckstead MJ, Weiner JL, Eger EI, Gong DH, Mihic SJ. Glycine and gamma-aminobutyric acid(A) receptor function is enhanced by inhaled drugs of abuse. *Mol Pharmacol* 2000;57:1199–205.
- [120] Riegel AC, Zapata A, Shippenberg TS, French ED. The abused inhalant toluene increases dopamine release in the nucleus accumbens by directly stimulating ventral tegmental area neurons. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol* 2007;32:1558–69. doi:10.1038/sj.npp.1301273.
- [121] Gerasimov MR, Schiffer WK, Marsteller D, Ferrieri R, Alexoff D, Dewey SL. Toluene inhalation produces regionally specific changes in extracellular dopamine. *Drug Alcohol Depend* 2002;65:243–51.

- 
- [122] Ladefoged O, Strange P, Møller A, Lam HR, Ostergaard G, Larsen JJ, et al. Irreversible effects in rats of toluene (inhalation) exposure for six months. *Pharmacol Toxicol* 1991;68:384–90.
- [123] Win-Shwe T-T, Mitsushima D, Nakajima D, Ahmed S, Yamamoto S, Tsukahara S, et al. Toluene induces rapid and reversible rise of hippocampal glutamate and taurine neurotransmitter levels in mice. *Toxicol Lett* 2007;168:75–82. doi:10.1016/j.toxlet.2006.10.017.
- [124] Perrine SA, O’Leary-Moore SK, Galloway MP, Hannigan JH, Bowen SE. Binge toluene exposure alters glutamate, glutamine and GABA in the adolescent rat brain as measured by proton magnetic resonance spectroscopy. *Drug Alcohol Depend* 2011;115:101–6. doi:10.1016/j.drugalcdep.2010.11.001.
- [125] Chen H-H, Wei C-T, Lin Y-R, Chien T-H, Chan M-H. Neonatal toluene exposure alters agonist and antagonist sensitivity and NR2B subunit expression of NMDA receptors in cultured cerebellar granule neurons. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol* 2005;85:666–74. doi:10.1093/toxsci/kfi100.
- [126] Williams JM, Stafford D, Steketee JD. Effects of repeated inhalation of toluene on ionotropic GABA A and glutamate receptor subunit levels in rat brain. *Neurochem Int* 2005;46:1–10. doi:10.1016/j.neuint.2004.07.006.
- [127] Lee Y-F, Lo P-S, Wang Y-J, Hu A, Chen H-H. Neonatal toluene exposure alters N-methyl-D-aspartate receptor subunit expression in the hippocampus and cerebellum in juvenile rats. *Neuropharmacology* 2005;48:195–203. doi:10.1016/j.neuropharm.2004.09.008.
- [128] Lopreato GF, Phelan R, Borghese CM, Beckstead MJ, Mihic SJ. Inhaled drugs of abuse enhance serotonin-3 receptor function. *Drug Alcohol Depend* 2003;70:11–5.

**Tables:**

Table 1

<b>Table 1.</b> Severity index with behavioral descriptions according to Rossetti et al [62] and Pinel & Rovner [64]	
Categorized Brainstem Severity Index (cSI) Rossetti et al [62]	Limbic index (LI) or Racine scale [65] modified by Pinel & Rovner [64]
0 = No seizures	0= Immobility
1 = One running	1= Facial automatism
2 = One wild running (running plus jumping plus atonic falling)	2= Head myoclonia
3 = Two wild runnings	3= Forelimbs myoclonia
4 = Tonic convulsion (opisthotonus)	4= Rearing
5 = Tonic seizures plus generalized clonic convulsions	5= Rearing and falling
6 = Head ventral flexion plus cSI 5	6= More than three fallings
7 = Forelimb hyperextension plus cSI 6	7= Running and/or Jumping (Wild running)
8 = Hindlimb hyperextension plus cSI 7	8= Tonic-clonic seizures

Table 2

<b>Table 2.</b> Assessment of the effects of TOL	
Reduce activity of the N-methyl-d-aspartate (NMDA) subtype of glutamate receptors	[44,87,91,93,117]
Inhibit nicotinic acetylcholine receptors	[44,118]
Increase the activity of GABA <sub>A</sub> and GABA <sub>B</sub> receptors	[44,74,76,96,119]
Contradictory effect in the glycine receptors	[44,119]
Influence the dopamine receptor and increase of dopaminergic level	[91,92,117,120,121]
Changes in levels of glutamine, glutamate and GABA	[117,122–124]
Changes in the subunit composition or density of GABAergic and glutamatergic receptor subunit	[76,125–127]
Increase 5HT and stimulates, 5HT <sub>2A</sub> and 5HT <sub>2C</sub>	[117,128]
These results were observed with TOL used as an olfactory stimulus, but also with intraperitoneal injection that it has been extensively described to produce the same behavioral alterations as compared to inhalation [91,92].	

## Figures Legends

**Figure 1.** Schematic time-line protocols for TOL effects in acute audiogenic seizure (Protocol 1) and TOL effects in AK (Protocol 2).

**Figure 2.** (A) Categorized brainstem severity index (cSI) of SAL-SOUND versus TOL-SOUND groups ( $***p<0.001$ ). (B) Latency for the first WR of SAL-SOUND versus TOL-SOUND groups ( $p>0.05$ ). (C) Latency for TCV of group SAL-SOUND versus TOL-SOUND ( $p>0.05$ ). Mann Whitney test.

**Figure 3.** (A) Flowchart calibration pattern [72]. Each behavior is displayed as a rectangle, where the height corresponds to behavioral frequency, and the base, to behavioral mean duration. Statistical interactions between behavioral dyads are proportional to the width of the arrows that link them. The colors used in the rectangles are designed to qualitatively identify categories or classes (clusters) of related behaviors. The color of the arrows is determined by the starting point of a dyad, therefore, any rectangle and its correspondent exiting (out) arrow must have the same color to facilitate the identification of the direction of the behavioral interactions. Behavioral sequences after AK are illustrated in other flowcharts with the sum of seizures from SAL-NS (B), TOL-NS (C), SAL-SOUND (D) and TOL-SOUND (E) groups. In the second cell (middle) the SOUND period is 01 minute (maximum) of acoustic stimulus or until the appearance of TCV. In the third cell (right), the POST period, also with duration of 01 minute after the sound, or until the appearance of TCV. Acronyms (Supplementary Table 1).

**Figure 4.** (A) AK development in SAL-AK 60 group ( $n=6$ ): the cSI varied from 2-7 at the 20<sup>th</sup> (6/6 rats) to 2-7 (5/6) at the 21<sup>st</sup> AK, without statistically significant differences between the 21<sup>st</sup> stimulus and the AK indexes in previous stimuli ( $p>0.05$ ), and also without difference between stimuli (1<sup>st</sup> to 21<sup>st</sup>,  $p>0.05$ ). LI values were different between stimuli (1<sup>st</sup> to 21<sup>st</sup>;  $*p<0.05$ ). (B) AK development in TOL-AK 20 group ( $n=9$ ): the cSI varied from 2-8 at the 20<sup>th</sup> stimulus (9/9) to 0 (6/9) or 2-3 (3/9) at the 21<sup>st</sup> stimulus of AK. The cSI at the 21<sup>st</sup> stimulus of AK was lower than all indexes at previous AK stimuli, except for to the 5<sup>th</sup>, 16<sup>th</sup> and 17<sup>th</sup> stimuli ( $*p<0.05$ ;  $**p<0.01$ ;  $***p<0.001$ ), with statistically significant differences between stimuli (1<sup>st</sup> to 21<sup>st</sup>,  $***p<0.001$ ). LI was different between the 21<sup>st</sup> and 19<sup>th</sup> ( $*p<0.05$ ) and also between stimuli (1<sup>st</sup> to 21<sup>th</sup>,  $***p<0.001$ ). (C) AK development in TOL-AK 60 group ( $n=9$ ): the cSI varied from 2-7 at the 20<sup>th</sup> (8/9) to 2-7 (7/9) at the 21<sup>st</sup> stimulus of AK, without statistically significant differences between the 21<sup>st</sup> stimulus with the previous stimuli AK indexes ( $p>0.05$ ), but with difference between stimuli for both cSI and LI (1<sup>st</sup> to 21<sup>th</sup>,  $*p<0.05$  and  $***p<0.001$ , respectively). Repeated Measures ANOVA; Dunnett's Multiple Comparison Test.

**Figure 5.** Flowcharts with the sum of seizures: from the SAL-AK 60 group at the 20<sup>th</sup> (A) and at the 21<sup>st</sup> (B) stimuli. From the TOL-AK 20 group at the 20<sup>th</sup> (C) and at the 21<sup>st</sup> (D) stimuli. And from the TOL-AK 60 group at the 20<sup>th</sup> (E) and at the 21<sup>st</sup> (F) stimuli. In the first cell (left) of each stimulus, the PRE period, with 01 minute before sound; in the second cell (middle) the SOUND period with 01 minute (maximum) of acoustic stimulus or until the appearance of TCV, and finally in the third cell (right), the POST period also with duration of 01 minute after the sound or the presence of TCV. Calibration details such as rectangles, arrows and colors as in Figure 3A, acronyms (Supplementary Table 1).

## Supplementary Material

**Supplementary Table 1.** Dictionary of some of the behavioral items and their corresponding acronyms, observed in this study [66].

<b>Acronyms</b>	<b>Description</b>
AF	Atonic Falling
AP	Apnea
CCV <sub>g</sub>	Clonic Convulsions (generalized)
CCV <sub>p</sub>	Clonic Convulsions (partial)
CCV <sub>1</sub>	Clonic Convulsions (forelegs)
CCV <sub>2</sub>	Clonic Convulsions (hindlegs)
CLS	Clonic spasms
DYS	Dyspnea
EB	Eye Blinking
ER	Erect Posture
FLE	Forelimb Hyperextension
FR	Freezing Posture
GAL	Galloping
GL	Gyrating, Left
GR	Gyrating, Right
GRF	Grooming of Face
GRG	Grooming of Genitals
GRH	Grooming of Head
GRL	Grooming of Body, Left
GRR	Grooming of Body, Right
HLE	Hindlimb Hyperextensions
HFL	Head Ventral Flexions
IM	Immobility
JP	Jumping
LCR2	Licking of Claws right, forelegs
LIC	Licking of Claws
LYL	Lying Posture Left
LYR	Lying Posture Right
MT	Masticatory Movements
MYO1	Myoclonus Spasms, hindlegs
MYO <sub>g</sub>	Generalized Myoclonus
MYO <sub>h</sub>	Myoclonus Spasms, Head
NOD	Nodding
PIM	Postictal Immobility
PIV1	Pivoting (Moving of head, laterally)
REAR	Rearing
RU	Running
SC	Scanning
SH	Head Shaking
SNF	Sniffing
STA	Startle
STR	Body Straightening
TCP	Tachypnea
TCV	Tonic-Clonic Convulsions
TNBR	Tonic Neck and Body Turning Right
WA	Walking
WDS	Wet Dog Shaking
WI	Withdraw

---

**6. ARTIGO PUBLICADO DURANTE DOUTORADO:****7. ARTIGO EM PREPARAÇÃO DURANTE DOUTORADO:****ARE PREDATOR SMELL (TMT)-INDUCED BEHAVIORAL ALTERATIONS IN RATS ABLE TO INHIBIT SEIZURES?**

**Authors:** Delfino-Pereira, P.<sup>a#</sup>; Dutra, P.B.<sup>a,b#</sup>; Cortes de Oliveira, J.A.<sup>b</sup>; Turatti I.C.C.<sup>c</sup>; Fernandes A.<sup>b</sup>; Lopes N.P.<sup>c</sup>; Garcia-Cairasco, N.<sup>a,b</sup>

**Affiliations:**

a- Neurosciences and Behavioral Sciences Department, Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

b- Physiology Department, Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

c- Physics and Chemistry Department, Ribeirão Preto School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

#These authors contributed equally

\*Corresponding author

**Norberto Garcia-Cairasco, MSc, PhD**

Physiology Department

Ribeirão Preto School of Medicine – University of São Paulo

Avenida dos Bandeirantes, 3900

Ribeirão Preto – SP, Brazil

CEP: 14049-900

<ngcairas@usp.br>

Polianna Delfino-Pereira, MSc <polidelfino@yahoo.com.br>

Poliana Bertti-Dutra, PhD <pbertti@yahoo.com.br>

José Antônio Cortes de Oliveira, BSc <jacolive@usp.br>

Izabel Cristina Casanova Turatti, BSc <izcristu@usp.br>

Artur Fernandes, PhD <fernandes.artur@gmail.com>

Norberto Peporine Lopes, PhD <npelopes@fcrp.usp.br>

Norberto Garcia-Cairasco, PhD <ngcairas@usp.br>

**ABSTRACT**

**Objective:** To evaluate the chemical and behavioral effects of 2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline (TMT) after olfactory exposure and to verify their influence in the expression of acute audiogenic seizures in the *Wistar Audiogenic Rat* (WAR) strain. **Materials and Methods: PROTOCOL 1:** TMT gas chromatography was applied to define odor saturation to different concentrations, time required for saturation and desaturation, and if saturation was homogeneous. Also, male adult Wistar rats were exposed to saline (SAL) or to



different TMT concentrations and their behaviors were evaluated (neuroethology). **PROTOCOL 2:** Male adult WARs were exposed for 15 seconds to SAL or TMT, followed by sound stimulation for 1 minute or until Tonic-Clonic Convulsion (TCC). Behavioral analysis included: latencies (wild running and TCC), seizure severity indexes and neuroethology. **Results:** Gas chromatography established a saturation homogeneous to different concentrations of TMT, indicating that their saturation and desaturation occurred in 30 minutes. TMT triggered fear-like reactions associated to reduction in motor activity and in grooming behavior, in the two highest concentrations. Pure TMT presented anticonvulsant properties such as less severe seizure phenotype, as well as a decrease in TCC expression. **Conclusions:** TMT elicited fear-like behaviors in Wistar and WAR, and can be utilized in a quantifiable and controllable way. Our results suggested possible antagonism between "fear-related" and "seizure-related" networks.

**KEYWORDS:** TMT; Fear; Epilepsy; *Wistar Audiogenic Rat*; Behavioral Analysis; Chemical Parameters.

## INTRODUCTION

Sensing chemical warnings is important for species adaptation and survival (Apfelbach et al., 2015). These signals regulate among others, early detection, localization, identification (Blanchard et al., 2008) and consequent defensive responses of prey species against potentially harmful organisms, including predators (Derby and Aggio, 2011).

Predator odors are semiochemical cues already acquired in evolution and were consolidated as phyletic or species memories (Fuster, 1997). Thus, laboratory rodents promptly recognize, for example, the red fox odor and exhibit defensive behavior, regardless of any previous contact, because it is an intrinsically threatening stimuli (innate fear, [Canteras et al., 2015; Gross and Canteras, 2012]). These fear responses are also present when rodents are re-exposed to environment (neutral stimuli) that were previously associated with a predator odor (innate threats) suggesting the learning and the consolidation of contextual memory to predator odor (conditioning fear [Canteras et al., 2015; Gross and Canteras, 2012]).

In recent years, a large number of studies have used carnivore odors to induce fear in rodents, among them: cats, foxes and others (Fendt et al., 2005; Rosen et al., 2015). Of particular relevance for the present study, the 2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline (TMT: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/263626#section=Top>>, chemical structure in Figure 1A) was originally isolated from red fox (*Vulpes vulpes*) anal secretions, in 1980s at Vernet-Maury's Laboratory (Vernet-Maury, E., 1980; Vernet-Maury et al., 1984). The biological meaning of this substance for rodents is associated with life-threatening and induction of behavioral and autonomic responses, including freezing (FR), reduction in motor

activity and grooming behaviors (other behaviors, see Table 1). As an experimental paradigm, the use of TMT offers methodological advantages over cat odor, by being a single molecule that can be artificially synthesized, has stable chemical properties and its concentration can be precisely controlled (Ayers et al., 2013; Fendt and Endres, 2008), moreover, TMT has a high sensory selectivity, activating the primary olfactory system (Ayers et al., 2013; Kobayakawa et al., 2007 [although one study indicates the activation also of the Grueneberg Ganglion; Brechbuhl et al., 2013]), and structures such as amygdala (Asok et al., 2013; Day et al., 2004; Fendt et al., 2003; Janitzky et al., 2015; Morrow et al., 2002, 2000; Wallace and Rosen, 2001 [see Table 2]).

It is a common finding of epilepsy, the description of sensory events preceding seizures, such as olfactory aura (Acharya et al., 1998; Chen et al., 2003; Gowers, 1881; Hong et al., 2012; Hughlings-Jackson, 1888). Efron's paper (1956) suggested the modulation of temporal lobe seizures in a patient that began her seizures with olfactory aura (jazzmin odor). In fact, after several quite disciplined attempts of studying herself, Efron (1957) reported the extraordinary fact that conditioning, indeed evoking only the odor image was enough for blocking the patient seizures. Interestingly, there are several other reports of patients with Temporal Lobe Epilepsy (TLE) that had anticonvulsant effects when exposed to olfactory stimuli (Betts, 2003; Efron, 1957, 1956; Gowers, 1881; Jaseja, 2010, 2008; Lunardi et al., 2016; Wood et al., 1984).

Similar findings were described in animal models of TLE induced by Amygdala Kindling, in which olfactory stimulation with toluene (TOL) suppressed seizures in most rats, even with electrical stimulation 20% above of threshold (Ebert and Löscher, 2000). In the same direction, the olfactory stimulation also with TOL reduced the severity of the behavioral seizures in animals of the *Wistar Audiogenic Rat (WAR)* strain (Delfino-Pereira et al., 2018). In sharp contrast, the olfactory stimulation can also provoke seizures, the called reflex epilepsy (BOZORG; BENBADIS, 2009; ILIK; PAZARLI, 2015; LUNARDI et al., 2016; NGUYEN; RYBA, 2012b; RESTREPO; HELLIER; SALCEDO, 2013; SKALLI; SOULAYMANI BENCHEIKH, 2011).

In fact, when animals of the *WAR* strain are exposed to a single sound stimulus (120 decibels [dB]) they express behavioral seizures, which depend initially on brainstem focal activity, usually with the following behavioral sequence: Running (RU), Gyri (right [GR] and left [GL]), Jumping (JU) and Atonic Falling (AF [these behaviors represent the specific clusters or categories named as Wild Running, WR]), reaching Arching Tonus (Opisthotonus) followed by the Tonic-Clonic phase in most animals (Doretto et al., 2003; Garcia-Cairasco, 2002; Garcia-Cairasco et al., 2017, 1993, 1992; Tsutsui et al., 1992). Repeated sound stimulation, the so-

called Audiogenic Kindling (Dutra Moraes et al., 2000; Marescaux et al., 1987; Naritoku et al., 1992), results in gradually more spread of seizure activity and promotes the recruitment of limbic circuits (Cunha et al., 2015; Doretto et al., 2009; Dutra Moraes et al., 2000; Romcy-Pereira and Garcia-Cairasco, 2003), culminating in the development of behaviors (Galvis-Alonso et al., 2004; Garcia-Cairasco et al., 1996) typical of TLE models, such as those described by Racine (1972) and modified by Pinel and Rovner (1978), after Amygdala Kindling.

