

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

CARMEM LÚCIA DE ARROXELAS SILVA

Efeito do Solutol[®] HS 15 na fase aguda da epileptogênese em modelo experimental de
epilepsia do lobo temporal

Maceió

2019

CARMEM LÚCIA DE ARROXELAS SILVA

Efeito do Solutol[®] HS 15 na fase aguda da epileptogênese em modelo experimental de epilepsia do lobo temporal

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Dainel Leite Góes Gitaí

Maceió

2019

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecário: Marcelino de Carvalho

S586e Silva, Carmem Lúcia de Arroxelas.
Efeito do solutol[®]HS 15 na fase aguda da epileptogênese em modelo experimental de epilepsia do lobo temporal / Carmem Lúcia de Arroxelas
Silva . – 2019.

l.

Orientador: Daniel Leite Góes Gitaí.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Maceió, 2019.

Bibliografia: f. 42-47.

Anexo: f. 48.

1. Epilepsia do lobo temporal. 2. Solutol[®]HS 15. 3. Neuroproteção. I. Título.

CDU: 616.853



Folha de Aprovação

Carmem Lúcia de Arroxelas Silva

Efeito do solutol HS 15 na fase aguda da epileptogênese em modelo experimental de epilepsia do lobo temporal

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 20 de Fevereiro de 2019.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Daniel Leite Góes Gitaí (Orientador)

Prof. Dr. Olagide Wagner de Castro - (UFAL)

Prof.ª Dr.ª Mykaëlla Andrade de Araújo - (Faculdade Pitágoras)

DEDICATÓRIA

Aos pacientes com Epilepsia do Lobo Temporal;

Aos animais utilizados para a realização deste estudo;

Aos meus pais, que são o motivo da minha existência e sempre apoiaram.

AGRADECIMENTOS

Ao longo da minha trajetória nessa fase chamada pós-graduação, mestrado em Ciências da Saúde, eu tive a ajuda direta e indireta de pessoas que me incentivaram, inspiraram e me acalmaram em meus momentos de crises de ansiedade, momentos de pensamentos de incapacidade, pessoas que com suas características únicas foram essenciais para a concretização dessa etapa da minha vida.

Sou grata a várias pessoas, dentre as quais:

Ao meu orientador Prof. Dr. Daniel Gitaí, pois me deu a oportunidade de fazer parte do seu Grupo de Pesquisa e me ensinou a ser pesquisadora, sempre mostrando que Ciência não é brincadeira e que para ser pesquisador é necessário muita dedicação e responsabilidade. Uma pessoa muito inteligente, disponível e ama o que faz, sendo assim, uma inspiração. Agradeço por confiar na minha capacidade, me apoiar e motivar a ser cada dia melhor.

Ao Prof. Dr. Olagide Castro, outra pessoa incrível que me ajudou a sempre pensar que por mais que as coisas pareçam difíceis, sempre existe do lado bom de tudo que nos acontece. Agradeço pelo aprendizado que me proporcionou, pelo apoio e motivação.

Aos meus amigos do Laboratório de Biologia Celular e Molecular, Gabriele Fernanda, Pedro Augusto, Júnior Davi, Wanessa Pereira, Mykaella Araújo, pois me ensinaram muito sobre essa vida científica, me ajudaram conforme suas disponibilidades e sempre me motivaram e alegraram nos momentos difíceis dessa jornada científica. Obrigada por tornar os experimentos mais simples de se fazer, pois eu sabia que tinha a ajuda de grandes pessoas e, além disso, obrigada pelos conselhos nos momentos que surgiram aquelas dúvidas cruéis do que fazer para as coisas darem certo e por terem se tornado meus amigos para toda uma vida.

À minha mãe, Maria da Glória, que durante essa etapa da minha vida foi extremamente importante, fez de tudo que podia para me ajudar, me apoiou e sempre cuidou de mim. Nenhuma palavra e ações são o suficiente para demonstrar meu amor e agradecimento.

Ao meu pai, José Severino, que também foi muito importante para mim, mesmo não tendo um alto grau de estudo, sempre me apoiou, se preocupou com meu bem-estar, não sei o que seria sem meu pai herói que amo tanto, deixo aqui meus sinceros agradecimentos.

Ao meu irmão, Carlos Antônio, que mesmo morando longe para alcançar seu sonho de ser Médico e com a correria da vida, sempre esteve ao meu lado, cuidando de mim, nos momentos das minhas indecisões, ele me ouviu e aconselhou ajudando a escolher o melhor caminho para mim, agradeço ao meu pequeno grande irmão por todo o apoio e ajuda durante essa trajetória.

Ao meu namorado, Mariel Matias, que me mostrou como é bom ter em uma mesma pessoa o melhor amigo, companheiro, cúmplice, o amor da nossa vida. Muitas vezes foi minha “válvula de escape” dos dias pesados, dias cheios de estresse e ansiedade, ele sempre esteve comigo mesmo não estando fisicamente, sendo minha companhia diária, sou muito grata pela confiança, compreensão, apoio e conselhos.

Aos meus amigos Alessandro César, Valdemir Costa e Jennifer Abílio, eu só tenho a agradecer e muito pelo companheirismo, os dias de risadas, os compartilhamentos das tristezas, a paciência e apoio. Vocês estiveram sempre comigo nos momentos bons e ruins dessa fase da minha vida, vocês foram e são essenciais para mim.

E claro, aos meus cachorros, Tobias que sempre quando chego em casa me recebe com sua alegria e amor, meu companheirinho das madrugadas em claro e dos dias não muito bons. E ao Tó que já não está mais entre nós, mas nos seus 12 anos de vida sempre esteve ao meu lado, meu anjinho que nunca esquecerei e que eu amo e sinto falta.