The olfactory stimulation with organic solvents (xylene, TOL, among others) or TMT, in awake or urethane-anesthetized Long Evans rats was able to trigger rhythmic fast wave bursts in both the olfactory bulb and the piriform cortex (Zibrowski and Vanderwolf, 1997). A recent study showed that the respiratory patterns (steady rate ~4 Hertz) in mice correlated with simultaneous alterations in the oscillation from prelimbic prefrontal cortex (~4 Hertz), associated to modification of conditioned fear-induced FR behavior (Moberly et al., 2018). On the other hand, it is known that Piriform Cortex, Amygdala, Hippocampus and adjacent cortices are crucial structures for the expression of fear, also activated during certain types of experimental epileptic seizures (Bertram, 2007; Ebert and Löscher, 1995; Fisher, 1989; Goddard, 1967; Goddard et al., 1969; Löscher et al., 1995; Loscher and Brandt, 2010; Löscher and Ebert, 1996; Lothman et al., 1985; McNamara et al., 1980).

Taken together, the TMT - a potent chemical substance derived from fox feces which represents “predator smell”, can induce naturally fear and also could influence seizure processes, by antagonistic neural circuitry activation (possibly via Piriform Cortex, Amygdala and Hippocampus), representing an interesting advance in the studies involving the olfactory stimulation (odor therapy) as anticonvulsant technique. Therefore, the present study was directed to answer three principal inquiries: (1) What are the chemical parameters (prerequisite) involved in the induction of the TMT response? (2) What are the behavioral effects of the TMT in the innate fear responses in Wistar and WARs? (3) Can TMT be used to inhibit seizures?

## **OBJECTIVE**

To evaluate the chemical and behavioral effects of TMT after olfactory exposure and to verify their influence in the expression of acute audiogenic seizures in the WAR strain.

## **EXPERIMENTAL PROCEDURE**

All experimental protocols were designed according with recommendations for animal experimentation of the Society for Neuroscience and by the Ethics Committee in Animal

After the experimental procedures all the rats were euthanized.

The present study was conducted on male adult Wistar (N= 34) and WAR (N= 28) animals bred and maintained at the Ribeirão Preto Vivarium of the Campus of the University of São Paulo and at the Vivarium of the Physiology Department of the Ribeirão Preto School of Medicine, respectively. The animals received food and water *ad libitum* and were submitted to 12-hour dark/light cycle (lights on at 6:00 a.m.), with controlled temperature (21 °C). They were kept in cages, in groups of four animals per cage, and after the experiments they were housed in individual cages.

## **PROTOCOL 1: CHEMICAL CHARACTERIZATION OF TMT AND NEUROETHOLOGICAL EVALUATION OF ITS EFFECTS IN WISTAR RATS**

### **Chemical Analysis**

Gas chromatography hyphenated to mass spectrometry is the first-choice technique for the volatile chemical signals analysis. Briefly, for this experimental design the Solid Phase Micro Extraction (SPME) was applied, in the Shimadzu gas chromatograph (Shimadzu, GCMS-QP2010 series C704643) coupled to the MS detector with electron ionization mode (70 eV). The column was DB-5MS Agilent technologies (30 m length x 0.25 mm internal diameter x 0.25 µm film thickness), with initial temperature of 40 °C that increased at a rate of 3 °C min<sup>-1</sup> to 115 °C. The injector temperature was 230 °C. The ionization source temperature was 250 °C and the interface was 260 °C. The mass spectrometer measurement was scanned from 40 to 350 m/z. The inlet mode was splitless and split in 10:1. The acquisition mode was initially by scanning (SCAN), then by Selected Ion Monitoring (SIM).

For the initial analysis of TMT, a solution of 500 µL in the concentration of 300 nMol was prepared in order to determine the chromatographic profile of this substance, that is, the ions, through the mass/charge ratio (m/z, Experiment 1). After, the TMT (500 µL at the concentration of 300 nMol) was placed into the chamber (49 cm height x 29.5 cm internal diameter), then the fiber (PDMS, 100 µL) was exposed to determine the time required to saturate the chamber, and in a second moment, to identify the withdrawal time of the odorant from the chamber, that is, time for desaturation (Experiment 2), ranging from 1-30 minutes. Immediately after adsorption by the SPME system, the fiber was inserted into the gas chromatograph injector. Then the analyte was thermally desorbed due to the high temperature of the injector (230 °C), and introduced into the column entry containing the stationary phase (wall coated with 5% diphenyldimethylsiloxane). The inert carrier gas (helium, mobile phase) entrained the vaporized sample through the column containing the stationary phase at a constant

flow of 1.1 millimeters/minute, where adsorption-inhibited movement (fixation) occurred between the two immiscible phases, mobile and stationary. Therefore, the separation of the mixture occurred with different rates of progression in the column, based on the physicochemical properties of TMT and in the stationary phase. At the end, the detector monitored the output flow and identified the compounds by the retention time, recording this signal graphically through the chromatogram (Collins, 1995).

In addition, it was verified if the modification of the fiber positioning inside the chamber could alter the TMT uptake, using the same methodology of the previous experiment, except for the positioning of the fiber (Experiment 3). Finally, Experiment 4 aimed to construct the analytical curve of the odoriferous saturation in the chamber at the different TMT concentrations (same protocol of Experiments 2 and 3), using 5  $\mu$ L of the dose of TMT to be tested. The calculations for the different concentrations were performed through mathematical algorithms. All experiments were performed in triplicates.

### **Behavioral Analysis**

*Naïve* male Wistar rats (N= 29), 280-300 g, were initially habituated by 3 consecutive days prior to the 1<sup>st</sup> experimental day. On the 4<sup>th</sup> day, the experiment day, the animals were randomly divided to one of five experimental groups according with the protocol illustrated in Figure 1B (previously prepared chamber). For each animal were used 5  $\mu$ L (Endres et al., 2005; Fendt and Endres, 2008; Galliot et al., 2012; Hacquemand et al., 2010) of the substance to be tested on a piece of filter paper (size: 4.0 cm x 3.6 cm), with the chamber completely closed for a specific period of time, according to the data obtained by the gas chromatography technique (see items 0 and 01). After this time, the animal was placed inside the chamber (Figure 1C) and its behavior was filmed during the whole period, for later analysis. After, the filter paper was removed and the exhaust system was activated to clean the atmosphere.

### ***Choice of TMT concentrations***

The choice of concentrations used was based on studies described in the literature, as indicated in Table 3. Five groups of animals were studied:

1. Saline (SAL) group (N= 6).
2. TMT 300 nMol group (N= 6).
3. TMT 1000 nMol group (N= 6).
4. TMT 10000 nMol group (N= 6).
5. Pure TMT group (N= 5).

### ***Duration of exposure to TMT***

Another important parameter that could interfere in the spatial and temporal information and consequently in the response generated is the duration of exposure to TMT. Literature data indicate times ranging from 5 to 60 minutes (in the majority of the cases), as shown in Table 4.

Understanding that the activation of fear-like neural circuits with the consequent anti-predatory responses must necessarily be rapid, in order to ensure the survival of the animal, we chose the shortest exposure duration of 5 minutes and 30 seconds.

In addition, another important point was the importation of TMT solution from the same source (PheroTech Inc., Canada), and similar to the one from published studies (Day et al., 2004; Dias Soares et al., 2003; Endres et al., 2005; Fendt et al., 2003; Galliot et al., 2012; Hacquemand et al., 2010; Holmes and Galea, 2002; Horii et al., 2010; Janitzky et al., 2015; Kobayakawa et al., 2007; Laska et al., 2005; Morrow et al., 2002, 2000; Nikaido and Nakashima, 2009; Redmond et al., 2002; Staples and McGregor, 2006; Thomas et al., 2006).

## **PROTOCOL 2: NEUROETHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF THE EFFECTS OF TMT IN ACUTE AUDIOGENIC SEIZURES IN WARS**

Twenty-eight male *WAR* rats, 250-350 g were divided into two groups: a group to evaluate the behavioral changes induced only by SAL/TMT olfactory stimulation, Non-Sound group (N= 12), and the other to evaluate the influence of SAL/TMT olfactory stimulation on the development of acute audiogenic seizures, Sound group (N= 16).

The animals of the Non-Sound group were exposed to SAL (SAL-NS group, N= 6), or pure TMT (TMT-NS group, N= 6), while the animals of Sound group were exposed to SAL (SAL-S, N= 8) or pure TMT (TMT-S, N= 8) with subsequent sound stimulation.

All animals had their behavior recorded for further behavioral analysis (item 3.3.).

### **Olfactory Exposure**

For olfactory stimulation, the animals were individually placed into a chamber (Figure 1C) and exposed to one of the odorants (SAL or pure TMT) by approximately 20 seconds. The olfactory stimulation was similar to Protocol 1 (item 0).

### **Sound Stimuli**

A tweeter was connected to the same chamber (Figure 1C) used for olfactory exposure and its sound reproduced a bell with sound frequency of 5000 to 20000 Hertz and intensity of 116-120 dB. When this sound was triggered, it remained on for 1 minute or until the presence of Tonic-Clonic Convulsion (TCC), for the Sound group. While the animals of Non-Sound group, only remained in the chamber during the equivalent time, for 2 minutes and 20 s, without the presence of sound.

---

## BEHAVIORAL ANALYSIS

All animals (Protocols 1-3) were filmed during the experimental procedure. Each videotaped material was analyzed by pairs of two authors (either P.D.P. or P.B.D. with J.A.C.O.).

Behavioral seizure (Protocol 2) was classified according with the categorized brainstem severity index (cSI; 1-8; Table 5 [Garcia-Cairasco et al., 1996 modified Rossetti et al., 2006]) and, latencies to WR (or RU) and TCC.

In addition, the neuroethological analysis was made in order to characterize the sum of behavioral sequences of similar periods. For this, the observation and the recording of each behavior were done, according to the temporal sequence of their appearance, based on a Behavioral Glossary (Supplementary Table 1). After the recording, the data collected were analyzed by means of the statistical software *Ethomatic* (Garcia-Cairasco et al., 1992).

After the analysis, the findings were then represented graphically in the program Power Point 2010 (Microsoft), in the form of flowcharts, which indicate the behavioral sequences recorded during the observation period. For this, the calibration standard of Figure 3A was used. In the flowcharts, each rectangle represents a behavior, the height symbolizes the frequency of occurrence; its base represents the average duration of each behavior during observation and the colors qualitatively identify behaviors classes/clusters.

For the Protocol 1 the neuroethological analysis was performed in only one period. The animals submitted to Protocol 2 were analyzed in three periods: PRE: 15 seconds before sound (time of olfactory stimulation); SOUND: during the sound stimulus; and POST: 1 minute after-sound stimulus.

## STATISTICAL ANALYSIS

Seizure severity was established using cSI (Garcia-Cairasco et al., 1996 modified Rossetti et al., 2006) and also analyzed by means of the latencies to 1<sup>st</sup> WR (or RU) and TCC. These behavioral statistical comparisons were done with the Mann Whitney test. Data were analyzed with GraphPad Prism version 5.0, and presented as means±standard error of the mean (±SEM). Significance level was set at  $p<0.05$ .

The neuroethological analysis performed provides (as cited) information concerning frequency of occurrence, duration of behavior and interactions between items, calculated through the construction of 1<sup>st</sup> order transition matrices, by the number of times the interactions occur (Calibration standard, Figure 3A), analysed by  $\chi^2$  test, with interactions statistically significant when  $\chi^2 \geq 3.84$ ,  $\log \chi^2 \geq 0.25$ ;  $p < 0.05$  (Garcia-Cairasco et al., 1992), represented by arrows between behaviors.

---

## RESULTS

### PROTOCOL 1: CHEMICAL CHARACTERIZATION OF TMT AND NEUROETHOLOGICAL EVALUATION OF ITS EFFECTS IN WISTAR RATS

#### CHEMICAL ANALYSIS

Initially, information on TMT composition was obtained by gas chromatography coupled to a mass spectrometer using the universal mode (SCAN), thus the main ions present in the sample were 88, 114 and 129, as indicated in Figure 2A. After obtaining this information, it was made a comparison with the mass spectra stored in the computer library, identifying the analyzed substance (Experiment 1).

To verify the time required for saturation and desaturation of the chamber to TMT, it was proposed an increase growing in the time of exposure of the fiber to TMT (see item 3.1.1.). Thus, it was possible to identify that 30 minutes is the time necessary to saturate the chamber internally, and also (same time) for its complete desaturation (Experiment 2). During the experiments, it could also be verified that the change in fiber positioning within the chamber did not alter the results obtained in the chromatography, indicating a homogeneous saturation (Experiment 3). Furthermore, the construction of the analytical curve with TMT (Figure 2B) allowed verifying the linearity of the TMT dilution, with the concomitant change of the internal concentration of the chamber. Therefore, the internal concentrations in the experiments (with different concentrations) were calculated using the chamber volume and the mass in  $\mu\text{g/mL}$  of TMT for each concentration, obtained the following values for 300 nMol, 1000 nMol, 10000 nMol and pure TMT, of 0.0000066  $\mu\text{g/mL}$  (ppm) or 0.0066 ppb, 0.00002  $\mu\text{g/mL}$  (ppm) or 0.02 ppb, 0.0002  $\mu\text{g/mL}$  (ppm) or 0.2 ppb, 0.165  $\mu\text{g/mL}$  (ppm) or 165 ppb, respectively. Moreover, it was possible to correlate the saturation in the chamber observed in the analytical curve with the values obtained in the mathematical algorithms, suggesting coherence between analyses.

#### BEHAVIORAL ANALYSIS

Thus, the different behavioral responses observed in the animals exposed to SAL (LEFT) versus TMT 300 nMol (RIGHT), are shown in Figure 3B. The orange ellipse highlight behaviors such as Arousal (AR), Excretion of Feces (EXC) and FR that together suggest the development of fear-like responses. In addition, it can be seen that the duration of Walking (WA) was longer in animals of the SAL group (the biggest rectangle base, LEFT) when compared to the TMT 300 nMol group (RIGHT, Figure 3B). In contrast, the duration of Immobility (IM) was longer in the TMT 300 nMol group (RIGHT, Figure 3B) when compared to the SAL group (LEFT, Figure 3B). These data were maintained for the other concentrations



of TMT, observed in Figure 3C and D. Thus, the animals exposed to TMT remained most of their time stopped when compared to control animals (LEFT, Figure 3B). In addition, it was possible to observe an interaction between WA and IM present in all concentrations of TMT (Figure 3), including the concentration of 300 nMol (RIGHT, Figure 3B) and absent in the SAL group (LEFT, Figure 3B).

Comparing the TMT induction in the fear-like responses at 300 nMol (Figure 3B) with 1000 nMol (Figure 3C), it was possible to observe fear-like behaviors, such as: AR, EXC and FR (orange ellipse) at 300 nMol (Figure 3B) and AR, EXC, FR and Yawning (YA, orange ellipse) at 1000 nMol (Figure 3C). This group also evidenced a reduction in the number of grooming behaviors (Grooming of Face [GRF]; Grooming of Head [GRH]; Grooming of Body right [GRR]; Licking of Claws [LIC]; Licking of Claws left, Hindlegs [LCL<sub>1</sub>] and Forelegs [LCL<sub>2</sub>]; Licking of Claws right, Forelegs [LCR<sub>2</sub>]; Scratching of Body left [SCRL]; Scratching of Body, right [SCRRL]; Figure 8C) compared to the group with the lowest concentration (GRF; Grooming of Genitals [GRG]; GRH; Grooming of Body left [GRL]; GRR; LCL<sub>1</sub>; Licking of Claws right, Hindlegs [LCR<sub>1</sub>]; LCR<sub>2</sub>; LIC; SCRRL; Figure 3B), in addition to a greater number of other behaviors (11 versus 10 [300 nMol]), as well as in the interactions between behavioral pairs (28 versus 18 [300 nMol]).

Both TMT 1000 nMol (LEFT) and TMT 10000 nMol (RIGHT) concentrations (Figure 8C) induced same fear-like behavioral responses, such as: AR, EXC, FR and YA (orange ellipse). In addition, in the TMT 10000 nMol group (RIGHT, Figure 3C) there was a reduction in the number of behaviors expressed (9 versus 11 [1000 nMol]), particularly of grooming behaviors (Grooming of Genitals, right [GRGR], GRF, GRH and LIC), as well as a lower number of interactions between the behaviors (21 versus 28 [1000 nMol]) compared to the TMT 1000 nMol group (LEFT, Figure 3C).

Lastly, it was possible to observe the same fear-associated behaviors such as AR, EXC, FR and YA (orange ellipse) in the TMT 10000 nMol (LEFT, Figure 3D) and pure TMT group (RIGHT, Figure 3D). In addition, the pure TMT group (RIGHT, Figure 8D) presented a lower frequency of interactions between (all) behaviors (18) compared to TMT 10000 nMol group (21, LEFT, Figure 3D). Although the animals exposed to TMT 10000 nMol (LEFT, Figure 8D) presented fewer grooming behaviors (4) with strong interactions, the pure TMT group (RIGHT, Figure 3D) had a lower number of interactions (fragmented sequences) between these behaviors (9).

In spite of the difficulties caused by the heterogeneity of results of fear-like behaviors (Figure 3B-D) for the different groups, it was possible to verify that with the increase of TMT

concentration, the animals presented a reduction of the motor activity and of the interactions between the different behaviors (Figure 3B-D).

In addition, the results indicated a discrete reduction of the grooming behavior present in the two highest concentrations (Figure 3D), as compared with others, corroborating the literature data that report the suppression of this behavior during fear.

Thus, the exposure to TMT, at 10000 nMol and at pure TMT triggered as expected, fear-like responses, associated to the reduction in motor activity (hypoactivity) and in grooming behavior, probably induced by the perception/detection of the predator odor/smell (see details in the Discussion Section). Therefore, pure TMT was chosen as the potential anticonvulsant concentration (for Protocol 2, see more details in 0. and 4.2.).

## **PROTOCOL 2: NEUROETHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF THE EFFECTS OF TMT IN ACUTE AUDIOGENIC SEIZURES IN WARS**

The evaluation of 1<sup>st</sup> WR (or RU [1]) and TCC latencies (2), as well as cSI (3) did not indicate significant statistical difference between SAL-S and TMT-S (Figure 4A). However, the TMT-S group had shorter latency for WR (1) in opposition to the longer latency for TCC (2), in other words, the animals ran earlier, but take longer to present TCC, which resulted in a decline of cSI in this group (3). This result allows us to infer that although these animals presented a lower threshold for the onset of the audiogenic seizures, they were more resistant to the evolution of convulsive behaviors.

In addition, we observed an increase in frequency and interactions between behaviors of the WR cluster in the TMT-S group (Figure 4E, yellow items) in relation to the SAL-S group (Figure 4D), indicating a possible anticonvulsant effect of TMT. It is worth mentioning that these behaviors are present, even when analyzed separately, in two subgroups: the ones with (Figure 4F) or without (Figure 4G) the Tonic-Clonic phase (red items). In animals that did not evolve to TCC (Figure 4G), the richness of interactions between the WR behaviors (yellow rectangles) demonstrates the permanence in a repetition cycle that normally precedes the Tonic-Clonic phase (red items), resulting in the occurrence of less severe seizures in these animals.

Thus, TMT triggered fear-like reactions (AR, EXC, FR, YA and WI, orange ellipse) in WAR controls (TMT-NS, Figure 4C [versus EXC and WI in SAL-NS group, orange ellipse, Figure 4B]) and modified the behavioral sequences of the seizures (SAL-S [Figure 4D] versus TMT-S [Figure 4E]), blocking them (Figure 4G) or delaying the occurrence of TCC (Figure 4E and F).

---

## DISCUSSION

Data from gas chromatography were important for subsequent protocols because established the concentrations in the chamber for the different concentrations of TMT, helped to identify that 30 minutes is the time required for saturation and desaturation of the chamber to TMT and indicated a homogeneous saturation inside of such chamber. TMT triggered fear-like reactions, associated the reduction in motor activity (hypoactivity) and in grooming behavior. The olfactory stimulation with pure TMT was chosen as the potential concentration, suppressive or inhibitor of epileptic seizures (Protocol 1). In addition, we verified that the TMT presents anticonvulsant properties, clearly shown by behavioral sequential analysis (neuroethology), which demonstrated an exacerbation of WR, as well as a decrease in the cSI in response to TMT (Protocol 2).

Gas chromatography established the chemical parameters, particularly internal control for a dose effect, involved in the induction of the TMT response. Moreover, our behavioral findings are in accordance with other studies suggesting that TMT can produce different fear-like reactions, among them AR, EXC, FR and YA, added to reduction in motor activity and in grooming behavior (non-defensive behavior), as indicated in Table 1. However, the results of the present study have not demonstrated exuberant response of FR (taken as one of the most relevant behavioral parameter of fear in rodents), although until this moment, there is not consistent agreement in the literature given the wide variety of behavioral effects induced by TMT. In this context, studies involving TMT-induced behaviors are important for broadening or to delimit the scope of behaviors involved in defensive responses (Rosen et al., 2015), thus contributing to the study of the neurobiology of fear.

Some possible explanations for this heterogeneous response found in the different studies that used TMT, as a fear-like inducer, could be variations in applied methodologies, such as those indicated in Table 6. Of these items, two deserve to be highlighted in this discussion as a possible explanation for the discrete fear-like responses induced by TMT (shown in Figures 3-5). It is described that different strains of rats may have varied responses when subjected to the fear induction situation, whereas Wistar rats are described as the less responsive strain for the induction of fear-like behaviors, when compared to Sprague Dawley strain, for example (Dias Soares et al., 2003; Endres et al., 2005; Fendt and Endres, 2008; Hacquemand et al., 2013; Rosen et al., 2006; Staples and McGregor, 2006). In addition, the characteristics of the chamber can be a facilitator or not of the number of fear-like behaviors expressed by the animal, including size of chamber and simple or double compartment, and still, the context of odor presentation, as well as the method of odor presentation and the

presence or absence of ventilation, can also influence the fear response (more detail Table 6 [Fendt and Endres, 2008; Rampin et al., 2018]).

As previously cited, the FR was not exuberantly elicited. This can be also explained by low temporal and spatial prediction that urine and feces of predator induces in their preys, considering that these are durable odors and that in the majority of cases indicate that the predator was present (Blanchard et al., 2003; Blanchard et al., 2003; Fendt et al., 2005; Morrow et al., 2000; Rosen et al., 2008; Wallace and Rosen, 2000). In contrast, smells from smear/collar/fur or the presence of the animal itself indicate a feasible risk, imminent, and therefore real (Blanchard et al., 2003; Blanchard et al., 2003; Blanchard et al., 2001).

A range of studies in the last years investigated the neuroanatomy of the response to predator odors, such as TMT. Some of these studies suggested that TMT could act more like an aversive odor (similarly to TOL) by trigeminal system activation (Apfelbach et al., 2005; Blanchard et al., 2003; Day et al., 2004; Fendt et al., 2005; McGregor et al., 2002). While other studies indicated that both the trigeminal and olfactory systems could be activated at high concentration of TMT (Boyle et al., 2007; Brand, 2006). Hacquemand et al., (2010) demonstrated that zinc sulfate ( $ZnSO_4$ ) treatment, an approach responsible for eliciting transitory anosmia in olfactory epithelium, reduces avoidance and FR with both natural fox feces and TMT exposures. Consistent with these results, another study indicated that the ablation of the olfactory bulb alters the effect of TMT, but not of the butyric acid (aversive odor [Ayers et al., 2013]). Moreover, Zibrowski and Vanderwolf (1997) demonstrated that components of anal gland secretions, such as TMT, induced bursts of rhythmical fast waves in the olfactory bulb and pyriform cortex, related specifically to olfaction. Collectively, the authors conclude that fear induced by TMT primarily activates the olfactory system (Ayers et al., 2013; Hacquemand et al., 2010; Kobayakawa et al., 2007; Zibrowski and Vanderwolf, 1997), though the trigeminal system can be also activated, depending on concentration (Fendt and Endres, 2008; Galliot et al., 2012; Hacquemand et al., 2013, 2010).

Thus, neural processing of TMT starts with its entry on the nasal cavity through inspiration and subsequently interaction with different receptors, randomly distributed within the zones of the posterior olfactory epithelium, activating such receptors present in the olfactory neurons and depolarizing them by means of a second messenger cascade. The axons of these olfactory neurons - corresponding to the first pair of cranial nerve, the Olfactory Nerve – make synapses with the tufted or mitral cells of the olfactory glomeruli present in the Olfactory Bulb (Arisi et al., 2012; Linnen et al., 2012; Su et al., 2009). From the Olfactory Bulb leave extra-thalamic projections to cortical and subcortical areas that then will end the processing of the

odoriferous information by the brain. These include: (A) the Piriform Cortex, considered the main olfactory region, (B) the Amygdala, that receives direct and indirect projections from areas activated by TMT and which, at the end, triggers an emotional meaning to the inhaled odorants, as well as for (C) the Hippocampus that receives indirect projections, but appears to be an important structure in emotional behavior, especially in the processing of contextual fear with TMT (Takahashi, 2014). In this context, the activation of the various brain areas (Table 2), induce the expression of different behaviors, summarized in Table 1.

As mentioned, olfactory auras have been described since Gowers (1881), while some previous studies have shown that olfactory stimuli may prevent the occurrence of epileptic seizures (Betts, 2003; Cruz et al., 2003; Delfino-Pereira et al., 2018; Ebert and Löscher, 2000; Efron, 1957, 1956; Gowers, 1881; Jaseja, 2010, 2008; Lunardi et al., 2016; Valentine et al., 2005; Wood et al., 1984). In particular, Ebert and Löscher (2000) described that most of their experimental rats, even with electrical stimulation 20% above the threshold to trigger seizures, became seizure free by exposure to TOL. In our own experience, the olfactory stimulation also with TOL reduced acute and chronic (kindled) audiogenic seizures in animals of the *WAR* strain (Delfino-Pereira et al., 2018).

Interestingly, our data indicated that pure TMT modified behavioral sequential, demonstrating anticonvulsant properties observed by increase in frequency and interactions between behaviors of the *WR* cluster in the TMT-S group (Figure 4E, yellow items), associated to reduction of tonic-clonic behaviors (red items), resulting in the occurrence of less severe seizures, in comparison to the *SAL-S* group (Figure 4D). Thus, our quite clear results suggest that TMT, a chemical substance with biological relevance, inductor of fear-like (“predator smell”) behaviors inclusive in *WAR*, interfered in the seizure processes (current data), possibly by competition of systems or antagonism circuit, functioning as a countermeasure in seizure activity, given the property of activation of the same cerebral region (EBERT; LÖSCHER, 2000; EFRON, 1956; JASEJA, 2008). In fact, the modulation (suppression in the current case) of epileptic activity by sensory olfactory activity may strongly involve brain structures such as Piriform Cortex, Amygdala and Hippocampus, previously implicated in the processing of TMT (see Table 2). However, the neurophysiological mechanisms to control (or induction) epileptic seizures with odors it is still insufficiently known (Delfino-Pereira et al., 2018; Lunardi et al., 2016).

Taken together, our study proposed to carefully (1) investigate the TMT chemical parameters in diverse concentrations (by setting a control), (2) to analyze all the behavioral items expressed by animals, by means of neuroethology, in order to verify the appropriate

concentration of TMT that would produce fear-like and anticonvulsant behavioral effects in different strains.

In particular, a highly controversial issue is whether TMT is a kairomone capable of induce conditioned fear response to the context (Endres and Fendt, 2007; Rosen, 2004; Rosen et al., 2015, 2008, 2006), in combination with the expression of innate fear behaviors, or is simply an aversive molecule (Blanchard et al., 2003; McGregor et al., 2002; Staples and McGregor, 2006; Wallace and Rosen, 2000). In this sense, as future perspective, we are investigating the biological meaning of TMT as context conditioned fear-inducer (neuro[eto]biological basis of this processing) dependent on the strain, protocol (including route of administration) and chamber configuration.

Obviously, the study the neurobiological basis of TMT needs more detailed knowledge, in order to identify the neural circuit of the defensive strategy triggered by TMT, that in addition to induce fear can concomitantly influence and modify complex seizure processes. The next subsequent and logical step will be to evaluate the anticonvulsant effect of the TMT in the Amygdala Rapid Kindling, a model of TLE (Foresti et al., 2008). We already got preliminary promising data with clear behavioral and EEGraphic blockade of limbic seizures with exposure to TMT, in already kindled rats (Unpublished results, Delfino-Pereira et al., 2017).

## **CONCLUSION**

TMT can unconditionally elicit fear-like behaviors in Wistar and WAR rats and can be utilized in a quantifiable and controllable way. Moreover, our results suggest a possible antagonism or competition between "fear-related" and "seizure-related" networks.

## **CONFLICT OF INTERESTS**

The authors declare no conflicts of interest.

## **FUNDING**

This work was supported by the FAPESP (18637-2, 2012; 18563-9, 2012; 50261-4, 2007), CNPq (305883, 2014-3), FAPESP-Cinapce (56447-7, 2005), CAPES, PROEX-Physiology and PROEX-Neurology, FAEPA. NGC, NPL and ACT hold CNPq Investigators Fellowship.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank all members of the Neurophysiology and Experimental Neuroethology Laboratory (LNNE) at the FMRP-USP and the Members of the *Epilepsies with External Modification of Ictogenesis (EpExMo)* Project.

## REFERENCES

- Acharya, V., Acharya, J., Lüders, H., 1998. Olfactory epileptic auras. *Neurology* 51, 56–61.
- Apfelbach, R., Blanchard, C.D., Blanchard, R.J., Hayes, R.A., McGregor, I.S., 2005. The effects of predator odors in mammalian prey species: a review of field and laboratory studies. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 29, 1123–44. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.05.005>
- Apfelbach, R., Parsons, M.H., Soini, H.A., Novotny, M.V., 2015. Are single odorous components of a predator sufficient to elicit defensive behaviors in prey species? *Frontiers in Neuroscience* 9. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00263>
- Arisi, G.M., Foresti, M.L., Mukherjee, S., Shapiro, L.A., 2012. The role of olfactory stimulus in adult mammalian neurogenesis. *Behavioural Brain Research* 227, 356–362. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.03.050>
- Asok, A., Ayers, L.W., Awoyemi, B., Schulkin, J., Rosen, J.B., 2013. Immediate early gene and neuropeptide expression following exposure to the predator odor 2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline (TMT). *Behav. Brain Res.* 248, 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.03.047>
- Ayers, L.W., Asok, A., Heyward, F.D., Rosen, J.B., 2013. Freezing to the predator odor 2,4,5 dihydro 2,5 trimethylthiazoline (TMT) is disrupted by olfactory bulb removal but not trigeminal deafferentation. *Behavioural Brain Research* 253, 54–59. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.06.034>
- Bertram, E., 2007. The Relevance of Kindling for Human Epilepsy. *Epilepsia* 48, 65–74. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2007.01068.x>
- Betts, T., 2003. Use of aromatherapy (with or without hypnosis) in the treatment of intractable epilepsy- a two-year follow-up study. *Seizure* 12, 534–538.
- Blanchard, D.C., Blanchard, R.J., Rosen, J., 2008. Olfaction and defense. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 32, 1207–1208. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2008.07.003>
- Blanchard, D.Caroline, Griebel, G., Blanchard, R.J., 2003. Conditioning and residual emotionality effects of predator stimuli: some reflections on stress and emotion. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 27, 1177–1185. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2003.09.012>
- Blanchard, D. Caroline, Markham, C., Yang, M., Hubbard, D., Madarang, E., Blanchard, R.J., 2003. Failure to produce conditioning with low-dose trimethylthiazoline or cat feces as unconditioned stimuli. *Behavioral Neuroscience* 117, 360–368. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.117.2.360>

- Blanchard, R.J., Yang, M., Li, C.I., Gervacio, A., Blanchard, D.C., 2001. Cue and context conditioning of defensive behaviors to cat odor stimuli. *Neurosci Biobehav Rev* 25, 587–595.
- Boyle, J.A., Frasnelli, J., Gerber, J., Heinke, M., Hummel, T., 2007. Cross-modal integration of intranasal stimuli: A functional magnetic resonance imaging study. *Neuroscience* 149, 223–231. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.06.045>
- Brand, G., 2006. Olfactory/trigeminal interactions in nasal chemoreception. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 30, 908–917. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2006.01.002>
- Brechbuhl, J., Moine, F., Klaey, M., Nenniger-Tosato, M., Hurni, N., Sporkert, F., Giroud, C., Broillet, M.-C., 2013. Mouse alarm pheromone shares structural similarity with predator scents. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 4762–4767. <https://doi.org/10.1073/pnas.1214249110>
- Canteras, N.S., Pavesi, E., Carobrez, A.P., 2015. Olfactory instruction for fear: neural system analysis. *Frontiers in Neuroscience* 9. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00276>
- Chen, C., Shih, Y.-H., Yen, D.-J., Lirng, J.-F., Guo, Y.-C., Yu, H.-Y., Yiu, C.-H., 2003. Olfactory auras in patients with temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 44, 257–260.
- Collins, C., 1995. *Introducao a metodos cromatograficos*. Editora da UNICAMP, Campinas.
- Cruz, S.L., Gauthereau, M.Y., Camacho-Muñoz, C., López-Rubalcava, C., Balster, R.L., 2003. Effects of inhaled toluene and 1,1,1-trichloroethane on seizures and death produced by N-methyl-D-aspartic acid in mice. *Behav. Brain Res.* 140, 195–202.
- Cunha, A.O.S., de Oliveira, J. a. C., Almeida, S.S., Garcia-Cairasco, N., Leão, R.M., 2015. Inhibition of long-term potentiation in the schaffer-CA1 pathway by repetitive high-intensity sound stimulation. *Neuroscience* 310, 114–127. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.09.040>
- Day, H.E.W., Masini, C.V., Campeau, S., 2004. The pattern of brain c-fos mRNA induced by a component of fox odor, 2,5-dihydro-2,4,5-Trimethylthiazoline (TMT), in rats, suggests both systemic and processive stress characteristics. *Brain Research* 1025, 139–151. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.07.079>
- Delfino-Pereira, P., Bertti-Dutra, P., de Lima Umeoka, E.H., de Oliveira, J.A.C., Santos, V.R., Fernandes, A., Marroni, S.S., Del Vecchio, F., Garcia-Cairasco, N., 2018. Intense olfactory stimulation blocks seizures in an experimental model of epilepsy. *Epilepsy & Behavior* 79, 213–224. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2017.12.003>
- Derby, C.D., Aggio, J.F., 2011. The Neuroecology of Chemical Defenses. *Integrative and Comparative Biology* 51, 771–780. <https://doi.org/10.1093/icb/icr063>
- Dias Soares, D., Fernandez, F., Aguerre, S., Foury, A., Mormède, P., Chaouloff, F., 2003. Fox odour affects corticosterone release but not hippocampal serotonin reuptake and open field behaviour in rats. *Brain Res.* 961, 166–170.
- Doegito, E., Fessi, H., Appel, M., Puisieux, F., Bolard, J., Devissaguet, J., 1994. New Techniques for Preparing Submicronic Emulsions - Application to Amphotericin-B. *STP Pharma Sci.* 4, 155–162.



- Doretto, M.C., Cortes-de-Oliveira, J.A., Rossetti, F., Garcia-Cairasco, N., 2009. Role of the superior colliculus in the expression of acute and kindled audiogenic seizures in Wistar audiogenic rats. *Epilepsia* 50, 2563–2574. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2009.02164.x>
- Doretto, M.C., Fonseca, C.G., Lôbo, R.B., Terra, V.C., Oliveira, J.A.C., Garcia-Cairasco, N., 2003. Quantitative study of the response to genetic selection of the Wistar audiogenic rat strain (WAR). *Behav. Genet.* 33, 33–42.
- Dutra Moraes, M.F., Galvis-Alonso, O.Y., Garcia-Cairasco, N., 2000. Audiogenic kindling in the Wistar rat: a potential model for recruitment of limbic structures. *Epilepsy Res.* 39, 251–259.
- Ebert, U., Löscher, W., 2000. Strong olfactory stimulation reduces seizure susceptibility in amygdala-kindled rats. *Neurosci. Lett.* 287, 199–202.
- Ebert, U., Löscher, W., 1995. Differences in mossy fibre sprouting during conventional and rapid amygdala kindling of the rat. *Neurosci. Lett.* 190, 199–202.
- Efron, R., 1957. The conditioned inhibition of uncinata fits. *Brain* 80, 251–262.
- Efron, R., 1956. The effect of olfactory stimuli in arresting uncinata fits. *Brain* 79, 267–281.
- Endres, T., Apfelbach, R., Fendt, M., 2005. Behavioral Changes Induced in Rats by Exposure to Trimethylthiazoline, a Component of Fox Odor. *Behavioral Neuroscience* 119, 1004–1010. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.119.4.1004>
- Endres, T., Fendt, M., 2007. Conditioned behavioral responses to a context paired with the predator odor trimethylthiazoline. *Behavioral Neuroscience* 121, 594–601. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.121.3.594>
- Fendt, M., Endres, T., 2008. 2,3,5-Trimethyl-3-thiazoline (TMT), a component of fox odor – Just repugnant or really fear-inducing? *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 32, 1259–1266. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2008.05.010>
- Fendt, M., Endres, T., Apfelbach, R., 2003. Temporary inactivation of the bed nucleus of the stria terminalis but not of the amygdala blocks freezing induced by trimethylthiazoline, a component of fox feces. *J. Neurosci.* 23, 23–28.
- Fendt, M., Endres, T., Lowry, C.A., Apfelbach, R., McGregor, I.S., 2005. TMT-induced autonomic and behavioral changes and the neural basis of its processing. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 29, 1145–1156. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.04.018>
- Fisher, R.S., 1989. Animal models of the epilepsies. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 14, 245–278.
- Foresti, M.L., Arisi, G.M., Fernandes, A., Tilelli, C.Q., Garcia-Cairasco, N., 2008. Chelatable zinc modulates excitability and seizure duration in the amygdala rapid kindling model. *Epilepsy Research* 79, 166–172. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2008.02.004>
- Fortes-Marco, L., Lanuza, E., Martínez-García, F., Agustín-Pavón, C., 2015. Avoidance and contextual learning induced by a kairomone, a pheromone and a common odorant in female CD1 mice. *Front Neurosci* 9, 336. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00336>