*A todos que me ajudaram a concluir essa etapa da minha vida... **SOU MUITO GRATA!***

Obrigada meu bom e fiel Deus, sei que muitas vezes eu me afastei de Ti, mas o Senhor, com toda sua misericórdia, me ama e me abençoa sempre.

*Não são as coisas mais bonitas que marcam
nossas vidas, mas sim as pessoas que têm o dom
de jamais serem esquecidas. (Autor
desconhecido).*

RESUMO

Epilepsia é uma desordem neurológica caracterizada pela ocorrência de crises epiléticas recorrentes e espontâneas (CREs) que afeta aproximadamente 50 milhões de pessoas no mundo. A Epilepsia do Lobo Temporal (ELT) é o tipo mais comum e apresenta alto índice (40%) de refratariedade ao tratamento farmacológico. Há uma necessidade urgente, portanto, da busca de novos fármacos e alternativas terapêuticas. Solutol[®] HS 15 (SOL) é uma substância sintética utilizada como veículo de fármacos que tem apresentado efeito inibitório no influxo de cálcio em cultura de célula neural e neuroprotetor em modelo experimental de isquemia cerebral. Nossa hipótese é de que o Solutol[®] HS 15 apresente uma ação anticonvulsivante e neuroprotetora em modelo experimental de ELT. Esse estudo objetivou avaliar o efeito do Solutol[®] HS 15 no *Status Epilepticus* (SE) e na neurodegeneração presente na fase aguda da epileptogênese. Para isso, ratos machos *Wistar* foram divididos em 4 grupos experimentais: 1. grupo SOL+Li-PILO: microinjeção intrahipocampal (i.h.) de 1 μ L de Solutol[®] HS 15 (1,6 mg/Kg, n= 10) e 2. grupo SAL+Li-PILO: microinjeção (i.h.) de 1 μ L de solução salina (0,9%, n=7) 30 minutos antes da injeção intraperitoneal (i.p.) de pilocarpina (30mg/Kg). A ação da pilocarpina foi potencializada pela administração (i.p.) de cloreto de lítio (127 mg/Kg) 16 horas antes da administração da pilocarpina; 3. grupo SOL: microinjeção (i.h.) de Solutol[®] HS 15 (1,6 mg/Kg, n= 5) e 4. grupo SHAM (n=5). Para as análises do perfil das crises, os animais foram vídeo monitorados durante a latência e 90 minutos de SE. A avaliação da neurodegeneração foi feita através de histoquímica com Fluoro-Jade 24 horas após o SE. As análises de histoquímica foram direcionadas para as sub-regiões da formação hipocampal (Corno de Ammon: CA1 e CA3; e Hilo). As análises estatísticas foram realizadas através de teste *t Student* (GraphPad, Prism 6.0). Os animais do grupo SOL+Li-PILO apresentaram diminuição significativa da quantidade de crises durante o SE (38%) quando comparados ao do grupo SAL+Li-PILO (62%) (p= 0,010) e diminuição significativa da quantidade de marcação de neurônios fluoro-jade positivos (FJ+) na região CA3 do hipocampo ipsilateral (ips.) e contralateral (con.) (SOL+Li-PILO: ips. 27% e con. 32%; SAL+Li-PILO: ips. 73% e con. 68%) (ips. p= 0,026 e con. p=0,010). Os animais do Grupo SOL e SHAM. não apresentaram neurônios JF+. Solutol[®] HS 15 apresenta efeito inibitório nas crises durante SE e na neurodegeneração hipocampal presente na fase aguda da epileptogênese em modelo experimental de ELT. Os dados são promissores para investigar o potencial do Solutol[®] HS 15 quanto ao papel anticonvulsivante em animais com CREs.

Palavras-chave: Epilepsia do Lobo Temporal. Solutol HS 15. Neuroproteção.

ABSTRACT

Epilepsy is a neurological disorder characterized by the occurrence of recurrent and spontaneous epileptic seizures (SEs) that affects approximately 50 million people worldwide. Temporal Lobe Epilepsy (TLE) is the most common type and presents a high index (40%) of refractoriness to pharmacological treatment. There is an urgent need, therefore, for the search for new drugs and therapeutic alternatives. Solutol® HS 15 (SOL) is a synthetic substance used as a drug carrier that has shown an inhibitory effect on calcium influx in neural cell culture and neuroprotective in an experimental model of cerebral ischemia. Our hypothesis is that Solutol® HS 15 has an anticonvulsive and neuroprotective action in an ELT experimental model. This study aimed to evaluate the effect of Solutol® HS 15 on *Status Epilepticus* (SE) and neurodegeneration present in the acute phase of epileptogenesis. For this, male Wistar rats were divided into 4 experimental groups: 1. SOL + Li-PILO group: intrahippocampal microinjection (ih) of 1µL of Solutol® HS 15 (1.6 mg / kg, n = 10) and 2. SAL + Li-PILO group: microinjection (1hL) of saline solution (0.9%, n = 7) 30 minutes before intraperitoneal (ip) injection of pilocarpine (30mg / kg). The action of pilocarpine was potentiated by administration (i.p.) of lithium chloride (127 mg / kg) 16 hours prior to administration of pilocarpine; 3. SOL group: microinjection (i.h) of Solutol® HS 15 (1.6 mg / kg, n = 5) and 4. SHAM group (n = 5). For the analyzes of the crisis profile, the animals were video monitored during latency and 90 minutes of SE. The evaluation of neurodegeneration was done by Fluoro-Jade histochemistry 24 hours after SE. Histochemistry analyzes were directed to sub-regions of hippocampal formation (Horn of Ammon: CA1 and CA3; and Hilo). Statistical analyzes were performed using Student t test (GraphPad, Prism 6.0). The animals in the SOL + Li-PILO group had a significant decrease in the number of seizures during SE (38%) compared to the SAL + Li-PILO group (62%) ($p = 0.010$) and a significant decrease in the amount of (FJ +) neurons in the CA3 region of the ipsilateral (ips.) and contralateral (con.) hippocampus (SOL + Li-PILO: ips 27% and with 32%; SAL + Li-PILO: ips. 68%) (ips $p = 0.026$ and con. $p = 0.010$). The animals of the SOL and SHAM Group. did not present JF + neurons. Solutol® HS 15 has an inhibitory effect on seizures during SE and hippocampal neurodegeneration present in the acute phase of epileptogenesis in an ELT experimental model. The data are promising to investigate the potential of Solutol® HS 15 for anticonvulsive role in animals with CREs.