- Fuster, J.M., 1997. Network memory. *Trends in Neurosciences* 20, 451–459. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(97\)01128-4](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(97)01128-4)
- Galliot, E., Laurent, L., Hacquemand, R., Pourié, G., Millot, J.-L., 2012. Fear-like behavioral responses in mice in different odorant environments: Trigeminal versus olfactory mediation under low doses. *Behav. Processes* 90, 161–166. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2012.01.002>
- Galvis-Alonso, O.Y., Cortes De Oliveira, J.A., Garcia-Cairasco, N., 2004. Limbic epileptogenicity, cell loss and axonal reorganization induced by audiogenic and amygdala kindling in wistar audiogenic rats (WAR strain). *Neuroscience* 125, 787–802. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.01.042>
- Garcia-Cairasco, N., 2002. A critical review on the participation of inferior colliculus in acoustic-motor and acoustic-limbic networks involved in the expression of acute and kindled audiogenic seizures. *Hear. Res.* 168, 208–222.
- Garcia-Cairasco, N., Doretto, M.C., Prado, R.P., Jorge, B.P., Terra, V.C., Oliveira, J.A., 1992. New insights into behavioral evaluation of audiogenic seizures. A comparison of two ethological methods. *Behavioural brain research* 48, 49–56.
- Garcia-Cairasco, N., Terra, V.C., Doretto, M.C., 1993. Midbrain substrates of audiogenic seizures in rats. *Behav. Brain Res.* 58, 57–67.
- Garcia-Cairasco, N., Umeoka, E.H.L., Cortes de Oliveira, J.A., 2017. The Wistar Audiogenic Rat (WAR) strain and its contributions to epileptology and related comorbidities: History and perspectives. *Epilepsy & Behavior, Genetic and Reflex Epilepsies, Audiogenic Seizures and Strains: From Experimental Models to the Clinic* 71, Part B, 250–273. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2017.04.001>
- Garcia-Cairasco, N., Wakamatsu, H., Oliveira, J.A., Gomes, E.L., Del Bel, E.A., Mello, L.E., 1996. Neuroethological and morphological (Neo-Timm staining) correlates of limbic recruitment during the development of audiogenic kindling in seizure susceptible Wistar rats. *Epilepsy Res.* 26, 177–192.
- Goddard, G.V., 1967. Development of epileptic seizures through brain stimulation at low intensity. *Nature* 214, 1020–1021.
- Goddard, G.V., McIntyre, D.C., Leech, C.K., 1969. A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. *Exp. Neurol.* 25, 295–330.
- Gowers, W.R. (William R., 1881. *Epilepsy and other chronic convulsive diseases: their causes, symptoms, & treatment.* London: Churchill.
- Gross, C.T., Canteras, N.S., 2012. The many paths to fear. *Nature Reviews Neuroscience* 13, 651–658. <https://doi.org/10.1038/nrn3301>
- Hacquemand, R., Choffat, N., Jacquot, L., Brand, G., 2013. Comparison between low doses of TMT and cat odor exposure in anxiety- and fear-related behaviors in mice. *Behavioural Brain Research* 238, 227–231. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.10.014>
- Hacquemand, R., Jacquot, L., Brand, G., 2010. Comparative Fear-Related Behaviors to Predator Odors (TMT and Natural Fox Feces) before and after Intranasal ZnSO<sub>4</sub> Treatment in Mice. *Front Behav Neurosci* 4, 188. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2010.00188>

- Holmes, M.M., Galea, L.A.M., 2002. Defensive behavior and hippocampal cell proliferation: differential modulation by naltrexone during stress. *Behav. Neurosci.* 116, 160–168.
- Hong, S.-C., Holbrook, E.H., Leopold, D.A., Hummel, T., 2012. Distorted olfactory perception: a systematic review. *Acta Otolaryngol.* 132 Suppl 1, S27–31. <https://doi.org/10.3109/00016489.2012.659759>
- Horii, Y., Nikaido, Y., Nagai, K., Nakashima, T., 2010. Exposure to TMT odor affects adrenal sympathetic nerve activity and behavioral consequences in rats. *Behavioural Brain Research* 214, 317–322. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.05.047>
- Hughlings-Jackson, J., 1888. On a particular variety of epilepsy (“intellectual aura”), one case with symptoms of organic brain disease. *Brain* 11, 179–207. <https://doi.org/10.1093/brain/11.2.179>
- Janitzky, K., D’Hanis, W., Kröber, A., Schwegler, H., 2015. TMT predator odor activated neural circuit in C57BL/6J mice indicates TMT-stress as a suitable model for uncontrollable intense stress. *Brain Research* 1599, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.12.030>
- Jaseja, H., 2010. Application of “shoe-smell” in controlling epileptic attacks: its origin. *Med. Hypotheses* 74, 210. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2009.07.026>
- Jaseja, H., 2008. Scientific basis behind traditional practice of application of “shoe-smell” in controlling epileptic seizures in the eastern countries. *Clin Neurol Neurosurg* 110, 535–538. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2008.02.006>
- Kobayakawa, K., Kobayakawa, R., Matsumoto, H., Oka, Y., Imai, T., Ikawa, M., Okabe, M., Ikeda, T., Itohara, S., Kikusui, T., Mori, K., Sakano, H., 2007. Innate versus learned odour processing in the mouse olfactory bulb. *Nature* 450, 503–508. <https://doi.org/10.1038/nature06281>
- Laska, M., Fendt, M., Wieser, A., Endres, T., Hernandezsalazar, L., Apfelbach, R., 2005. Detecting danger—or just another odorant? Olfactory sensitivity for the fox odor component 2,4,5-trimethylthiazoline in four species of mammals. *Physiology & Behavior* 84, 211–215. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.11.006>
- Linnen, A.-M., Ellenbogen, M.A., Cardoso, C., Jooper, R., 2012. Intranasal oxytocin and salivary cortisol concentrations during social rejection in university students. *Stress* 15, 393–402. <https://doi.org/10.3109/10253890.2011.631154>
- Loscher, W., Brandt, C., 2010. Prevention or Modification of Epileptogenesis after Brain Insults: Experimental Approaches and Translational Research. *Pharmacological Reviews* 62, 668–700. <https://doi.org/10.1124/pr.110.003046>
- Löscher, W., Ebert, U., 1996. The role of the piriform cortex in kindling. *Prog. Neurobiol.* 50, 427–481.
- Löscher, W., Ebert, U., Wahnschaffe, U., Rundfeldt, C., 1995. Susceptibility of different cell layers of the anterior and posterior part of the piriform cortex to electrical stimulation and kindling: comparison with the basolateral amygdala and “area tempestas.” *Neuroscience* 66, 265–276.
- Lothman, E.W., Hatlelid, J.M., Zorumski, C.F., Conry, J.A., Moon, P.F., Perlin, J.B., 1985. Kindling with rapidly recurring hippocampal seizures. *Brain Res.* 360, 83–91.

- Lunardi, M.S., Lin, K., Mameniškienė, R., Beniczky, S., Bogacz, A., Braga, P., Guarana, M.S.B., Yacubian, E.M.T., Samaitienė, R., Baykan, B., Hummel, T., Wolf, P., 2016. Olfactory stimulation induces delayed responses in epilepsy. *Epilepsy & behavior: E&B* 61, 90–96. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2016.05.022>
- Marescaux, C., Vergnes, M., Kiesmann, M., Depaulis, A., Micheletti, G., Warter, J.M., 1987. Kindling of audiogenic seizures in Wistar rats: An EEG study. *Experimental Neurology* 97, 160–168. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(87\)90290-1](https://doi.org/10.1016/0014-4886(87)90290-1)
- McGregor, I.S., Schrama, L., Ambermoon, P., Dielenberg, R.A., 2002. Not all “predator odours” are equal: cat odour but not 2,4,5 trimethylthiazoline (TMT; fox odour) elicits specific defensive behaviours in rats. *Behav. Brain Res.* 129, 1–16.
- McNamara, J.O., Byrne, M.C., Dasheiff, R.M., Fitz, J.G., 1980. The kindling model of epilepsy: a review. *Prog. Neurobiol.* 15, 139–159.
- Moberly, A.H., Schreck, M., Bhattarai, J.P., Zweifel, L.S., Luo, W., Ma, M., 2018. Olfactory inputs modulate respiration-related rhythmic activity in the prefrontal cortex and freezing behavior. *Nat Commun* 9, 1528. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03988-1>
- Morrow, B.A., Elsworth, J.D., Roth, R.H., 2002. Fear-like biochemical and behavioral responses in rats to the predator odor, TMT, are dependent on the exposure environment. *Synapse* 46, 11–18. <https://doi.org/10.1002/syn.10109>
- Morrow, B.A., Redmond, A.J., Roth, R.H., Elsworth, J.D., 2000. The predator odor, TMT, displays a unique, stress-like pattern of dopaminergic and endocrinological activation in the rat. *Brain Res.* 864, 146–151.
- Naritoku, D.K., Mecozzi, L.B., Aiello, M.T., Faingold, C.L., 1992. Repetition of audiogenic seizures in genetically epilepsy-prone rats induces cortical epileptiform activity and additional seizure behaviors. *Exp. Neurol.* 115, 317–324.
- Nikaido, Y., Nakashima, T., 2009. Effects of environmental novelty on fear-related behavior and stress responses of rats to emotionally relevant odors. *Behavioural Brain Research* 199, 241–246. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.11.043>
- Pinel, J.P.J., Rovner, L.I., 1978. Experimental epileptogenesis: Kindling-induced epilepsy in rats. *Experimental Neurology* 58, 190–202. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(78\)90133-4](https://doi.org/10.1016/0014-4886(78)90133-4)
- Racine R J, 1972. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Clin Neurophysiol* 32(3), 281–294.
- Rampin, O., Jérôme, N., Saint-Albin, A., Ouali, C., Boué, F., Meunier, N., Nielsen, B.L., 2018. Where is the TMT? GC-MS analyses of fox feces and behavioral responses of rats to fear-inducing odors. *Chemical Senses* 43, 105–115. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjx075>
- Redmond, A.J., Morrow, B.A., Elsworth, J.D., Roth, R.H., 2002. Selective activation of the A10, but not A9, dopamine neurons in the rat by the predator odor, 2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline. *Neurosci. Lett.* 328, 209–212.

- Romcy-Pereira, R.N., Garcia-Cairasco, N., 2003. Hippocampal cell proliferation and epileptogenesis after audiogenic kindling are not accompanied by mossy fiber sprouting or Fluoro-Jade staining. *Neuroscience* 119, 533–546.
- Rosen, J.B., 2004. The Neurobiology of Conditioned and Unconditioned Fear: A Neurobehavioral System Analysis of the Amygdala. *Behavioral and Cognitive Neuroscience Reviews* 3, 23–41. <https://doi.org/10.1177/1534582304265945>
- Rosen, J.B., Asok, A., Chakraborty, T., 2015. The smell of fear: innate threat of 2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline, a single molecule component of a predator odor. *Frontiers in neuroscience* 9, 292. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00292>
- Rosen, J.B., Pagani, J.H., Rolla, K.L.G., Davis, C., 2008. Analysis of behavioral constraints and the neuroanatomy of fear to the predator odor trimethylthiazoline: A model for animal phobias. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 32, 1267–1276. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2008.05.006>
- Rosen, J.B., West, E.A., Donley, M.P., 2006. Not all rat strains are equal: differential unconditioned fear responses to the synthetic fox odor 2,4,5-trimethylthiazoline in three outbred rat strains. *Behavioral neuroscience* 120, 290–7. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.120.2.290>
- Rossetti, F., Rodrigues, M.C.A., de Oliveira, J.A.C., Garcia-Cairasco, N., 2006. EEG wavelet analyses of the striatum-substantia nigra pars reticulata-superior colliculus circuitry: audiogenic seizures and anticonvulsant drug administration in Wistar audiogenic rats (War strain). *Epilepsy research* 72, 192–208. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2006.08.001>
- Staples, L.G., McGregor, I.S., 2006. Defensive responses of Wistar and Sprague-Dawley rats to cat odour and TMT. *Behavioural Brain Research* 172, 351–354. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.04.011>
- Su, C.-Y., Menuz, K., Carlson, J.R., 2009. Olfactory Perception: Receptors, Cells, and Circuits. *Cell* 139, 45–59. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.015>
- Takahashi, L.K., 2014. Olfactory systems and neural circuits that modulate predator odor fear. *Frontiers in behavioral neuroscience* 8, 72. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00072>
- Thomas, R., Urban, J., Peterson, D., 2006. Acute exposure to predator odor elicits a robust increase in corticosterone and a decrease in activity without altering proliferation in the adult rat hippocampus. *Experimental Neurology* 201, 308–315. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2006.04.010>
- Tsutsui, J., Terra, V.C., Oliveira, J.A., Garcia-Cairasco, N., 1992. Neuroethological evaluation of audiogenic seizures and audiogenic-like seizures induced by microinjection of bicuculline into the inferior colliculus. I. Effects of midcollicular knife cuts. *Behav. Brain Res.* 52, 7–17.
- Valentine, P.A., Fremit, S.L., Teskey, G.C., 2005. Sensory stimulation reduces seizure severity but not afterdischarge duration of partial seizures kindled in the hippocampus at threshold intensities. *Neurosci. Lett.* 388, 33–38. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.06.028>
- Vernet-Maury, E., 1980. Trimethyl-thiazoline in fox feces: a natural alarming substance for the rat., in: *Olfaction Tast.* Van der Starre H, Ed., p. 407.

Vernet-Maury, E., Polak, E.H., Demael, A., 1984. Structure-activity relationship of stress-inducing odorants in the rat. *Journal of Chemical Ecology* 10, 1007–1018. <https://doi.org/10.1007/BF00987509>

Wallace, K.J., Rosen, J.B., 2001. Neurotoxic lesions of the lateral nucleus of the amygdala decrease conditioned fear but not unconditioned fear of a predator odor: comparison with electrolytic lesions. *J. Neurosci.* 21, 3619–3627.

Wallace, K.J., Rosen, J.B., 2000. Predator odor as an unconditioned fear stimulus in rats: Elicitation of freezing by trimethylthiazoline, a component of fox feces. *Behavioral Neuroscience* 114, 912–922. <https://doi.org/10.1037//0735-7044.114.5.912>

Wood, R.W., Coleman, J.B., Schuler, R., Cox, C., 1984. Anticonvulsant and antipunishment effects of toluene. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 230, 407–412.

Zibrowski, E.M., Vanderwolf, C.H., 1997. Oscillatory fast wave activity in the rat pyriform cortex: relations to olfaction and behavior. *Brain Res.* 766, 39–49.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 6.** (A) Chemical structure of 2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline (TMT, Molecular Formula  $C_6H_{11}NS$ ; Molecular Weight 129.221 g/mol). (B) Experimental design from Protocol 1: summary scheme of animal groups and experimental procedure. (C) Chamber used during Protocols 1 and 2. In (A) Chamber, (B) Control System and (C) Exhaustion System (idealized by our group at LNNE).

**Figure 7.** (A) TMT mass spectrum (values given in m/z). In the X-axis is represented the retention time, and in Y-axis the concentration of the ions. (B) Chromatographic curve of internal chamber concentration at different doses of TMT (TMT 300 nMol - brown; TMT 1000 nMol - blue; TMT 10000 nMol - pink and pure TMT - black): qualitative representation of the internal concentration of the chamber. X-axis indicates the retention time, and Y-axis the total concentration of ions for each dose. Parameters used: volume of 5  $\mu$ L in the concentration to be tested of TMT, with SIM acquisition mode and Split injection.

**Figure 8.** (A) Flowchart calibration pattern (Garcia-Cairasco et al., 1992). (B) Flowchart of behavioral response induced by chamber saturation of (LEFT) SAL (0.9%) or (RIGHT) TMT 300 nMol group. In these cases, different behaviors can be observed such as: AR, FR and EXC (orange ellipses). There was a change in the duration of WA and IM (blue ellipses), as well as in the statistical interaction (arrow) between them (blue ellipses) in the TMT 300 nMol group. (C) Flowchart of behavioral response induced by TMT at (LEFT) 1000 nMol and (RIGHT) 10000 nMol, with the presence of fear-associated behaviors: AR, EXC, FR and YA (orange ellipses). And also reduction in the number of behaviors expressed by TMT at 10000 nMol group compared the other concentrations, as well as the lower number of statistical interactions among dyads. (D) Flowchart of behavioral responses induced by TMT at (LEFT) 10000 nMol and (RIGHT) pure. Fear-associated behaviors detected were: AR, EXC, FR and YA (orange ellipses). In addition, the pure TMT group presented a lower frequency of interactions between (all) behaviors than the TMT 10000 nMol group. Finally, animals exposed to TMT 10000 nMol presented fewer grooming behaviors, such as: GRF, GRH, LIC and GRRR. Acronyms (Supplementary Table 1).

**Figure 9.** Influence of TMT in the expression of acute audiogenic seizures. (A) Evaluation of 1<sup>st</sup> RU (or WR [A]) and TCC latencies (B), as well as of cSI (C) indicating the absence of differences between SAL-S and TMT-S, Mann Whitney test,  $p > 0.05$ . (B-G) Neuroethological evidences of the anticonvulsant effect of TMT in acute audiogenic seizures. Different behavioral responses of fear were induced by TMT-NS versus SAL-NS, such as: AR, EXC, FR, WI and YA. The possible anticonvulsant effect is reinforced by the increased frequency and interactions between the WR behaviors (RU, GL, GR, JU, AF, yellow rectangles and ellipse [cluster]) in TMT-S (D) versus SAL-S (C). (E) and (F) represent the animals that had a different profile of seizures, with or without Tonic-Clonic phase. Rectangles, arrows and colors (Figure 3A), acronyms (Supplementary Table 1).

---

## AUTHOR'S CONTRIBUTIONS

PDP and PBD: experimental procedures, data analysis and manuscript preparation. JACO: flowcharts construction and behavioral analysis. ICCT: experimental procedures and chemical analysis. AF: experimental design, figures and manuscript correction. NPL and NGC: Experimental design, advice planning and execution of experimental protocols/methods and manuscript correction, laboratory structure, animals and reagents.

### 3. ARTIGO EM PREPARAÇÃO DURANTE DOUTORADO:

#### **Behavioral and EEGraphic characterization of the anticonvulsant effects of the predator odor (TMT) in the amygdala rapid kindling, a model of temporal lobe seizures**

**Authors:** Delfino-Pereira, P.<sup>a</sup>; Bertti-Dutra, P.<sup>a,b</sup>; Del Vecchio, F.<sup>b</sup>; Cortes de Oliveira, J.A.<sup>b</sup>; de Castro Medeiros, D.<sup>c,d</sup>; Cestari D.M.<sup>e</sup>; Santos, V.R.<sup>b</sup>; Moraes, M.F.D.<sup>c</sup>; Rosa J.L.G.<sup>e</sup>; Mendes, E.M.A.M.<sup>d</sup>; Garcia-Cairasco, N.<sup>a,b\*</sup>

#### **Affiliations:**

<sup>a</sup>Department of Neuroscience and Behavioral Sciences, Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo, USP, Ribeirão Preto, Brazil.

<sup>b</sup>Department of Physiology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil.

<sup>c</sup>Department of Physiology and Biophysics, Center for Technology and Research in Magneto-Resonance, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

<sup>d</sup>Electrical Engineering Graduate Program, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

<sup>e</sup>Department of Computer Science, Institute of Mathematics and Computer Sciences, University of São Paulo, Brazil.

\*Corresponding author

**Norberto Garcia-Cairasco, Ph.D**  
**Department of Physiology**  
**Ribeirão Preto School of Medicine**  
**University of São Paulo**  
**3900 Bandeirantes Av**  
**14049-900 Ribeirão Preto/SP, Brazil**

**Phone: +55 (16) 3315-3330**

**email: ngcairas@usp.br**

Polianna Delfino-Pereira, MSc <polidelfino@yahoo.com.br>

Poliana Bertti-Dutra, PhD <pbertti@yahoo.com.br>

Flávio Del Vecchio, BSc <flaviodv@usp.br>

José Antônio Cortes de Oliveira, BSc <jacolive@usp.br>

Daniel Medeiros de Castro, PhD <dacamemg@gmail.com>

Daniel Moreira Cestari, MSc <daniel.cestari@usp.br>

Victor Rodrigues Santos, PhD <victorrsantos@gmail.com>

Márcio Flávio Dutra Moraes, PhD <mfdm@icb.ufmg.br>

João Luís Garcia Rosa, PhD <joaoluis@icmc.usp.br>

Eduardo Mendes, PhD <emmendes@cpdee.ufmg.br>

Norberto Garcia-Cairasco, PhD <ngcairas@usp.br>

## Abstract

**Aim:** Evaluate the behavioral and electroencephalographic (EEG) effects of 2,5-Dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline (TMT) olfactory exposure on limbic seizures induced by Amygdala Rapid Kindling (ARK). **Methods:** Wistar male rats (280-300 g) underwent stereotaxic surgery for electrodes implantation in Piriform Cortex (PC), Hippocampal Formation (HIP) and Amygdaloid Complex (AMYG). Part of the animals was exposed to a saturated chamber with water or TMT while others had ARK and olfactory exposure prior to the 21<sup>st</sup> stimulus (Stimulus plus water or TMT groups). Behavioral responses were measured by Racine scale (1972) modified by Pinel & Rovner (1978) and/or by sequential analysis/neuroethology. The electrographic activity of epileptogenic limbic networks was quantified by the occurrence of the first and second afterdischarges, comparing the 1<sup>st</sup> and 21<sup>st</sup> stimulus. The spectral analysis (Fast Fourier Transform, FFT) of the first afterdischarge was performed at the 21<sup>st</sup> stimulus. **Results:** As a completely new finding, TMT olfactory exposure reduced the seizure severity in kindled rats, altering the behavioral sequence displayed. Furthermore, TMT inhibited epileptogenic network by suppressing the first and second afterdischarges at the 21<sup>st</sup> stimulus for PC and HIP. TMT also decreased the theta oscillations on HIP band at Stimulus and TMT group, compared to Stimulus and Water group. Curiously, our data indicated low-frequency activity particularly for HIP and AMYG at No Stimulus and TMT group, with exception of peak power in delta band. **Conclusions:** TMT, a potent molecule with strong biological relevance, in fact, "predator odor", suppressed the activity of epileptogenic limbic networks in the ARK, a Temporal Lobe Epilepsy model.

**Keywords:** Temporal Lobe Epilepsy (TLE); Amygdala Rapid Kindling (ARK); Seizures; Olfaction; Fear; 2,5-Dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline (TMT).

Number of References: 107;

Number of Figures: 9;

Number of Tables: 3.

## INTRODUCTION

Epilepsy is considered a hyperexcitable brain disease, highly interactive (neuronal synchrony) in extensive neural networks (ENGLLOT; BLUMENFELD, 2009; GARCIA-CAIRASCO et al., 2017), characterized by the persistent and pathological predisposition to



generate epileptic seizures (for full definition see FISHER et al., 2014) and by the neurobiological, psychological, cognitive and social consequences (FISHER et al., 2005). Seizure are spontaneous symptomatic manifestations (or clinical events), not necessarily behavioral, of abnormal electrical discharges derived from either part or the whole central nervous system (MCNAMARA, 1994, 1999). It is estimated that approximately 4-10 in every 1000 people worldwide are affected by this disease (MCNAMARA, 1999; WHO, 2017), being the Temporal Lobe Epilepsy (TLE) the most common seizures type in adult individuals (BERTRAM, 2007; ENGEL J, BIRBECK GL, DIOP AG, JAIN S, 2005; H. GASTAUT, J. L. GASTAUT; SANCHEZ, 1975; JASEJA, 2008, 2010; WIEBE, 2000). While important advances have occurred on pharmacological treatments in the last decades, about 20-40% of these patients do not respond to currently available treatments (LÖSCHER et al., 2013; NEVALAINEN et al., 2014; PICOT et al., 2008; SIMONATO et al., 2014; WHO, 2010; 2017).

A promising alternative in the pool of therapeutic approaches is olfactory stimulation (odor therapy) which has been shown capable to modulate, block or even induce the occurrence of seizures. Efron (1956) elegantly described the report of a patient that presented seizures preceded by olfactory auras, and that the exposure to strong and unpleasant odors, such as pure jasmine, hydrogen sulfide, dimercaprol, skatole and others, were able to inhibit the expression of such seizures. Later, the same patient interestingly created a conditioning, where the simple evocation of the olfactory memory was enough to prevent the manifestation of seizures (EFRON, 1957). Similarly, experimental data also evidenced promising results, as showed by Ebert & Löscher (2000), utilizing the olfactory stimulation with toluene (TOL), an aversive odor, which was capable of decrease the seizures susceptibility in Amygdala Kindling, even with electrical stimulation 20% above of threshold. The latter report was strongly supported by our experimental findings that confirmed the TOL anticonvulsant properties, indicated by the reduction of acute and chronic (kindled) audiogenic seizures in *Wistar Audiogenic Rat (WAR)* strain (DELFINO-PEREIRA et al., 2018). Conversely, besides potential therapeutic tool to control epileptic seizures (BETTS, 2003; DELFINO-PEREIRA et al., 2018; EBERT; LÖSCHER, 2000; EFRON, 1956, 1957; GOWERS, 1881; JASEJA, 2008, 2010; LUNARDI et al., 2016; VALENTINE; FREMIT; TESKEY, 2005; WOOD et al., 1984), the induction of seizures by olfactory stimulation has also been reported (BOZORG; BENBADIS, 2009; BURKHARD et al., 1999; HUGHES; ANDY, 1979; ILIK; PAZARLI, 2015; LUNARDI et al., 2016; NGUYEN; RYBA, 2012; RESTREPO; HELLIER; SALCEDO, 2013; SKALLI; SOULAYMANI BENCHEIKH, 2011; SPINELLA, 2001; STAFSTROM, 2007; T.

TAKAHASHI, 1975), although the neurophysiological mechanisms of both anti- and pro-convulsant modulations are still little understood.

Amygdala Kindling (usually electrical) is a clinically relevant animal model of TLE (BERTRAM, 2007; EBERT; LÖSCHER, 1995; FISHER, 1989; KANDRATAVICIUS et al., 2014; LÖSCHER; BRANDT, 2010; LÖSCHER; EBERT, 1996; LÖSCHER, 2002, 2011; LOTHMAN et al., 1985; MCNAMARA et al., 1980; SATO; RACINE; MCINTYRE, 1990), widely used by most antiepileptic drugs discovery programmes, including the NIH/NINDS-sponsored anticonvulsant drug (BIALER; WHITE, 2010; LÖSCHER, 2002, 2011; LÖSCHER; BRANDT, 2010). A fast and effective alternative is the Amygdala Rapid Kindling (ARK) model, that consists in 10 daily electrical stimuli, during 2 consecutive days (FORESTI et al., 2008). On the 3<sup>rd</sup> day an additional stimulus can be applied to anticonvulsant drugs tests (in fully kindled rats) or to study plasticity or memory mechanisms.

It is described that the olfactory stimulation with 2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline (TMT), indeed predator odor that induce fear-like behaviors, triggered rhythmic fast wave bursts (>1 mV, peak frequency approximate 16 hertz [Hz]; mean frequency approximate 20 Hz) in the Olfactory Bulb and the Piriform Cortex (PC) of waking or urethane-anesthetized rats (ZIBROWSKI; VANDERWOLF, 1997). Recently it was demonstrated that fear-related behaviors, such as Freezing (FR), are modulated by distinct respiratory patterns in mice, indicating anatomical and functional connections between the olfactory pathway and prelimbic prefrontal cortex, an area important for expression of conditioned fear behaviors (MOBERLY et al., 2018). In fact, the activation of other cerebral structures, particularly limbic in addition to PC, such as Amygdaloid Complex (AMYG) and Hippocampal Formation (HIP), is a common finding between "seizure-related" networks and "fear-related" networks. Thus, clinical and experimental studies provide scientific support for the hypothesis that olfactory stimulation with TMT, a potent synthetic compound isolated from fox feces (*Vulpes vulpes* [VERNET-MAURY, 1980; VERNET-MAURY; POLAK; DEMAEL, 1984]) and that biologically represents the "predator odor", besides inducing fear, can influence seizure expression. Therefore, considering the evidence of the control or blockade of seizures by olfactory stimulation in rodents and patients, our main objective was to evaluate the behavioral and electroencephalographic (EEG) effects of TMT olfactory exposure on limbic seizures induced by ARK.

## RESULTS

---

Only animals with the correct position of electrodes and that were kindled during the ARK protocol were included in the study. **Erro! Fonte de referência não encontrada.** shows the positioning of the electrodes in the following areas: PC (1), AMYG (2) and HIP (3), for the groups: No Stimulus and Water (N= 8); Stimulus and Water (N= 8); No Stimulus and TMT (N= 8) and Stimulus and TMT (N= 12), of the 57 animals implanted during stereotaxic surgery.

### **TMT decreased the severity of limbic seizures**

The evolution of ARK (1<sup>st</sup>-20<sup>th</sup> stimulus) is illustrated in **Erro! Fonte de referência não encontrada.**A and B, for animals of both stimulated groups (N= 18, Stimulus and Water, and Stimulus and TMT) during the stimulus period (A) and post-stimulus period (B). It is possible to verify the expected evolution of ARK with a natural and progressive development of kindling, with statistically significant differences along the stimuli (Supplementary Table ). However, the exposure of kindled rats to TMT was able to reduce significantly seizures severity at the 21<sup>st</sup> stimulus (Racine's scale or LI [**Erro! Fonte de referência não encontrada.**B e C]). In addition, TMT (Stimulus and TMT) significantly reduced the LI compared to 20<sup>th</sup> stimulus (Mean of 4.00 to 0.5 in the TMT presence;  $p < 0.0001$ ; Mann Whitney test), but there was no difference for Stimulus and Water group (Mean of 3.50 to 2.50 in the water presence;  $p > 0.05$ ; Mann Whitney test), in the POST period. More specifically at the 21<sup>st</sup> stimulus, in the Stimulus and TMT group, 5 out of 10 rats (50%) did not present seizures (LI= 0). The other 5 rats (50%) in which the seizures were observed, 3 (30%) presented LI equal to class 1 (30%) and only 2 (20%) showed seizures varying from classes 2 or 3. Thus, TMT induced a seizure modification, evidenced by the complete blockade of seizures in half of the rats and also by the pronounced suppression in seizure severity (Racine's scale) observed in the other animals of this group.

Furthermore, to compare the similarity of the indexes obtained along the ARK protocol for both stimulated groups (Stimulus and Water, and Stimulus and TMT), the quantification of the number of stimuli necessary to induce seizures was done, with LI equal to 4 (NOEBELS et al., 2012). In the present study, these data were obtained in the 9<sup>th</sup> stimulus for both groups, through the weighted average. Thus, it is possible to indicate that the animals were similarly kindled independent of their group. These data also indicate that for both ARK and not rapid (or classical) kindling paradigms, the number of stimuli needed to evoke LI 4 is on average 10 stimuli (LOTHMAN et al., 1985).

Thus, the ARK protocol induced behavioral seizures progression, resulting in complex partial seizures with secondary generalization. And the exposure of Wistar rats after ARK to TMT was able to reduce significantly limbic seizures (Racine's scale or LI). This criterion,

besides being validated, is frequently used in the evaluation of therapeutic interventions (DELLA PASCHOA et al., 1997; LÖSCHER; BRANDT, 2010; MCNAMARA, 1989; MCNAMARA et al., 1980; NOEBELS et al., 2012).

### **Behavioral sequences confirm the suppressive effect of TMT in limbic seizures**

The neuroethological analysis represented in **Erro! Fonte de referência não encontrada.B** and C illustrates the flowcharts of the No Stimulus and Water (B, N= 8) versus No Stimulus and TMT (C, N= 8) groups, both during the 21<sup>st</sup> stimulus. In Figure 1C is the flowchart of the No Stimulus and TMT group evidencing the behaviors (rectangles) and their statistical interactions (arrows) after exposure to TMT (**Erro! Fonte de referência não encontrada.C**), with the expression of fear-like reactions, such as Freezing (FR) found in the 1<sup>st</sup> cell. Also, during the STIMULUS period (in this case without stimulus, 2<sup>nd</sup> cell), the animals remained with the same fear behavior, in addition to Running (RU). However, in the POST period, TMT triggered more complex fear-like reactions, such as FR, RU, Arousal (AR) and Yawning (YA), which activated natural exploration for clues that indicated the location of the predator, demonstrated by higher number of behaviors and interactions, added to higher frequency of Sniffing (SN) and Erect Posture (ER), in comparison to its control (No Stimulus and Water group, Figure 1B).

**Erro! Fonte de referência não encontrada.** shows the behavioral effect observed in 1<sup>st</sup> (A) and 20<sup>th</sup> (B) electrical stimuli, for both stimulated groups (Stimulus and Water, and Stimulus and TMT, N= 18). In the PRE period of 1<sup>st</sup> stimulus (**Erro! Fonte de referência não encontrada.A**, 1<sup>st</sup> cell) it was possible to verify a clear heterogeneity, especially for exploratory and grooming (self-cleaning) behavioral items. In this context, animals expressed considerably exploratory behaviors that include: ER, Immobility (IM), Scanning (SC, head movements), SN and Walking (WA). There was also a number of variations (qualities) of grooming (self-cleaning) behaviors such as: Grooming of Face (GRF), Grooming of Genitals (GRG), Grooming of Head (GRH), Grooming of Body on the Left (GRL), Grooming of Body on the Right (GRR), Licking of Claws (LIC), Licking of Claws Forelegs Left (LCL<sub>2</sub>), Licking of Claws Forelegs Right (LCR<sub>2</sub>), Scratching of the Body Left (SCRL) and Scratching of the Body Right (SCRR), with strong interactions between some of these behaviors, which characterizes a repetitive pattern of the sequence of these items, in others words, grooming (self-cleaning) clusters.

During the STIMULUS period (**Erro! Fonte de referência não encontrada.A**, 2<sup>nd</sup> cell) we observed the presence of some isolated behaviors, with only two interactions between the

pairs (IM - Eye Blinking [EB] and Withdrawal [WI] - SC). In addition, there was the presence of seizure behaviors such as: EB, Masticatory Movements (MT) and Rearing (REAR), with LI equal to 4, added to the behavior Gyri on the Left (GL, assymmetric posture and turning).

In the last cell, POST period (**Erro! Fonte de referência não encontrada.A**, 3<sup>rd</sup> cell), there was an increase in the number of behaviors and dyadic (pair of behaviors) interactions, with the predominance of behaviors named as Other, in addition to exploratory and grooming (self-cleaning) behaviors. It was also clear the presence of clusters formed by quite localized limbic behaviors, in fact orofacial automatisms, such as EB, MT, Salivation (SAL), Myoclonic Spasms of Forelegs (MYO<sub>l</sub>), Myoclonic Spasms of the Head (MYO<sub>h</sub>) and REAR. In addition to typical seizure behaviors such as: GL, Gyri on the Right (GR), Jumping (JP) and RU, besides some fear behaviors such as AR, WI and YA.

In the PRE period of the 20<sup>th</sup> stimulus (**Erro! Fonte de referência não encontrada.B**, 1<sup>st</sup> cell), there was a reduction in the number of behavioral items presented by the animals, with the presence of exploratory and grooming (self-cleaning) behaviors, in addition to EB, Head Shaking (HS) and YA. These behaviors in general presented frequency and duration less than in the same period of the 1<sup>st</sup> Stimulus (**Erro! Fonte de referência não encontrada.A**, 1<sup>st</sup> cell), with exception of IM, which had an increase in proportional time. Moreover, there was a reduction in behavioral interactions during this period.

During stimulation (STIMULUS period, **Erro! Fonte de referência não encontrada.B**, 2<sup>nd</sup> cell) in the 20<sup>th</sup> stimulus, exploratory behaviors (SC, EP, IM, SN and WA) and other new ones were detected, when compared to the same period of the 1<sup>st</sup> stimulus (**Erro! Fonte de referência não encontrada.A**, 2<sup>nd</sup> cell), such as: AR, SCRR and Startle (STA), in addition to the limbic behaviors of EB, MT, MYO<sub>h</sub> and REAR, together with the mesencefalic behavior of JU. And still, in this period there were three behavioral interactions, one more than at the same period of the 1<sup>st</sup> stimulus (**Erro! Fonte de referência não encontrada.A**, 2<sup>nd</sup> cell).

In the period after the 20<sup>th</sup> stimulus (POST, **Erro! Fonte de referência não encontrada.B**, 3<sup>rd</sup> cell), there was the presence of the same limbic behaviors, when compared with the 1<sup>st</sup> stimulus (**Erro! Fonte de referência não encontrada.A**, 3<sup>rd</sup> cell), such as: EB, MT, MYO<sub>h</sub>, MYO<sub>l</sub>, SAL and REAR, plus Generalized Myoclonus (MYO<sub>g</sub>) and Falling (FALL). Two additional behaviors were also observed: Atonic Falling (AF) and JU. And still, in this situation, Post-ictal Immobility (PIM) was also present, naturally associated to the post-seizure periods.

Finally, in the PRE period of the 21<sup>st</sup> stimulus for both stimulated groups were identified the presence of five exploratory behaviors (ER, IM, SC, SN and WA) and an isolated grooming

(self-cleaning) behavior (LIC; **Erro! Fonte de referência não encontrada.C** and D, 1<sup>st</sup> cells). The animals exposed to TMT (**Erro! Fonte de referência não encontrada.D**, 1<sup>st</sup> cell) showed an increased proportional time for the IM item. While, the animals submitted to water (**Erro! Fonte de referência não encontrada.C**, 1<sup>st</sup> cell) still presented EB. There were only three interactions in the Stimulus and Water group (**Erro! Fonte de referência não encontrada.C**, 1<sup>st</sup> cell) versus two behavioral interactions in the Stimulus and TMT group (**Erro! Fonte de referência não encontrada.D**, 1<sup>st</sup> cell).