Keywords: Temporal Lobe Epilepsy. Solutol HS 15. Neuroprotection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Anatomia hipocampal de rato evidenciando as sub-regiões CA1, CA3 e HILO

Figura 2 - Desenvolvimento Cronológico dos Fármacos Antiepilépticos.

Figura 3 - Estrutura química do Solutol[®] HS 15.

Figura 4 - Representação esquemática do delineamento experimental.

Figura 5 - Total de crises durante SE.

Figura 6 - Total de cada tipo de crises durante SE.

Figura 7 - Doses de diazepam.

Figura 8 - Efeito do Solutol[®] HS 15 na neurodegeneração nas regiões CA1, CA3 e Hilo do hipocampo 24h após SE.

Figura 9 - Redução da marcação de neurônios FJ positivos em CA3 no hipocampo contralateral e ipsilateral.

Figura 10 - Comparação entre os do perfil de neurogeneração entre os hipocampus contralateral e ipsilateral de cada sub-região dos grupos SAL+LiPILO e SOL+Li-PILO.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resumo da nova classificação etiológica da epilepsia segundo a ILAE.

Tabela 2. Modelo experimental de epilepsia do lobo temporal induzida por pilocarpina.

Tabela 3. Grupos experimentais.

Tabela 4. Escala de Racine.

Tabela 5. Efeito do Solutol[®] HS 15 antes do início do SE.

Tabela 6. Quantificação de neurônios FJ+ em CA1 e Hilo.

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

AP: Antero Posterior

CA: Corno de Ammon

CEUA: Comissão de Ética de Uso de Animais

CREs: Crises Epilépticas Espontâneas e Recorrentes

DV: Dorso Ventral

ELT: Epilepsia do Lobo Temporal

ELTM: Epilepsia do Lobo Temporal Mesial

ROs: Espécies Reativas de Oxigênio

FAE: Fármaco Antiepiléptico

FJ: Fluoro-Jade

I.H.: Intra-hipocampal

ILAE: Liga International Contra Epilepsia

I.P.: Intraperitoneal

Li: Lítio

ML: Médio Lateral

NMDA: N-metilD-aspartato

PEG: Polietilenoglicol

PFA: Paraformaldeído

PILO: Pilocarpina

SE: *Status Epilepticus*

SNC: Sistema Nervoso Central

SOL: Solutol[®] HS 15

OCT: Transportador de cátion orgânico

OATO: polipeptídeos transportadores de ânions orgânicos

NTCP: proteínas co-transportadoras de Na⁺ dependente como taurocolato

PEPT: Transportador de polipeptídeo

SUMÁRIO

| | | |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1. | INTRODUÇÃO..... | 15 |
| 2. | REVISÃO DE LITERATURA | 17 |
| 2.1. | Breve história da epilepsia | 17 |
| 2.2. | Classificação das epilepsias | 18 |
| 2.3. | Epilepsia do Lobo Temporal..... | 20 |
| 2.4. | Modelo Experimental Animal | 22 |
| 2.5. | Tratamento da epilepsia | 23 |
| 2.6. | Solutol® HS 15..... | 25 |
| 3. | OBJETIVOS..... | 27 |
| 3.1. | Geral: | 27 |
| 3.2. | Específicos: | 27 |
| 4. | MATERIAIS E MÉTODOS | 28 |
| 4.1. | Animais e divisão dos grupos experimentais..... | 28 |
| 4.2. | Cirurgia estereotáxica para implante de cânula | 29 |
| 4.3. | Microinjeção do Solutol® HS 15 e Indução do <i>Status Epilepticus</i> (SE):..... | 29 |
| 4.4. | Perfil das Crises Epilépticas durante <i>Status Epilepticus</i> | 30 |
| 4.5. | Eutanásia por perfusão transcardial | 30 |
| 4.6. | Pós-fixação e congelamento dos cérebros | 30 |
| 4.7. | Cortes histológicos..... | 31 |
| 4.8. | Histoquímica por Fluoro-Jade | 31 |
| 4.9. | Análise Estatística..... | 32 |
| 5. | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 33 |
| 5.1. | Análise do efeito do Solutol® HS 15 no <i>Status Epilepticus</i> (SE) | 33 |
| 5.2. | Análise do efeito do Solutol® HS 15 na neurodegeneração necrótica que ocorre na fase aguda da epileptogênese | 37 |
| 5.3. | Perspectivas do uso do excipiente Solutol® HS 15 na fase crônica da epileptogênese | 40 |
| 6. | CONCLUSÃO | 43 |
| | REFERÊNCIAS | 44 |
| | ANEXOS | 50 |

1. INTRODUÇÃO

Epilepsia é uma desordem neurológica caracterizada pela ocorrência de crises epiléticas recorrentes e espontâneas (CREs) decorrentes de atividade neuronal excessiva e hipsincrônica (MAcNAMARA, 1994). De acordo com a etiologia, as epilepsias podem ser classificadas como estruturais, genéticas, infecciosas, imunológicas e de causas desconhecidas (SCHEFFER, 2017). As epilepsias são classificadas como estruturais quando são causadas por lesões no sistema nervoso central, tais como traumatismo craniano, tumor cerebral, isquemias cerebrais, *status epilepticus* (SE), dentre outros. O tipo mais frequente dentre as epilepsias estruturais na população adulta é a Epilepsia do Lobo Temporal (ELT) (BERG et al., 2010). A ELT é caracterizada pela ocorrência de crises epiléticas que se iniciam em estruturas do lobo temporal, como hipocampo, complexo amigdalóide e adjacências (SCHWABE et al., 2000).

Na ELT, os indivíduos sofrem um insulto inicial (convulsão febril, traumatismo craniano, isquemia cerebral, SE) (FRENCH et al., 1993) que podem desencadear a epileptogênese que corresponde ao processo pelo qual o cérebro que era anteriormente normal é alterado de modo a gerar CREs (DUDEK; STALEY, 2012). Assim, logo após o insulto inicial, ocorre uma lesão hipocampal acompanhada de neurodegeneração aguda (BUMANGLAG; SLOVITER, 2008) e mecanismos secundários tardios como reorganização sináptica, neurogênese, alterações estruturais, neuroquímicas e de conexão entre neurônios que ocorrem no chamado período de latência e conferem ao cérebro uma susceptibilidade endógena e permanente de gerar CREs e, assim, o indivíduo passa a ser portador de epilepsia (LEITE et al., 1990).

A epileptogênese tem sido mimetizada em animais através da administração local ou sistêmica de substâncias convulsivantes, como a pilocarpina (PILO) ou o ácido cáínico (CAVALHEIRO et al., 1982). A PILO pode resultar no SE e período de latência, tornando o cérebro susceptível a ocorrência das primeiras CREs que acontecem de forma variada podendo ser entre dias ou semanas após a reversão do SE. Os animais, então, passam a ser portadores de epilepsia (fase crônica da epileptogênese) (TURSKI et al., 1983). Neste modelo, o Lítio pode ser utilizado para potencializar a ação da PILO estimulando o aumento dos receptores dopaminérgicos e dos receptores colinérgicos muscarínicos na superfície das células (DE BRUIN et al., 2000), sendo chamado de modelo experimental de epilepsia do lobo temporal induzido por Lítio-Pilocarpina (Li-PILO).

Em relação ao tratamento da epilepsia, o objetivo é o controle completo das crises. A administração de Fármaco Antiepilético (FAE), por meio da monoterapia é considerada como

a primeira opção de tratamento visto que 47% dos pacientes com ELT apresentam crises controladas com apenas um FAE, mas 13% necessitam receber um segundo FAE para alcançar o controle. Entretanto, cerca de 40% dos pacientes continuam a apresentar crises epilépticas apesar do tratamento farmacológico, sendo classificados como pacientes com epilepsia refratária (KWAN; BRODIE, 2000). A ELT é um tipo de epilepsia refratária (TÉLLEZ-ZENTENO;HERNÁNDEZ-RONQUILLO, 2012) e essa condição afeta diretamente a qualidade de vida tanto fisicamente quanto psicologicamente (JACOB; BAKER. 2008). Assim, houve um crescente desenvolvimento de fármacos antiepilépticos (FAEs) nos últimos anos, por meio de uma ação conjunta entre pesquisadores, médicos e indústrias, impulsionado pela eficácia limitada de FAEs como carbamazepina, etossuximida, fenobarbital, fenitoína e ácido valpróico (GOLYALA; KWAN, 2017) na tentativa de uma terapia farmacológica mais eficaz. Portanto, grupos de pesquisas realizam a busca de novas drogas tanto sintéticas quanto naturais para o tratamento da ELT.

O Solutol[®] HS 15 é uma substância sintética formada pela reação entre o Ácido 12-hidroxiesterárico e o Polietilenoglicol que produz o ácido 12-hidroxiesteárico polioxetilado ou Solutol[®] HS 15. É altamente solúvel e estável em solução aquosa, sendo um solubilizante não iônico e agente emulsionante clinicamente utilizado para solubilizar drogas, tais como vitaminas, miconazol, alfaxalona, nifedipina, piroxicam (KU; VELAGALETI, 2010). O excipiente farmacêutico Solutol[®] HS 15 apresenta efeitos biológicos dentre os quais inibe os transportadores de cátions orgânicos (OTC 1-3) e os transportadores de oligopeptídeos (PEPT 1 e 2) (OTTER et al., 2017). Chauvet e colaboradores (2015) relataram que nanocápsulas lipídicas contendo Solutol[®] HS15 podem influenciar a sinalização celular de cálcio no cérebro, pois causam inibição do transporte de cálcio através de canais ativados por hiperforina em células neurais. Além do mais, o pré-tratamento e tratamento com Solutol[®] HS 15 pela via intraperitoneal em ratos confere neuroproteção em modelo de isquemia cerebral focal e global (LIN et al., 2014). Esses achados podem ter implicações clínicas importantes no tratamento da ELT. Neste estudo testamos a hipótese de que o Solutol[®] HS 15 apresenta um efeito anticonvulsivante e neuroprotetor em modelo experimental de SE induzido através da injeção intraperitoneal de lítio-pilocarpina.