During the 21<sup>st</sup> stimulus (STIMULUS period), the Stimulus and Water group (**Erro! Fonte de referência não encontrada.C**, 2<sup>nd</sup> cell) presented the same behaviors observed for the same period of the 20<sup>th</sup> stimulus (**Erro! Fonte de referência não encontrada.B**, 2<sup>nd</sup> cell), with exception of AR, JP, MT and Nodding (NOD), in addition to the presence of limbic behaviors, such as MYO<sub>1</sub> and MYO<sub>g</sub>. For the Stimulus and TMT group (**Erro! Fonte de referência não encontrada.D**), during the stimulation (STIMULUS period, 2<sup>nd</sup> cell) it was observed the presence of a single seizure behavior, EB.

In the 21<sup>st</sup> stimulus posterior period (POST, 3<sup>rd</sup> cells, **Erro! Fonte de referência não encontrada.C** and D, N= 8 and N= 10, respectively) we observed a reduction of behavioral items in comparison to same period of the 20<sup>th</sup> stimulus (**Erro! Fonte de referência não encontrada.B**, 3<sup>rd</sup> cell; N= 18). These data can be explained by the lower number of animals included in the analysis of the 21<sup>st</sup> stimulus. For the Stimulus and Water group (**Erro! Fonte de referência não encontrada.C**, 3<sup>rd</sup> cell) we observed limbic behaviors such as: MT, MYO<sub>h</sub>, MYO<sub>1</sub>, MYO<sub>g</sub> and REAR (LI= 4), as well as the item GL. For the same period of the Stimulus and TMT group (**Erro! Fonte de referência não encontrada.D**, 3<sup>rd</sup> cell), it was possible to observe an expressive reduction in the number of limbic behaviors, with the presence of only two of them: EB and MT (LI= 1). Also, there was the important cluster formation among grooming (self-cleaning behaviors, **Erro! Fonte de referência não encontrada.D**, 3<sup>rd</sup> cell) behaviors, compared to the same period of its control (**Erro! Fonte de referência não encontrada.C**, 3<sup>rd</sup> cell).

Comparing the behaviors expressed by the groups: No Stimulus and TMT (**Erro! Fonte de referência não encontrada.C**) versus Stimulus and TMT (**Erro! Fonte de referência não encontrada.D**), the PRE and STIMULUS periods of both groups were similar. They had exploratory behaviors, but the second group (**Erro! Fonte de referência não encontrada.D**) presented greater duration of the IM item and absence of FR and RU, in contrast to the No Stimulus and TMT group (**Erro! Fonte de referência não encontrada.C**) where those behaviors were present. In the POST period, it is possible observe the presence of typical fear



behaviors (AR, FR and RU) for the No Stimulus and TMT group (**Erro! Fonte de referência não encontrada.D**), while for Stimulus and TMT there was the behavioral expression of fear items considered of lower intensity, such as Excretion of Feces (EXC) and YA.

In summary, we observed predominantly the presence of exploratory and grooming (self-cleaning) behaviors in the PRE (s) periods of all stimuli and groups (**Erro! Fonte de referência não encontrada.A-D**, 1<sup>st</sup> cells), even with variations in frequency and duration. With regard to the STIMULUS period (**Erro! Fonte de referência não encontrada.A-D**, 2<sup>nd</sup> cells), we observed that besides of the presence of exploratory behaviors, those described as Other, as well as limbic behaviors already present at the 1<sup>st</sup> stimulus (MT, EB and REAR, **Erro! Fonte de referência não encontrada.A**, 2<sup>nd</sup> cell), which along the ARK illustrated the natural increase in severity of the limbic seizures, as shown at the 20<sup>th</sup> stimulus (EB, MT, MYO<sub>h</sub> and REAR, **Erro! Fonte de referência não encontrada.B**, 2<sup>nd</sup> cell). In the 21<sup>st</sup> stimulus, the control group (**Erro! Fonte de referência não encontrada.C**, 2<sup>nd</sup> cell) presented EB, MYO<sub>h</sub>, MYO<sub>l</sub>, MYO<sub>g</sub> and REAR, while the experimental group (**Erro! Fonte de referência não encontrada.D**, 2<sup>nd</sup> cell) displayed only EB.

In the POST period, it was possible to notice an increase in limbic behaviors in the 20<sup>th</sup> stimulus (EB, MT, SAL, MYO<sub>h</sub>, MYO<sub>l</sub>, MYO<sub>g</sub>, REAR and FALL; **Erro! Fonte de referência não encontrada.B**, 3<sup>rd</sup> cell) compared to the 1<sup>st</sup> stimulus (EB, MT, SAL, MYO<sub>h</sub>, MYO<sub>l</sub> and REAR; **Erro! Fonte de referência não encontrada.A**, 3<sup>rd</sup> cell). In the 21<sup>st</sup> stimulus, the Stimulus and Water group (**Erro! Fonte de referência não encontrada.C**, 3<sup>rd</sup> cell) presented 1 procursive (assymetric turning) behavior (GR) and 6 limbic behaviors (EB, MT, MYO<sub>h</sub>, MYO<sub>l</sub>, MYO<sub>g</sub> and REAR; LI= 4). In the other hand, the Stimulus and TMT group (**Erro! Fonte de referência não encontrada.D**, 3<sup>rd</sup> cell) expressed only 2 limbic behaviors (EB and MT; LI= 1). Another important aspect observed during the POST period at the 21<sup>st</sup> stimulus was the presence of stronger interactions between grooming (self-cleaning) behavioral pairs for the Stimulus and TMT group (**Erro! Fonte de referência não encontrada.D**, 3<sup>rd</sup> cell) compared to the control group (**Erro! Fonte de referência não encontrada.C**, 3<sup>rd</sup> cell).

The overall behavioral findings indicated that TMT triggered fear-like reactions and activated natural exploration for clues that indicated the possible location of the predator. Furthermore, the ARK model effectively increased the severity of limbic seizures along the stimuli (1<sup>st</sup>-20<sup>th</sup>). And specially, detailed behavioral (neuroethological) analysis confirms the suppressor effect of TMT in limbic seizures (21<sup>st</sup> stimulus).

**TMT decreased the occurrence of first and second afterdischarges**

The afterdischarges evaluation (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**) demonstrated a significant reduction in electrographic seizure presentation for the TMT animals (Stimulus and TMT group, N=10) but no for Stimulus and Water group (N=8). **Erro! Fonte de referência não encontrada.**A shows a typical raw signal of the first stimulation (1<sup>st</sup> stimulus), highlighting the first (black trace) and second (gray trace) afterdischarge. The lower panel presents the statistical analysis of the afterdischarges occurrence (presence or absence) for the Stimulus and Water group (left panel; 1<sup>st</sup> and 21<sup>st</sup> stimuli), and Stimulus and TMT group (right panel; 1<sup>st</sup> and 21<sup>st</sup> stimuli). The Stimulus and TMT group presented a higher absence of afterdischarge at the 21<sup>st</sup> stimulus compared with the 1<sup>st</sup> stimulus for the neural structures PC (first afterdischarge  $\chi^2(1)=5.5$ ,  $p<0.05$  - **Erro! Fonte de referência não encontrada.**H) and HIP (first  $\chi^2(1)=3.5$ ,  $p=0.06$  and second afterdischarges  $\chi^2(1)=7.5$ ,  $p<0.01$  - **Erro! Fonte de referência não encontrada.**I and M, respectively). The animals from Stimulus and Water group demonstrated no statistical difference (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**B-G).

### **EEGraphic activity altered with TMT**

Spectral analysis indicated low frequency activity on No Stimulus and TMT group compared with to No Stimulus and Water group (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**), with statistical difference for median frequency and peak potency in delta band on HIP ( $p>0.05$ ; Mann Whitney test) and AMYG ( $p>0.05$ ; Mann Whitney test), and PC ( $p>0.05$ ; Mann Whitney test) and HIP ( $p>0.05$ ; Mann Whitney test), respectively. Similar to findings for (1) frequency at the peak power in the beta band for AMYG ( $p>0.05$ ; Mann Whitney test), (2) median frequency and peak power both on the gamma band for HIP ( $p>0.05$ ; Mann Whitney test). And finally, TMT (No Stimulus and TMT group) interfered EEGraphic expression, with statistical difference for median frequency considering whole spectrum for all channels ( $p>0.05$ ; Mann Whitney test). Thus and as cited, these data curiously revealed that TMT significantly decreased oscillation in the different sub-bands, with exception of peak power in delta (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**).

More importantly, FFT EEG analysis (21<sup>st</sup> stimulus) showed that TMT decreased the total power in theta oscillations on HIP ( $p>0.05$ ; Mann Whitney test), compared to Stimulus and Water group (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**). These findings corroborate the behavioral data which indicated that TMT interfered in the synchronization typical of seizure activity.

### **DISCUSSION**



---

As expected, the ARK model in Wistar rats induced a progressive increase in both behavioral and EEGraphic seizure activity, confirming previous data from our own Laboratory (FORESTI et al., 2008). We interpreted in the detailed behavioral analysis (neuroethology) that TMT triggered fear-like reactions which activated natural exploration for clues that indicated the location of the predator. In that context, and as a completely new finding, the olfactory exposure to TMT of kindled animals significantly reduced the seizure severity (Racine's scale) and the seizure-control effect was also evidenced by the behavioral sequential analysis. EEGraphic evaluations indicated that TMT suppressed the activity of limbic epileptogenic network, given the reduction in occurrence of the first and second afterdischarges. Moreover, FFT EEG analysis (21<sup>st</sup> stimulus) showed that TMT decreased the theta oscillations on HIP at Stimulus and TMT group, compared to Stimulus and Water group. Also surprisingly, our data indicated low-frequency activity observed by spectral features, particularly for HIP and AMYG at No Stimulus and TMT group.

We also found that ARK protocol as well as described for Amygdala Kindling accompanied concomitantly (in ictal and post-ictal periods) by behavioral changes (Figures **Erro! Fonte de referência não encontrada.** [A and B] and **Erro! Fonte de referência não encontrada.** [A]), in addition to EEGraphic progression (afterdischarge, **Erro! Fonte de referência não encontrada.**), involving initially as suggested by literature, epileptogenic alterations in local circuits with synchronic and hyperactive neurons, that along the stimuli (acquisition of Kindling), occur the recruitment from other brain areas (in our case, especially brainstem structures), resulting in progressive increase of severity (Figures **Erro! Fonte de referência não encontrada.** [A and B] and **Erro! Fonte de referência não encontrada.** [B]), associated to increase in complexity of the afterdischarge (**Erro! Fonte de referência não encontrada.** [BERTRAM, 2007; EBERT; LÖSCHER, 1995; FISHER, 1989; FORESTI et al., 2008; GODDARD, 1983, 1967; GODDARD; MCINTYRE; LEECH, 1969; LÖSCHER; BRANDT, 2010; LÖSCHER; EBERT, 1996; LOTHMAN et al., 1985; PITKÄNEN et al., 2006; SAYIN et al., 2003]).

However, we verified in some seizures, that the presence of epileptiform activity did not necessarily accompanied the behavioral changes, particularly when the second afterdischarge was present only in the HIP. In fact, a possible explanation is that the Racine's scale and also the detailed behavioral sequential analysis measure the seizure activity, based on motor behavior (movement changes), while the EEG evidence small changes in seizure activity, not always associated (correlated) to behavioral expression (BERGSTROM et al., 2013; PHELAN et al., 2015).

Another aspect observed in this study was the presence of Wet Dog Shakes (WDS) often correlated with the suppression of ARK-dependent seizures (particularly in **Erro! Fonte de referência não encontrada.D**, compared to **Erro! Fonte de referência não encontrada.C**, both POST period), inversely described by Rodrigues et al., (2005), indicating that this finding is controversial and varies significantly according to the animal model. Also, the presence of the behavioral pattern (cluster) of grooming was associated with the reduction in seizure severity (**Erro! Fonte de referência não encontrada.D**, compared to **Erro! Fonte de referência não encontrada.C**, both POST period). In fact, previous experimental evidence from our own Laboratory has shown a “hypergrooming” pattern induced by bilateral microinjection of oxytocin (OT) into the central nucleus of amygdala (MARRONI et al., 2007). At the peak of this OT-induced hypergrooming, ARK can be blocked (unpublished observations), probably another proof of “circuit antagonism” with effective anticonvulsant effects such as the one discussed in the current study.

More importantly, we also found a significant reduction in the severity of the limbic seizures in the animals from Stimulus and TMT group, in relation to control group (Stimulus and Water group, **Erro! Fonte de referência não encontrada.C** and **D**) In is intriguing that we also found a reduction in LI (observed through Racine’s scale), while not significant for animals exposed to Water (Stimulus and Water group, detailed in items 2.1 and 2.2), suggesting that Water or relative air humidity was not innocuous, possibly the air saturated with water vapor effect sensitized the respiratory airways, implicated as effects of acute stress (novelty or new environment), that physiologically could induce the grooming behavior (KALUEFF et al., 2016), reinforcing the hypothesis previously cited.

Several evidences suggest a relationship between epilepsy and olfactory system (particularly fear-related" network) based upon a joint network activity, potentially related to "circuit antagonism” or “competition of systems”, via PC-AMYG-HIP. According to this proposal, the prior direct or indirect activation (by TMT) of brain areas (PC-AMYG-HIP) involved in seizure generation, recruitment or progression, could decrease the seizure activity or/and could temporary block the propagation of seizures, interfering in the communication between ictogenic structures, reducing a possible network wise synchronization and the amplification of paroxysmal activity (VISMER et al., 2015).

In this perspective, the processing of olfactory stimulus is distributed across a wide range of cerebral structures (for peripheral processing, in particular odorant receptors activated by TMT, see JIANG et al., 2015), among them, the PC that projects to lateral entorhinal cortex and AMYG (NAGAYAMA et al., 2010). Considering these intricate anatomical connections

or relations of the temporal lobe and of the olfactory system (BETTS, 2003; EBERT; LÖSCHER, 2000; JASEJA, 2008, 2010; LI et al., 2010; WEST; DOTY, 1995), more specifically, of the areas involved in the TMT processing (DAY; MASINI; CAMPEAU, 2004; FENDT; ENDRES; APFELBACH, 2003; STETTLER; AXEL, 2009; TAKAHASHI, 2014; WALLACE; ROSEN, 2001), which are also the same critically involved in limbic seizures expression in the Amygdala Kindling model (BERTRAM, 2007; EBERT; LÖSCHER, 1995; FISHER, 1989; FORESTI et al., 2008; GODDARD, 1983, 1967; GODDARD; MCINTYRE; LEECH, 1969; LÖSCHER et al., 1995; LÖSCHER; BRANDT, 2010; LÖSCHER; EBERT, 1996; LOTHMAN et al., 1985; MCNAMARA et al., 1980), the olfaction could interfere in limbic seizures (JASEJA, 2008) and vice-versa (HUMMEL T, HENKEL S, NEGÓIAS S, GALVÁN JRB, BOGDANOV V; P, HALLMEYER-ELGNER S, GERBER J, REUNER U, 2013; LÖSCHER, 2016).

Interestingly, this association between olfaction and limbic seizures was clearly evidenced by the behavioral sequential analysis, demonstrating anticonvulsant properties, observed by the reduction of limbic behaviors, at the STIMULATION period, with the presence of only one limbic behavior (EB) in the Stimulus and TMT group (**Erro! Fonte de referência não encontrada.D**), in contrast to five limbic behaviors (EB, MYO<sub>1</sub>, MYO<sub>g</sub>, MYO<sub>h</sub> and REAR) in the Stimulus and Water group (**Erro! Fonte de referência não encontrada.C**). And at the POST period, with the presence of only two limbic behaviors (EB and MT) for Stimulus and TMT group (**Erro! Fonte de referência não encontrada.D**), in comparison to six limbic behaviors (EB, MT, MYO<sub>1</sub>, MYO<sub>g</sub>, MYO<sub>h</sub> and REAR), added to GL, for Stimulus and Water group, all observed on 21<sup>st</sup> stimulus (**Erro! Fonte de referência não encontrada.C**). Additionally, the TMT triggered the expression of classic fear-like behaviors (AR, FR, RU e YA, **Erro! Fonte de referência não encontrada.C**) which activated natural exploration for clues that indicated the possible location of the predator, in the No stimulus and TMT group (**Erro! Fonte de referência não encontrada.C**), suggesting the activation of circuits involved in defensive responses. While animals of the Stimulus and TMT group presents less robust fear-like behaviors, such as defensive IM, EXC, WI and YA (**Erro! Fonte de referência não encontrada.D**). This situation may be a consequence of the antagonistic circuits activation that possibly inhibited the expression of typical fear behaviors, such as AR, FR and RU, present in the No Stimulus and TMT group (Figure 1C). As a whole, these data, probably indicate a competition of systems or circuit antagonism, with consequent suppression of seizures activity/propagation, as suggested by Efron (1956), based on an endogenous inhibitory mechanism, or “natural” method of seizures control, that does not involve drug therapy or brain

manipulations, functioning as a countermeasure in seizure activity (EBERT; LÖSCHER, 2000; EFRON, 1956; JASEJA, 2008). On the other hand, in other situations with seizures already initiated, the olfactory stimulation could cause widespread desynchronization (JASEJA, 2008, 2010; LI et al., 2010).

As mentioned, it was described that the TMT, as well as TOL, induced rhythmical fast oscillations (8–21 Hz rhythmical potentials) in the PC, in contrast to ammonia (ZIBROWSKI; VANDERWOLF, 1997). Recently, other study demonstrated olfactory bulb-hippocampus integration related to theta phase/gamma amplitude during exploration of home-cage odors, while TMT had caused avoidance in the spatial odor task (CASTRO et al., 2017). Our data showed a decrease of theta band on HIP in the Stimulus and TMT group, compared to Stimulus and Water group (Figure 8). These data indicated a suppression of theta band in the HIP, could correspond to temporary block of the propagation or generalization of epileptic seizures (with the HIP exerting its gatekeeper function), since this band is associated to typical ictal pattern (JALILIFAR et al., 2017), corroborating the findings of reduction of the occurrence of first and second afterdischarges (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**). In conjunct, TMT appears to have suppressive effects in the epileptiform activity. Moreover surprisingly, our data indicated low-frequency activity observed by FFT EEG analysis, particularly in HIP and AMYG, for No Stimulus and TMT group (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**) and to the best of our knowledge, there is little published study investigating this theme, so more studies are necessary.