Portanto, sabendo que a epileptogênese acompanha um processo de neurodegeneração no hipocampo que culmina no desequilíbrio excitatório/inibitório e considerando a necessidade de terapêuticas alternativas para a ELT, os resultados oriundos deste estudo podem ser de grande potencial para o tratamento da ELT.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Breve história da epilepsia

Medo, dificuldades em relacionamentos amorosos, restrições em atividades diárias, baixa qualidade de vida, representa a realidade de muitas pessoas que são portadoras de epilepsia devido ao preconceito e ao estigma que as levam a terem vergonha de si próprios (FERNANDES, 2005). Isso acontece, principalmente, pela visão equivocada sobre a epilepsia que se consolidou em um passado envolto de superstições, mitos e preconceitos (MOREIRA, 2014) que promovem para as descendências das sociedades reflexos negativos causados pela falta de informações necessárias (SILVA; FILHO, 2014). A própria origem da palavra epilepsia desencadeia preconceito, uma palavra de origem grega *epilambaneim* que significa ser invadido, dominado ou possuído (FERNANDES; LI, 2006). Para o melhor entendimento dos estigmas em epilepsia, faz-se mister uma volta ao passado, conhecer como as antigas civilizações viam e viviam com as pessoas com epilepsia.

Em cada civilização, as pessoas tinham pensamentos diferentes em relação a ocorrência das crises epilépticas. Na Roma Antiga, as pessoas com epilepsia eram evitadas por medo de contágio. Por outro lado, a epilepsia, na Grécia Antiga, era considerada *morbis sacer* (doença sagrada) associada a possessões divinas e os portadores eram colocados em templos, acreditava-se que quando uma pessoa tinha uma convulsão ela era tocada por Deuses. Porém, na Idade Média, era considerada *morbis demoniacus* (doença do demônio), as pessoas portadoras da epilepsia eram segregadas da igreja, não podendo participar da eucaristia para que não contagiassem ou profanassem o copo e o prato da comunhão (YACUBIAN, 2000). Ainda na Idade Média, foi elaborado um manual de caça às bruxas chamado *Malleus maleficarum* no qual era considerado que a ocorrência de crises epilépticas estava associada à feitiçaria levando muitas pessoas com epilepsia a pena de morte por serem acusadas de bruxaria (MASIA; DEVINSKY, 2000). Ademais, nesse período, alguns médicos suspeitavam que a contaminação ocorria por meio da respiração e essa crença prevaleceu ainda no início do século XX, quando se preconizou a vacinação para erradicação de um microrganismo o qual seria o agente da epilepsia, *Bacillus epilepticus* (YACUBIAN, 2000).

Entretanto, Hipócrates não concordava com o pensamento de que epilepsia tinha relação com questões divinas, ele a definiu como uma doença de causas naturais (GOMES, 2006), mas que o cérebro era responsável por essa doença. Muitos anos depois, Galeno, reafirmou que se tratava de uma doença do cérebro e separou as epilepsias em dois tipos, as de causas desconhecidas e as que eram resultado de outras doenças (DREIFUSS, 1996). Após a

consideração de Hipócrates, os médicos da Grécia Antiga, em seus escritos sobre a epilepsia, fizeram a diferenciação historicamente importante entre religião, magia e ciência. (RIGGS; RIGGS, 2005), criando espaço, dessa forma, para explicações científicas do que de fato é epilepsia e suas causas. As teorias mais modernas sobre as causas da epilepsia começaram a ocorrer a partir dos séculos XVIII e XIX (GOMES 2006).

Segundo Weisz (2003), foi ao longo do século XIX que houve um desenvolvimento científico das ciências médicas nas áreas de Anatomia, Fisiologia, Patologia, Terapêutica e Cirurgia, nesse período, a Neurologia se separou da Psiquiatria (SIDIROPOULOU et al, 2010). Assim, hipóteses e teorias para esclarecer os mecanismos envolvidos na epilepsia se intensificaram (MAGIORKINIS et al, 2011). E foi John Hughlings Jackson, considerado o pai da epilepsia, quem descreveu que as crises epiléticas teriam origem no córtex cerebral, como consequência de uma “descarga” de energia nos neurônios corticais. Portanto, segundo ele, uma convulsão era um sintoma que ocorre após uma descarga desordenada, excessiva e ocasional do tecido nervoso nos músculos.

Quanto à etiologia da epilepsia, Jackson considerou, como uma anomalia nutricional do sistema nervoso, que levaria a um nível anormal de energia armazenada. Além disso, outros fatores poderiam estar na sua origem como tumor, a sífilis ou um acidente vascular cerebral isquêmico ou hemorrágico (SHORVON, 2014). O seu trabalho foi continuado pelos seus contemporâneos e seguidores, que acabariam por confirmar, experimentalmente, os achados clínicos de Jackson. Este período foi marcado, então, pela origem da compreensão moderna da natureza da epilepsia (EADIE, 1995). Assim, epilepsia é definida como um distúrbio cerebral causado pela predisposição permanente do cérebro em gerar CRES acompanhadas de consequências neurobiológicas, cognitivas e sociais (FISHER et al, 2005).

2.2. Classificação das epilepsias

Existem vários tipos de epilepsia que são classificadas de acordo com sua etiologia. Desde que a epilepsia não é uma entidade nosológica única, mas advém de várias condições diferentes que ocasionam disfunção cerebral (FISHER et al., 2005) sua classificação será sempre um processo dinâmico, renovável face aos conhecimentos provenientes da investigação e da nossa compreensão (SCHEFFER, 2017). Assim a *International League Against Epilepsy* (ILAE) faz atualizações de modo a refletir o atual conhecimento da epilepsia e seus mecanismos. A mais recente classificação das epilepsias segundo a ILAE de 2017 foi subdividida em 6 causas etiológicas: estrutural, genética, infecciosa, metabólica e imunológica,

bem como um grupo de etiologia desconhecida. A tabela 1 resume a nova classificação da etiologia da epilepsia da ILAE.

Tabela 1 - Resumo da nova classificação etiológica da epilepsia segundo a ILAE.

| Tipo de Epilepsia | Causas |
|--------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Estrutural | Lesão estrutural no cérebro que tem um risco significativamente elevado de gerar a epilepsia. Podem ser adquiridas como no caso de acidente vascular cerebral, traumatismo e infecção; ou genéticas como em muitas malformações do desenvolvimento cortical. Apesar de haver uma base genética para estas malformações, é o fator estrutural que determina a existência da epilepsia. Portanto, o substrato de uma lesão estrutural pode ter origem genética, adquirida ou ambas. |
| Genética | Aplica-se quando a epilepsia é o resultado direto de uma mutação genética conhecida ou presumida. Uma etiologia genética refere-se a mutações de ganho ou perda de função causadoras da epilepsia naquele indivíduo sendo herdada ou não. |
| Infeciosa | Surge após uma infecção, como é o caso da encefalite viral que é causadora de crises após a fase aguda da infecção. Assim, refere-se a um indivíduo com epilepsia e não a um indivíduo que tem crises sintomáticas agudas na fase aguda de uma infecção. |
| Metabólica | Refere-se ao resultado direto de um distúrbio metabólico conhecido ou presumido, em que as crises são o sintoma principal. As causas metabólicas referem-se a defeitos metabólicos bem definidos com manifestações clínicas ou alterações bioquímicas por todo o corpo como são a porfiria, a uremia, as aminoacidopatias ou as crises piridoxino-dependentes. Em muitos casos, os distúrbios metabólicos terão um defeito genético. É provável que a maioria das epilepsias metabólicas venha a ter uma base genética, mas algumas poderão ser adquiridas, tais como a deficiência de folato cerebral. |
| Imunológica | Quando existe evidência de inflamação do sistema nervoso central imunologicamente mediada. Exemplos incluem as encefalites anti-receptor NMDA (N-metilD-aspartato) e anti-LGI155. Resulta |

| | |
|---------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | diretamente de uma perturbação imunológica em que as crises são o sintoma principal |
| Causa desconhecida | Há muitos indivíduos com epilepsia cuja causa permanece desconhecida. Nesta categoria não é possível fazer um diagnóstico específico, para além da semiologia eletroclínica básica. A determinação da etiologia depende da extensão da avaliação possível em cada indivíduo. Isto difere nos vários níveis de cuidados de saúde e em diferentes países, como em países pobres em recursos. |

Classificação atualizada das epilepsias. Fonte: Scheffer, 2017.

Ressalta-se, portanto, que uma pessoa pode ser classificada em mais de uma categoria etiológica (SCHEFFER, 2017). E no que tange as epilepsias de causa estrutural, destaca-se a ELT que tem sido alvo de estudos em nosso grupo de pesquisa devido sua importância clínica justificada pela alta incidência, gravidade e, principalmente, refratariedade ao tratamento medicamentoso.

2.3. Epilepsia do Lobo Temporal

A ELT corresponde a um tipo de epilepsia de causa estrutural que tem o início do foco epiléptico na região temporal e é classificada como mesial quando há um comprometimento de regiões estruturais mesiais dentre elas o hipocampo, amígdala, córtex entorrinal (ENGEL, 2006). Neste tipo, os indivíduos podem sofrer um distúrbio epileptogênico, tais como convulsão febril, traumatismo craniano, tumor cerebral, malformação vascular cerebral ou *Status Epilepticus* (SE) (FRENCH et al., 1993). Segundo Lowenstein e colaboradores (1999), SE pode ser definido como o estado no qual uma crise contínua ou crises distintas ocorrem sem recuperação entre elas por pelo menos 5 minutos. O risco para desenvolvimento de ELT após lesão cerebral varia conforme o tipo, a gravidade e as estruturas acometidas. Uma porcentagem dos indivíduos acometidos por lesões adquiridas no tecido cerebral, desenvolve ELT após um período de tempo. Nesses casos, admite-se que a lesão induz uma reorganização dos circuitos cerebrais que, com o tempo, transforma-se em um foco gerador de descargas epilépticas (SILVA; CABRAL, 2008). Assim, após o insulto epileptogênico, o cérebro previamente assintomático torna-se capaz de gerar crises epilépticas espontâneas. A conversão do cérebro normal em um epiléptico é chamada epileptogênese (DUDEK; STALEY, 2012).