Another possible explanation for our results is based on the anticonvulsant effect of norepinephrine (APPLEGATE; BURCHFIEL; KONKOL, 1986; APPLEGATE; KONKOL; BURCHFIEL, 1987; CURTIS et al., 2012; DAILEY; NARITOKU, 1996; FEINSTEIN; GLEASON; LIBET, 1989; FITZGERALD, 2010; GIORGI et al., 2004; JANITZKY et al., 2015; JOBE; BROWNING, 2005, Figure 9). In fact TMT is a relevant ethologically stressor to the rat, capable of activate physiological and behavioral responses triggered by the Sympathetic-Adreno-Medullar (SAM) axis, that leads mainly to release of catecholamines (DE KLOET; JOËLS; HOLSBOER, 2005; JOËLS; BARAM, 2009; TANK; LEE WONG, 2015), among them norepinephrine. Horii et al., (2010) demonstrated that urethane-anesthetized rats submitted to TMT had increase adrenal sympathetic nerve activity. This autonomic change is described in other studies (CURTIS et al., 2012; JANITZKY et al., 2015). In general, the norepinephrine depletion contributes to predisposition to seizures in the kindling model (APPLEGATE; BURCHFIEL; KONKOL, 1986; CURTIS et al., 2012; JANITZKY et al., 2015; JOBE; BROWNING, 2005), while normal/control doses may have anticonvulsant effect

(APPLEGATE; BURCHFIEL; KONKOL, 1986; APPLEGATE; KONKOL; BURCHFIEL, 1987; DAILEY; NARITOKU, 1996; JOBE; BROWNING, 2005). Feinstein et al., (1989) suggested the effectiveness of stimulation of locus coeruleus in seizures control, in two patients with epilepsy (one generalized tonic-clonic seizures, one psychomotor seizures), demonstrated by reduction in frequency and severity of both types seizures. On the other hand, it is also mentioned that TMT induces increase in corticosterone and corticotropin-releasing hormones (MORROW et al., 2000; MORROW; ELSWORTH; ROTH, 2002; VERNET-MAURY; POLAK; DEMAEL, 1984). Additionally, other studies describe that TMT in high concentration can also activate the trigeminal nerve (FENDT; ENDRES, 2008; GALLIOT et al., 2012; HACQUEMAND et al., 2013; HACQUEMAND; JACQUOT; BRAND, 2010) and thus reduce seizure susceptibility, as anticonvulsant therapy. However, in accordance with our experimental design (as cited, the animals were exposed to water or TMT during 20 s and immediately after they were submitted to electrical stimulation, see details in Materials and Methods), we hypothesize the predominant effect of activation of the sympathetic system (mediates short-term effects), over the Hypothalamus-Pituitary-Adrenal axis (HPA, short and long-term effects [JOËLS; BARAM, 2009; TANK; LEE WONG, 2015]), that can be added or not, to possible trigeminal effect.

In summary, it is our view that TMT appears to act as an anticonvulsant substance through the combination of several factors that potentially include: (1) antagonism or competition between "fear related networks" and "seizure related networks", (2) noradrenergic effect, and (3) trigeminal nerve stimulation/activation. Such actions are highly complex (activation of the same anatomical structures with different functionality), nonlinear and immediate, so the deepening of the theme is fundamental for understanding of the process.

Some issues deserve consideration, Lunardi et al., (2011) suggest that the same stimulus can trigger or inhibit seizures - depending on the state of activation of the neuronal membrane and also the state of cortical activation at the moment that the stimulus is given. Thus, further studies should evaluate the precipitation or inhibition switching of seizures by olfactory stimulation, in addition to the exposure effects, as duration and intensity. Furthermore, as future perspective, we wish to implement molecular solutions and cutting-edge technologies, for example optogenetics, which may confirm the mechanisms and the circuits responsible for the anticonvulsant effect of TMT.

Taken together, this study is associated to the multinational research consortium *Epilepsies with External Modification of Ictogenesis (EpExMo)*, aimed at collaborate to the knowledge associated to basic mechanisms and clinical features of epilepsies inhibited or

triggered by external sensory or cognitive stimuli. Our current experiments are in fact absolutely coherent with previous studies (BETTS, 2003; DELFINO-PEREIRA et al., 2018; EBERT; LÖSCHER, 2000; EFRON, 1956, 1957; GOWERS, 1881; JASEJA, 2008, 2010; LUNARDI et al., 2016; VALENTINE; FREMIT; TESKEY, 2005; WOOD et al., 1984), adding data in literature, but certainly, our findings represents a partial component that will collaborate to the understanding of efficacy of odorants in the seizure response, with potential translational impact.

In conclusion, both behavioral and EEGraphic evaluations indicated that TMT, a potent molecule with strong biological relevance, in fact, "predator odor", suppressed the activity of epileptogenic limbic networks.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Ethics Statement**

All experimental protocols were designed in accordance with recommendations for animal experimentation of the Brazilian Society for Neuroscience and Behavior and from the Commission on Ethics on Animal Experimentation (CEUA) at the University of São Paulo (protocol number: 200/2011).

### **Animals**

The present study was conducted in *naïve* male Wistar rats (280-300 g), supplied by the Ribeirão Preto Vivarium of the campus at the University of São Paulo and maintained at the Vivarium of the Ribeirão Preto School of Medicine, placed at the Department of Physiology, under controlled environmental conditions of light (lights on at 06:00 hours; lights off at 18:00 hours) and temperature ( $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ ), *ad libitum* access to food and water. The animals were kept in individual cages. After the experimental procedures (described below), the rats were euthanized.

### **Stereotaxic surgery**

All animals were anesthetized with Thiopentax - thiopental sodium 4% (30 mg/kg, intraperitoneal injection [ip]) with doses of maintenance (0.1 ml) with combination of anesthetics Ketamine (0.06 mg/kg, ip; Agener Union Animal Health - Embu Guaçu, SP, Brazil) and Xylazine (0.04 mg/kg; ip; Bayer Animal Health - São Paulo, SP, Brazil). In addition, a local subcutaneous anesthetic composed of 2% lidocaine hydrochloride containing epinephrine (Astra - Naucalpan, Mexico) was applied.



Bipolar electrodes, all made of a twisted pair of stainless-steel teflon coated wires [Model 791400, AM Systems Inc., Carlsborg, WA, USA] were stereotactically implanted unilaterally (left) in the PC (AP: Bregma, ML: -5.0 mm, DV: -8.2 mm) and HIP (AP: -6.3 mm, ML: -4.5 mm, DV: -4.5 mm). For the site of electrical stimulation, the Basolateral Amygdala (AP: -2.3 mm, ML: -4.7 mm, DV: -7.1 mm) a tripolar electrode was used. Additionally, a ground wire and three stainless steel screws ( $\varnothing$  1.5 mm; Fine Science Tools, Heidelberg, Germany) were implanted. The electrodes, ground wire and screws were fixed to the bone with zinc cement (S.S. White - Rio de Janeiro, RJ, Brazil) and subsequently welded (two first items) to a connector (RJ11cat6), while the connector was fixed to the rat skull with acrylic resin. After surgery, the animals received veterinary pentabiotic in a single dose of 0.05 ml (intramuscular; Fort Dodge Animal Health LTDA - São Paulo, SP, Brazil).

The animals remained in recovery for a period of 3-7 days, with daily 10-min habituation sessions in the last 3 days, in order to minimize responses to transfer from the vivarium to the experimental room, to the experimental manipulation and to the novel environment.

### **Experimental procedure**

The ARK followed the model proposed by Foresti et al., (2008), consisting of the application of 20 electrical stimuli, 10 times a day (morning period), for 2 consecutive days, with interstimulus interval of 30 min. On the 3<sup>rd</sup> day, 24 h after the 20<sup>th</sup> stimulus, the animals were submitted to the olfactory stimulus and immediately after received the last electrical stimulus (the 21<sup>st</sup> stimulus). During the sessions, the behavior and EEG were recorded for posterior analysis.

The No Stimulus groups (sham kindling) consisted of rats exposed only to odorants, that were manipulated equally as the rats that received the ARK protocol, but were not subjected to electrical stimulation.

### **Electrical stimulation**

The afterdischarge threshold was determined through stimulation delivered to the AMYG (GRASS-S88 stimulator; West Warwick, USA) with an initial current of 100  $\mu$ A, during 2 s and progressive increases of 100  $\mu$ A, every 5 min, until the presence of the first afterdischarge, according to Foresti et al., (2008) and Ebert & Löscher (1995). Thus, the parameters of stimulation ARK-utilized were: trains of biphasic square waves with constant intensity of 500  $\mu$ A, 1 ms pulses, delivered at 60 Hz, for a period of 10 s (EBERT; LÖSCHER, 1995; FORESTI et al., 2008).

The electrophysiological signals were recorded 5 min before and after each stimulus, with exception of the 21<sup>st</sup> stimulus in which it was recorded, only 20 s before electrical stimulation, maintaining the subsequent time (for more details, see next topic 0). These electrophysiological signals were transduced and conditioned by means of a CyberAmp (Axon Instruments), digitized (MP100, Biopac Systems) and recorded with the Acqknowledge software (Biopac Systems; Santa Barbara, USA). The parameters for recording were: total gain of 2000 times, low pass filter at 1000 Hz, high pass filter at 0.1 Hz, sampling rate at 2000 Hz and notch filter in 60 Hz, similar to Foresti et al., (2008).

### **Olfactory stimulation**

The olfactory stimulus occurred in the same chamber of the electrical stimulus, for this, 5  $\mu$ l of liquid (water or TMT) was soaked under a piece of filter paper and kept inside the chamber completely closed during 30 min (temporal and chemical parameters assessed on previous study [GARCIA-CAIRASCO et al., 2017]). Subsequently, the filter paper was removed and the animals were placed inside the chamber. After 20 s, the 21<sup>st</sup> electrical stimulation was applied and the behavioral and EEGraphic parameters were recorded. Then, the animals were removed and the exhaustion system turned on for 30 min.

### **Behavior analyses**

Limbic index (LI) for seizures was classified according to Racine's scale (1972) modified by Pinel & Rovner (1978 [Table 1]). The animals were considered fully kindled when presented at least two class 4 or one class 5 seizures during the entire protocol.

In addition, the neuroethological analysis was made by observation and recording of the temporal sequences of behavioral items presented second by second during the observation period, based on a Behavioral Glossary (Supplementary Table 1). After recording, the data collected were analyzed using the ETHOMATIC statistical software (GARCIA-CAIRASCO et al., 1992).

The following step was the execution of the sum of seizures (several animals) for each period of observation (see details below), represented graphically in the program Power Point 2010 (Microsoft), by means of flowcharts, using the calibration standard illustrated in **Erro! Fonte de referência não encontrada.A**. In the flowcharts, each rectangle represents a behavior, its height symbolizes the frequency of occurrence; its base represents the average duration of the behavior during the given observation period and the colors qualitatively identify behaviors classes (categories) or clusters (more details in the legend of **Erro! Fonte de referência não encontrada.A**).



Three periods were evaluated: (1) PRE - basal period or 5 min before the electrical stimulus (except for the 21<sup>st</sup> stimulus, with duration of 20 s); (2) STIMULUS - during the electrical stimulus with duration of 10 s, and (3) POST - 5 min after electrical stimulation (or post-ictal period).

### **EEGraphic Analysis**

The electrographic seizure activity was set as high amplitude (at least two times) over the background, present at least 3 s or more (FORESTI, 2008; PITKÄNEN et al., 2006). The occurrence of electrographic seizures (first and second afterdischarges) was evaluated at the 1<sup>st</sup> and 21<sup>st</sup> stimulus, indicating their presence or their absence for both groups: Stimulus and Water, and Stimulus and TMT. In addition, electroencephalogram (EEG) spectral analysis was performed utilizing Fast Fourier Transform (FFT) at the 21<sup>st</sup> stimulus.

### **Fast Fourier Transform (FFT)**

In order to verify if TMT presented any effect in the spectral features, we computed four features of the signal spectrum: median frequency, peak power, the frequency at the peak power and total power (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**), for all groups. Median frequency was defined as the frequency value that up to that frequency sums 50% of energy signal (**Erro! Fonte de referência não encontrada.G**). Total power is the amount of energy/power contained in the signal (**Erro! Fonte de referência não encontrada.G**). Peak power and frequency at the peak power are the maximum value of the power for a given frequency and its frequency (**Erro! Fonte de referência não encontrada.H**).

It was extracted, for each channel (AMYG, HIP, and PC), the part of the signal labeled as the first afterdischarge (for Stimulus groups), just after the 21<sup>st</sup> electrical stimulation (**Erro! Fonte de referência não encontrada.A** and **B**), while for No Stimulus groups, we considered for analysis all signal after approximately 30 s (or when the signal had mean values similar to baseline or PRE period). And for each signal, the FFT was computed (**Erro! Fonte de referência não encontrada.E**) extracting the 4 features previously described, considering the following frequency bands: theta (4-8 Hz), alpha (8-14 Hz), beta (14-30 Hz), gamma (30-100 Hz), as well as the whole spectrum (**Erro! Fonte de referência não encontrada.F**). In order to avoid recorded artifacts were included only frequencies  $\geq 4$  Hz (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**). The signals were analyzed using Python (3.7.2, programming language) software and the NumPy (1.15.4), SciPy (1.2.0) and Matplotlib (3.0.2) libraries.

### **Statistical Analyses**

LI was analyzed with Anova One Way, in order to evaluate the effectiveness of ARK, and Mann Whitney test to verify the TMT effect on seizures.

Data from the neuroethological analysis, as cited, indicated the frequency of occurrence of each item and its duration. Moreover, it provided analysis of statistical interaction between behavioral pairs (dyads) by the analysis of chi-square ( $\chi^2$ ), with interactions being considered statistically significant when  $\chi^2 \geq 3.84$ ,  $\log \chi^2 \geq 0.25$ ;  $p < 0.05$  (GARCIA-CAIRASCO et al., 1992).

The occurrence (presence or absence) of first and second afterdischarges was also statistically analyzed by  $\chi^2$  test, comparing the 1<sup>st</sup> and 21<sup>st</sup> stimulus for both groups: Stimulus and Water, and Stimulus and TMT. The statistical evaluation for the FFT analysis was performed by Mann-Whitney-U.

All values are expressed as means  $\pm$  standard error of the mean ( $\pm$ SEM). Data were analyzed using GraphPad Prism (7.0) and Matlab (2016) software. Significance level was set at  $p \leq 0.05$ .

#### ACKNOWLEDGEMENTS

To all members of the Neurophysiology and Experimental Neuroethology Laboratory (LNNE, in special to Artur Fernandes) and to the *Epilepsies with External Modification of Ictogenesis (EpExMo)* Consortium.

#### CONFLICT OF INTEREST

None declared.

#### REFERENCES

- APPLEGATE, C. D.; BURCHFIEL, J. L.; KONKOL, R. J. Kindling antagonism: effects of norepinephrine depletion on kindled seizure suppression after concurrent, alternate stimulation in rats. **Experimental neurology**, v. 94, n. 2, p. 379–90, nov. 1986.
- APPLEGATE, C. D.; KONKOL, R. J.; BURCHFIEL, J. L. Kindling antagonism : a role for hindbrain norepinephrine in the development of site suppression following concurrent , alternate stimulation. v. 407, p. 212–222, 1987.
- ASLA PITKÄNEN ASLA PITKÄNEN PHILIP SCHWARTZKROIN SOLOMON MOSHÉ. **Models of Seizures and Epilepsy**. [s.l.] Elsevier, 2006.
- BERGSTROM, R. A. et al. Automated identification of multiple seizure-related and interictal epileptiform event types in the EEG of mice. **Scientific reports**, v. 3, p. 1483, jan. 2013.
- BERTRAM, E. The Relevance of Kindling for Human Epilepsy. **Epilepsia**, v. 48, n. s2, p. 65–74, abr. 2007.
- BETTS, T. Use of aromatherapy (with or without hypnosis) in the treatment of intractable epilepsy—a two-year follow-up study. **Seizure**, v. 12, n. 8, p. 534–538, dez. 2003.

BIALER, M.; WHITE, H. S. Key factors in the discovery and development of new antiepileptic drugs. v. 9, n. JANUARY, 2010.

BOZORG, A. M.; BENBADIS, S. R. Essential oils as a cause of breakthrough seizure after temporal lobectomy. **Seizure**, v. 18, n. 8, p. 604–5, out. 2009.

BURKHARD, P. R. et al. Plant-induced seizures: reappearance of an old problem. **Journal of neurology**, v. 246, n. 8, p. 667–70, ago. 1999.

CASTRO, G. P. et al. Wistar audiogenic rats display abnormal behavioral traits associated with artificial selection for seizure susceptibility. **Epilepsy & Behavior**, v. 71, p. 243–249, jun. 2017.

CURTIS, A. L. et al. Neuropharmacology Predator stress engages corticotropin-releasing factor and opioid systems to alter the operating mode of locus coeruleus norepinephrine neurons. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 4, p. 1737–1745, 2012.

DAILEY, J. W.; NARITOKU, D. K. Antidepressants and Seizures : Clinical Anecdotes Overshadow Neuroscience. v. 2952, n. 96, p. 1323–1329, 1996.

DAY, H. E. W.; MASINI, C. V; CAMPEAU, S. The pattern of brain c-fos mRNA induced by a component of fox odor, 2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline (TMT), in rats, suggests both systemic and processive stress characteristics. **Brain research**, v. 1025, n. 1–2, p. 139–51, 29 out. 2004.

DE KLOET, E. R.; JOËLS, M.; HOLSBOER, F. Stress and the brain: from adaptation to disease. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 6, n. 6, p. 463–75, jun. 2005.

DELFINO-PEREIRA, P. et al. Intense olfactory stimulation blocks seizures in an experimental model of epilepsy. **Epilepsy and Behavior**, v. 79, 2018.

DELLA PASCHOA, O. . et al. Seizure patterns in kindling and cortical stimulation models of experimental epilepsy. **Brain Research**, v. 770, n. 1–2, p. 221–227, out. 1997.

EBERT, U.; LÖSCHER, W. Differences in mossy fibre sprouting during conventional and rapid amygdala kindling of the rat. **Neuroscience letters**, v. 190, n. 3, p. 199–202, 12 maio 1995.

EBERT, U.; LÖSCHER, W. Strong olfactory stimulation reduces seizure susceptibility in amygdala-kindled rats. **Neuroscience letters**, v. 287, n. 3, p. 199–202, 30 jun. 2000.

EFRON, R. The effect of olfactory stimuli in arresting uncinate fits. **Brain : a journal of neurology**, v. 79, n. 2, p. 267–81, jun. 1956.

EFRON, R. The conditioned inhibition of uncinate fits. **Brain : a journal of neurology**, v. 80, n. 2, p. 251–62, jun. 1957.

ENGLLOT, D. J.; BLUMENFELD, H. Consciousness and epilepsy : why are complex-partial seizures complex ? v. 177, n. 09, p. 147–170, 2009.

FEINSTEIN, B.; GLEASON, C. A.; LIBET, B. Stimulation of Locus Coeruleus in Man. **Stereotactic and Functional Neurosurgery**, v. 52, n. 1, p. 26–41, 1989.

FENDT, M.; ENDRES, T. 2,3,5-Trimethyl-3-thiazoline (TMT), a component of fox odor - just repugnant or really fear-inducing? **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 32, n. 7, p.

FENDT, M.; ENDRES, T.; APFELBACH, R. Temporary Inactivation of the Bed Nucleus of the Stria Terminalis But Not of the Amygdala Blocks Freezing Induced by Trimethylthiazoline, a Component of Fox Feces. *v. 23, n. 1, p. 23–28, 2003.*

FISHER, R. S. Animal models of the epilepsies. **Brain research. Brain research reviews**, v. 14, n. 3, p. 245–78, 1989.

FISHER, R. S. et al. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). **Epilepsia**, v. 46, n. 4, p. 470–2, abr. 2005.

FISHER, R. S. et al. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. **Epilepsia**, v. 55, n. 4, p. 475–82, 12 abr. 2014.

FITZGERALD, P. J. Is elevated norepinephrine an etiological factor in some cases of epilepsy? **Seizure**, v. 19, n. 6, p. 311–8, jul. 2010.