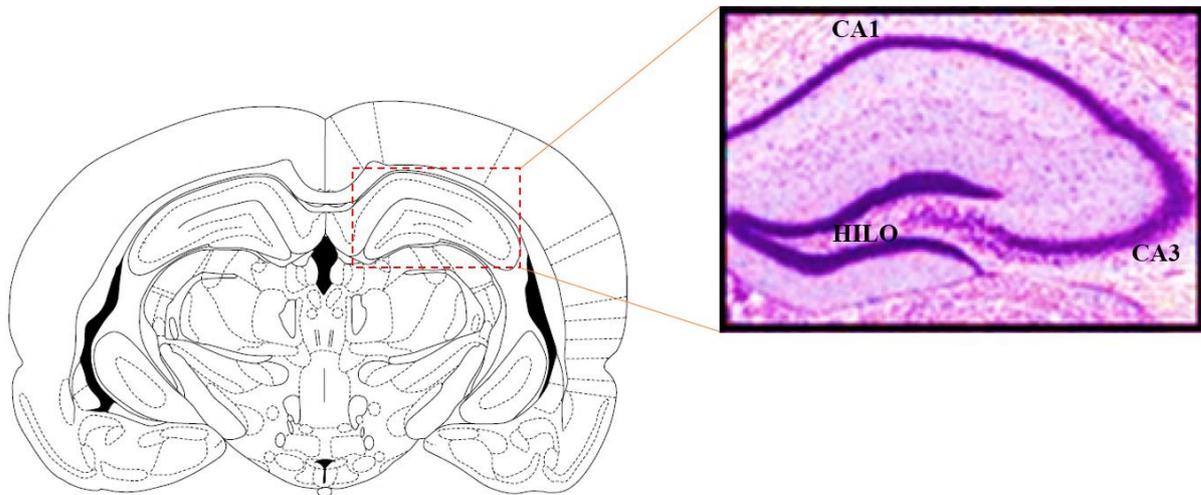
A epileptogênese, portanto, é um período em que ocorre um conjunto de alterações estruturais, neuroquímicas e de conexão entre neurônios que confere ao cérebro uma susceptibilidade endógena e permanente de gerar CREs (LEITE et al., 1990). Dentre as

alterações estruturais, destaca-se morte neural, invasão glial densa no hipocampo e nas regiões adjacentes, inflamação, estresse oxidativo, alterações na expressão gênica, reorganização axonal, alterações nas sinapses elétricas (LEITE et al., 1998; GARCÍA-GARCÍA et al., 2011). Esses eventos contribuem direta ou indiretamente com a ativação de canais iônicos e receptores de membrana, resultando em acúmulo de glutamato e elevação dos níveis de cálcio intracelular. O cálcio intracelular age como um segundo mensageiro, promovendo a ativação de enzimas presentes no citoplasma e modificando a expressão gênica e a síntese protéica (DA COSTA et al., 1998).

A ELT corresponde, aproximadamente, a 40% dos casos de epilepsia sendo o tipo de epilepsia mais frequente em adultos e corresponde ao tipo de maior índice de refratariedade medicamentosa onde o controle completo das crises com tratamento clínico ocorre em menos de 50% destes casos (BERG, 2008). A epilepsia do lobo temporal mesial (ELTM) é o tipo mais frequente da ELT que corresponde a aproximadamente 60% dos casos (ENGEL; SHIELDS, 1997; FRENCH, 1993), sendo a esclerose hipocampal a etiologia encontrada em 50 a 70% dos pacientes com ELTM refratária ao tratamento farmacológico. De fato, a esclerose hipocampal é o achado anatomopatológico mais frequentemente encontrado em tecidos removidos cirurgicamente de pacientes com ELTM (BABB et al., 1984) e também observado em modelo experimental animais como exemplo em ratos e camundongos (MATHERN et al., 1996).

A perda neuronal se constitui como um importante achado histológico comum a diversas doenças cerebrais (VENTURIN, 2008). Na ELTM a morte neuronal ocorre principalmente no hipocampo e de modo seletivo nas sub-regiões corno de Ammon 1 e corno de Ammon 3 (CA1 e CA3) e no Hilo (LEITE et al., 1990; GARCÍA-GARCÍA et al., 2011). Onde ocorre com maior intensidade, em ordem decrescente, nas regiões de CA1, Hilo e CA3 do hipocampo (BLUMCKE et al., 1999). A figura 1 mostra a localização dessas três sub-regiões.

Figura 1 - Anatomia hipocampal de rato evidenciando as sub-regiões CA1, CA3 e HILO.



Hipocampo de rato evidenciando as principais regiões hipocâmpais, CA1, CA3 e Hilo do giro denteado. Fonte: modificado de Paxinos e Watson (1996) e Woods e colaboradores (2013).

Na tentativa do melhor entendimento das alterações estruturais e dos mecanismos que levam ao desenvolvimento da ELTM, vários pesquisadores desenvolveram modelos experimentais de indução de epilepsia em animais que são bastante usados particularmente com o propósito de investigar as bases moleculares da epilepsia, as terapias farmacológicas alternativas, dentre outros.

2.4. Modelo Experimental Animal

O uso de modelo experimental é justificado quando é capaz de mimetizar características clínicas relevantes descritas em pacientes (MELLO et al., 1986). Assim, o modelo animal ideal é aquele que mais se aproxima da história natural descrita para pacientes (LEITE et al., 1990). Os principais modelos utilizados para estudar a ELT com ocorrência de crises espontâneas são obtidos com injeções de drogas convulsivantes na cavidade peritoneal ou intra-hipocampal em ratos ou camundongos ou ainda através da estimulação elétrica mantida de estruturas límbicas (McNAMARA, 1994). As drogas mais utilizadas no modelo experimental de epilepsia do lobo temporal são a pilocarpina e o ácido cainíco (CAVALHEIRO et al., 1982; LEITE et al., 1990). O Lítio pode ser acrescido ao modelo experimental com pilocarpina, pois potencializa a indução do SE, incrementando a morte neuronal seletiva inerente à epilepsia, devido a um aumento da síntese dos receptores dopaminérgicos e dos receptores colinérgicos muscarínicos na superfície das células (DE BRUIN et al., 2000).