FORESTI, ML. **Efeito da quelação de zinco no desenvolvimento de crises epilépticas límbicas no modelo de abrasamento elétrico rápido da amígdala.** 2008. Tesis - University of São Paulo, USP, Ribeirão Preto, Brazil. 2008.

FORESTI, M. L. et al. Chelatable zinc modulates excitability and seizure duration in the amygdala rapid kindling model. **Epilepsy research**, v. 79, n. 2–3, p. 166–72, maio 2008.

GALLIOT, E. et al. Fear-like behavioral responses in mice in different odorant environments: Trigeminal versus olfactory mediation under low doses. **Behavioural processes**, v. 90, n. 2, p. 161–6, jun. 2012.

GARCIA-CAIRASCO, N., PEREIRA, P.D., BERTTI-DUTRA, P., OLIVEIRA, J.A.C., DEL VECCHIO, F., MEDEIROS, D. C. ET AL. **Behavioral, EEGraphic and chemical characterization of the anticonvulsant effects of the predator odor (TMT) in the rapid electrical kindling, a model of temporal lobe epilepsy.** Barcelone: [2017].

GARCIA-CAIRASCO, N. et al. New insights into behavioral evaluation of audiogenic seizures. A comparison of two ethological methods. **Behavioural brain research**, v. 48, n. 1, p. 49–56, 8 maio 1992.

GARCIA-CAIRASCO, N. et al. Epilepsy & Behavior The Wistar Audiogenic Rat ( WAR ) strain and its contributions to epileptology and related comorbidities : History and perspectives. **Epilepsy & Behavior**, 2017.

GASTAUT, J. L H.; GASTAUT, G. E. G. E S.; SANCHEZ, AND G. R. F. Relative Frequency of Different Types of Epilepsy : A Study Employing the Classification of the International League Against Epilepsy. p. 457–461, 1975.

GIORGI, F. S. et al. The role of norepinephrine in epilepsy: from the bench to the bedside. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 28, n. 5, p. 507–24, set. 2004.

GODDARD, G. V. The kindling model of epilepsy. **Trends in Neurosciences**, v. 6, n. July, p. 275–279, 1983.

GODDARD, G. V. Development of epileptic seizures through brain stimulation at low

intensity. **Nature**, v. 214, n. 5092, p. 1020–1, 3 jun. 1967.

GODDARD, G. V.; MCINTYRE, D. C.; LEECH, C. K. A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. **Experimental neurology**, v. 25, n. 3, p. 295–330, nov. 1969.

GOWERS W.R.. **Epilepsy and other chronic convulsive diseases**. William Wo ed. London: [1881].

HACQUEMAND, R. et al. Comparison between low doses of TMT and cat odor exposure in anxiety- and fear-related behaviors in mice. **Behavioural brain research**, v. 238, p. 227–31, 1 fev. 2013.

HACQUEMAND, R.; JACQUOT, L.; BRAND, G. Comparative Fear-Related Behaviors to Predator Odors (TMT and Natural Fox Feces) before and after Intranasal ZnSO(4) Treatment in Mice. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 4, p. 188, jan. 2010.

HORII, Y. et al. Exposure to TMT odor affects adrenal sympathetic nerve activity and behavioral consequences in rats. **Behavioural brain research**, v. 214, n. 2, p. 317–22, 25 dez. 2010.

HUGHES, J. R.; ANDY, O. J. The human amygdala. I. Electrophysiological responses to odorants. **Electroencephalography and Clinical Neurophysiology**, v. 46, n. 4, p. 428–443, abr. 1979.

HUMMEL T, HENKEL S, NEGOIAS S, GALVÁN JRB, BOGDANOV V, H.; P, HALLMEYER-ELGNER S, GERBER J, REUNER U, H. A. Olfactory bulb volume in patients with temporal lobe epilepsy. **Neuroscience Letters**, v. 511, p. 1004–1008, 2013.

ILIK, F.; PAZARLI, A. C. Reflex Epilepsy Triggered by Smell. **Clinical EEG and neuroscience**, v. 46, n. 3, p. 263–5, jul. 2015.

JALILIFAR, M. et al. Quantitative assessments of extracellular EEG to classify specific features of main phases of seizure acquisition based on kindling model in Rat. **Neuroscience Letters**, v. 656, p. 144–151, ago. 2017.

JANITZKY, K. et al. TMT predator odor activated neural circuit in C57BL / 6J mice indicates TMT-stress as a suitable model for uncontrollable intense stress. **Brain research**, v. 1599, p. 1–8, 2015.

JASEJA, H. Scientific basis behind traditional practice of application of “shoe-smell” in controlling epileptic seizures in the eastern countries. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, v. 110, n. 6, p. 535–538, jun. 2008.

JASEJA, H. Application of “shoe-smell” in controlling epileptic attacks: its origin. **Medical hypotheses**, v. 74, n. 1, p. 210, jan. 2010.

JIANG, Y. et al. Molecular profiling of activated olfactory neurons identifies odorant receptors for odors in vivo. **Nature neuroscience**, v. 18, n. 10, 2015.

JOBE, P. C.; BROWNING, R. A. The serotonergic and noradrenergic effects of antidepressant drugs are anticonvulsant, not proconvulsant. **Epilepsy & behavior : E&B**, v. 7, n. 4, p. 602–19, dez. 2005.

JOËLS, M.; BARAM, T. Z. The neuro-symphony of stress. v. 10, n. juNE, p. 459–466, 2009.

KALUEFF, A. V et al. Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. v. 17, n. January, p. 45–59, 2016.

KANDRATAVICIUS, L. et al. Animal models of epilepsy : use and limitations. p. 1693–1705, 2014.

KAY, L. M. Circuit oscillations in odor perception and memory. **Progress in brain research**, v. 208, p. 223–51, 2014.

LI, X. et al. Electrical stimulation of the olfactory mucosa : An alternative treatment for the temporal lobe epilepsy ? v. 74, p. 24–26, 2010.

LÖSCHER, W. et al. Susceptibility of different cell layers of the anterior and posterior part of the piriform cortex to electrical stimulation and kindling: comparison with the basolateral amygdala and “area tempestas”. **Neuroscience**, v. 66, n. 2, p. 265–76, maio 1995.

LÖSCHER, W. Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease-modifying drugs . A comparison of the pharmacology of kindling and post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy. v. 50, p. 105–123, 2002.

LÖSCHER, W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. **Seizure: European Journal of Epilepsy**, v. 20, n. 5, p. 359–368, 2011.

LÖSCHER, W. et al. New avenues for anti-epileptic drug discovery and development. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 12, n. 10, p. 757–76, out. 2013.

LÖSCHER, W. Fit for purpose application of currently existing animal models in the discovery of novel epilepsy therapies. **Epilepsy research**, v. 126, p. 157–84, out. 2016.

LÖSCHER, W.; BRANDT, C. Prevention or modification of epileptogenesis after brain insults: experimental approaches and translational research. **Pharmacological reviews**, v. 62, n. 4, p. 668–700, dez. 2010.

LÖSCHER, W.; EBERT, U. The role of the piriform cortex in kindling. **Progress in neurobiology**, v. 50, n. 5–6, p. 427–81, dez. 1996.

LOTHMAN, E. W. et al. Kindling with rapidly recurring hippocampal seizures. **Brain research**, v. 360, n. 1–2, p. 83–91, 23 dez. 1985.

LUNARDI, M. D. S. et al. Seizure precipitants and inhibiting factors in mesial temporal lobe epilepsy. **Journal of the neurological sciences**, v. 308, n. 1–2, p. 21–4, 15 set. 2011.

LUNARDI, M. S. et al. Olfactory stimulation induces delayed responses in epilepsy. **Epilepsy & behavior : E&B**, v. 61, p. 90–96, 23 jun. 2016.

MARRONI, S. S. et al. Neuroanatomical and cellular substrates of hypergrooming induced by microinjection of oxytocin in central nucleus of amygdala, an experimental model of compulsive behavior. **Molecular psychiatry**, v. 12, n. 12, p. 1103–17, dez. 2007.

MCNAMARA, J. O. et al. The kindling model of epilepsy: a review. **Progress in neurobiology**, v. 15, n. 2, p. 139–59, jan. 1980.



MCNAMARA, J. O. Development of new pharmacological agents for epilepsy: lessons from the kindling model. **Epilepsia**, v. 30 Suppl 1, p. S13- 8; discussion S64-8, jan. 1989.

MCNAMARA, J. O. Cellular and molecular basis of epilepsy. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 14, n. 6, p. 3413–25, jun. 1994.

MCNAMARA, J. O. Emerging insights into the genesis of epilepsy. **Nature**, v. 399, n. 6738 Suppl, p. A15-22, 24 jun. 1999.

MOBERLY, A. H. et al. Olfactory inputs modulate respiration-related rhythmic activity in the prefrontal cortex and freezing behavior. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 1528, 18 abr. 2018.

MORROW, B. A. et al. The predator odor , TMT , displays a unique , stress-like pattern of dopaminergic and endocrinological activation in the rat. **Brain Research**, v. 864, n. 1, p. 146–151, 2000.

MORROW, B. A.; ELSWORTH, J. D.; ROTH, R. H. Fear-like biochemical and behavioral responses in rats to the predator odor, TMT, are dependent on the exposure environment. **Synapse (New York, N.Y.)**, v. 46, n. 1, p. 11–8, out. 2002.

NEVALAINEN, O. et al. Epilepsy-related clinical characteristics and mortality: a systematic review and meta-analysis. **Neurology**, v. 83, n. 21, p. 1968–77, 18 nov. 2014.

NGUYEN, M. Q.; RYBA, N. J. P. A smell that causes seizure. **PloS one**, v. 7, n. 7, p. e41899, jan. 2012.

NOEBELS JL, AVOLI M, ROGAWSKI MA, OLSEN RW, D.-E. A. **Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies**. 4th. ed. [s.l: s.n.].

PHELAN, K. D. et al. Pilocarpine-induced status epilepticus in mice: A comparison of spectral analysis of electroencephalogram and behavioral grading using the Racine scale. **Epilepsy Research**, v. 117, p. 90–96, 2015.

PICOT, M.-C. et al. The prevalence of epilepsy and pharmaco-resistant epilepsy in adults: a population-based study in a Western European country. **Epilepsia**, v. 49, n. 7, p. 1230–8, jul. 2008.

PINEL, J. P.; ROVNER, L. I. Experimental epileptogenesis: kindling-induced epilepsy in rats. **Experimental neurology**, v. 58, n. 2, p. 190–202, 15 jan. 1978.

RACINE, R. J. Modification of seizure activity by electrical stimulation. I. After-discharge threshold. **Electroencephalography and clinical neurophysiology**, v. 32, n. 3, p. 269–79, mar. 1972a.

RACINE, R. J. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. **Electroencephalography and clinical neurophysiology**, v. 32, n. 3, p. 281–94, mar. 1972b.

RESTREPO, D.; HELLIER, J. L.; SALCEDO, E. Complex metabolically demanding sensory processing in the olfactory system: Implications for epilepsy. **Epilepsy and Behavior**, p. 6–11, 7 out. 2013.

RODRIGUES, M. C. A. et al. Correlation between shaking behaviors and seizure severity in five animal models of convulsive seizures. **Epilepsy & behavior : E&B**, v. 6, n. 3, p. 328–36,

SATO, M.; RACINE, R. J.; MCINTYRE, D. C. Kindling: basic mechanisms and clinical validity. **Electroencephalography and clinical neurophysiology**, v. 76, n. 5, p. 459–72, nov. 1990.

SAYIN, U. et al. Spontaneous seizures and loss of axo-axonic and axo-somatic inhibition induced by repeated brief seizures in kindled rats. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 23, n. 7, p. 2759–68, 1 abr. 2003.

SHIN NAGAYAMA, ALLICIA ENERVA, MAX L. FLETCHER, A. V. M.; , KEI M. IGARASHI, K. M.; CHEN, AND W. R. Differential axonal projection of mitral and tufted cells in the mouse main olfactory system. v. 4, n. September, p. 1–8, 2010.

SILVA-FILHO, A. R.; PIRES, M. L.; SHIOTSUKI, N. Anticonvulsant and convulsant effects of organic solvents. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 41, n. 1, p. 79–82, jan. 1992.

SIMONATO, M. et al. The challenge and promise of anti-epileptic therapy development in animal models. **The Lancet. Neurology**, v. 13, n. 9, p. 949–60, set. 2014.

SKALLI, S.; SOULAYMANI BENCHEIKH, R. Epileptic seizure induced by fennel essential oil. **Epileptic disorders : international epilepsy journal with videotape**, v. 13, n. 3, p. 345–7, set. 2011.

SPINELLA, M. Herbal Medicines and Epilepsy: The Potential for Benefit and Adverse Effects. **Epilepsy & behavior : E&B**, v. 2, n. 6, p. 524–532, dez. 2001.

STAFSTROM, C. E. Seizures in a 7-month-old child after exposure to the essential plant oil thuja. **Pediatric neurology**, v. 37, n. 6, p. 446–8, dez. 2007.

STETTLER, D. D.; AXEL, R. Representations of odor in the piriform cortex. **Neuron**, v. 63, n. 6, p. 854–64, 24 set. 2009.

T. TAKAHASHI. Seizures induced by odorous stimuli. **Clin EEG**, v. 17, p. 769, 1975.

TAKAHASHI, L. K. Olfactory systems and neural circuits that modulate predator odor fear. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 8, n. March, p. 72, jan. 2014.

TANK, A. W.; LEE WONG, D. Peripheral and central effects of circulating catecholamines. **Comprehensive Physiology**, v. 5, n. 1, p. 1–15, jan. 2015.

VALENTINE, P. A.; FREMIT, S. L.; TESKEY, G. C. Sensory stimulation reduces seizure severity but not afterdischarge duration of partial seizures kindled in the hippocampus at threshold intensities. **Neuroscience Letters**, v. 388, n. 1, p. 33–38, 4 nov. 2005.

VERNET-MAURY, E. **Trimethyl-thiazoline in fox feces: a natural alarming substance for the rat**. Washington, DC: [s.n.].

VERNET-MAURY, E.; POLAK, E. H.; DEMAEL, A. Structure-activity relationship of stress-inducing odorants in the rat. **Journal of chemical ecology**, v. 10, n. 7, p. 1007–18, jul. 1984.

VISMER, M. S. et al. The piriform, perirhinal, and entorhinal cortex in seizure generation. **Frontiers in neural circuits**, v. 9, p. 27, jan. 2015.



WALLACE, K. J.; ROSEN, J. B. Neurotoxic lesions of the lateral nucleus of the amygdala decrease conditioned fear but not unconditioned fear of a predator odor: comparison with electrolytic lesions. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 21, n. 10, p. 3619–27, 15 maio 2001.

WEST, S. E.; DOTY, R. L. Influence of Epilepsy and Temporal Lobe Resection on Olfactory Function. v. 36, n. 6, p. 531–542, 1995.

WIEBE, S. Epidemiology of Temporal Lobe Epilepsy. p. 6–10, 2000.

WOOD, R. W. et al. Anticonvulsant and antipunishment effects of toluene. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 230, n. 2, p. 407–12, ago. 1984.

ZIBROWSKI, E. M.; VANDERWOLF, C. H. Oscillatory fast wave activity in the rat pyriform cortex: relations to olfaction and behavior. **Brain research**, v. 766, n. 1–2, p. 39–49, 22 ago. 1997.

## TABLES

**Table 1.** Severity index with behavioral descriptions according to Limbic index (LI) or Racine scale (1972) modified by Pinel & Rovner (1978)

0= Immobility
1= Facial automatism
2= Head myoclonia
3= Forelimbs myoclonia
4= Rearing
5= Rearing and falling
6= More than three fallings
7= Running and/or Jumping (Wild running)
8= Tonic-clonic seizures

**Supplementary Table 1.** *p*-value during the POST stimulus period, indicating the evolution of rapid electrical kindling of **Erro! Fonte de referência não encontrada.B**

1 <sup>st</sup> versus 16 <sup>th</sup>	*	3 <sup>rd</sup> versus 19 <sup>th</sup>	*
1 <sup>st</sup> versus 19 <sup>th</sup>	**	4 <sup>th</sup> versus 19 <sup>th</sup>	*
2 <sup>nd</sup> versus 12 <sup>th</sup>	*	5 <sup>th</sup> versus 12 <sup>th</sup>	*
2 <sup>nd</sup> versus 14 <sup>th</sup>	*	5 <sup>th</sup> versus 14 <sup>th</sup>	*
2 <sup>nd</sup> versus 15 <sup>th</sup>	*	5 <sup>th</sup> versus 15 <sup>th</sup>	*
2 <sup>nd</sup> versus 16 <sup>th</sup>	**	5 <sup>th</sup> versus 16 <sup>th</sup>	**
2 <sup>nd</sup> versus 18 <sup>th</sup>	*	5 <sup>th</sup> versus 18 <sup>th</sup>	*
2 <sup>nd</sup> versus 19 <sup>th</sup>	***	5 <sup>th</sup> versus 19 <sup>th</sup>	***
2 <sup>nd</sup> versus 20 <sup>th</sup>	*	5 <sup>th</sup> versus 20 <sup>th</sup>	*
3 <sup>rd</sup> versus 16 <sup>th</sup>	*	9 <sup>th</sup> versus 19 <sup>th</sup>	*

Anova One Way, Fridman Test, Dunn's Post Test: \**p*<0.05; \*\**p*<0.01 and \*\*\**p*<0.001.

**Supplementary Table 2.** Dictionary of some of the behavioral items and their corresponding acronyms, observed in this study (GARCIA-CAIRASCO et al., 1992)

Acronyms	English Description
AF	Atonic Falling

---

AR	Arousal
AS	Abdominal Spasms
EB	Eye Blinking
ER	Erect Posture
EXC	Excretion of Feces
EXT	Extension
FALL	Falling
FR	Freezing
GN	Gnawing
GL	Gyrating, Left
GR	Gyrating, Right
GRF	Grooming of Face
GRG	Grooming of Genitals
GRH	Grooming of Head
GRR	Grooming of Body, Right
GRL	Grooming of Body, Left
IM	Immobility
JP	Jumping
LCL <sub>1</sub>	Licking of Claws Left, hindlegs
LCL <sub>2</sub>	Licking of Claws right, Forelegs
LCR <sub>1</sub>	Licking of Claws right, hindlegs
LCR <sub>2</sub>	Licking of Claws right, forelegs
LI	Licking
LIC	Licking of Claws
LY	Lying Posture
MT	Masticatory Movements
MYO <sub>1</sub>	Myoclonus Spasms, forelegs
MYO <sub>2</sub>	Myoclonus Spasms, hindlegs
MYO <sub>g</sub>	Generalized Myoclonus
MYO <sub>h</sub>	Myoclonus Spasms, Head
NOD	Nodding
PIM	Postictal Immobility
PIV	Pivoting
REAR	Rearing
RU	Running
SAL	Salivation
SC	Scanning
SCRL	Scratching of Body, Left
SCR	Scratching of Body, Right
SH	Head Shaking
SN	Sniffing
STA	Startle
TNBL	Tonic Neck and Body Turning Left
WA	Walking
WDS	Wet Dog Shaking
WI	Withdraw
YA	Yawning

---