A administração local ou sistêmica da pilocarpina resulta em um padrão de crise límbica auto-sustentada, o SE, que após o período latente, leva o animal a apresentar crises espontâneas

e recorrentes (TURSKI et al., 1983). A lesão cerebral induzida pelo SE nesses modelos pode ser considerada como equivalente a um evento epileptogênico capaz de gerar epilepsia no ser humano, como por exemplo, uma convulsão febril (MATHERN et al., 1996). O modelo experimental de epilepsia do lobo temporal induzido por pilocarpina pode ser dividido em três períodos (REDDY; KURUBA, 2013) (Tabela 1.).

Tabela 2 - Modelo experimental de epilepsia do lobo temporal induzida por pilocarpina.

| Período | Características |
|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Agudo | Corresponde a 24 horas imediatamente após o SE, início da epileptogênese. |
| Latente | Ocorrem alterações histológicas, fisiológicas, de expressão gênica, dura de dias à meses. |
| Crônico | Ocorrem as crises espontâneas e recorrentes, semelhante às crises apresentadas nos pacientes com ELT. |

Classificação dos períodos correspondentes ao modelo experimental de ELT induzida pilocarpina. Fonte: Reddy e Kuruba, 2013.

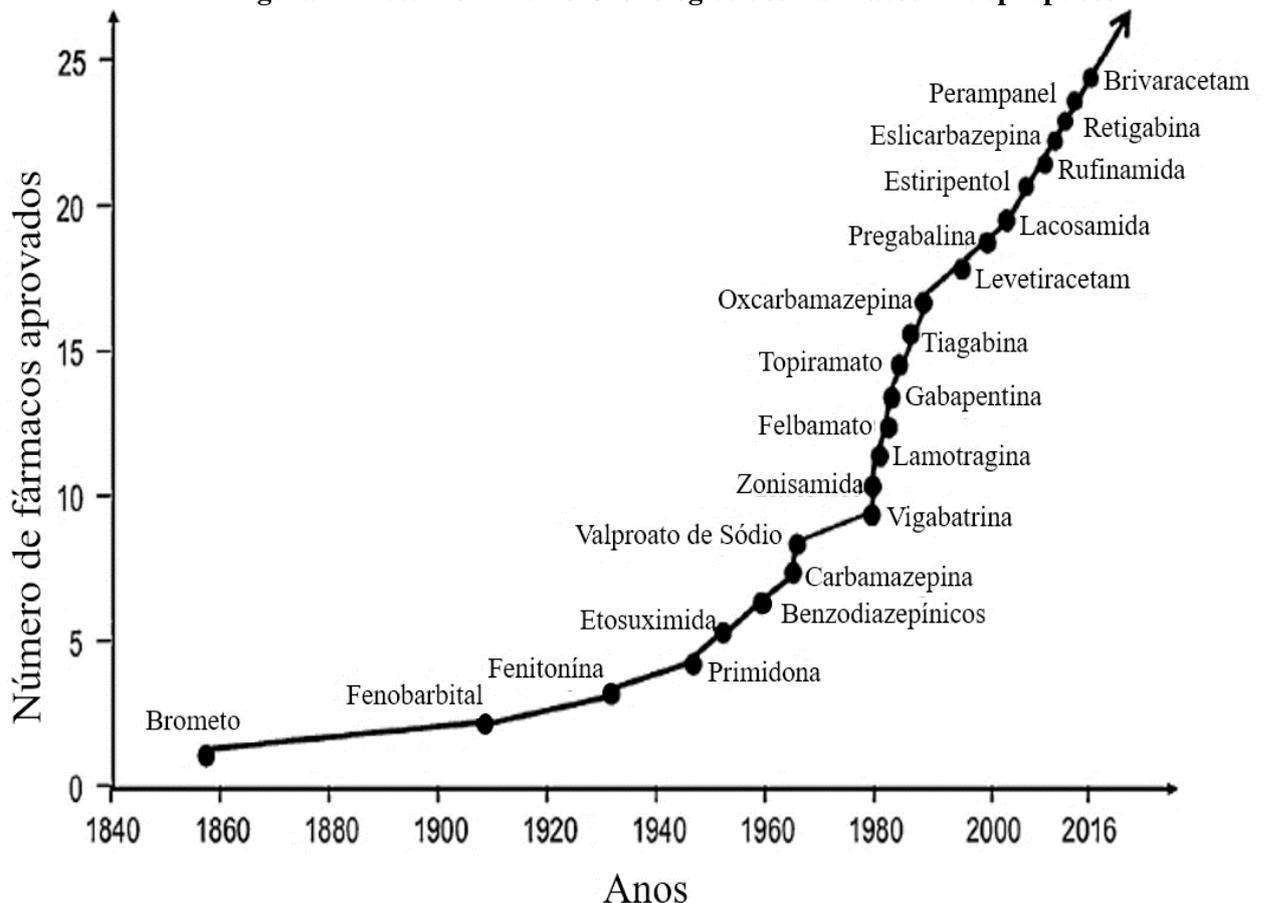
O modelo de indução de ELT por pilocarpina ou ácido caínico é utilizado também nas investigações de drogas experimentais mais eficazes e com menos efeitos adversos durante o tratamento medicamentoso (SILVA, 2008). Para testar o efeito de alguma droga experimental, faz-se necessário a escolha de qual período que será analisado, pois eles estão associados a diferentes finalidades terapêuticas. A intervenção antes da indução do SE, por exemplo, pode ser feita com o objetivo de identificar drogas com ação anticonvulsivante (prevenindo o SE), e/ou contra os danos induzidos pelo SE. Por outro lado, a intervenção no período latente objetiva identificar drogas que tenham efeito de prevenir a epileptogênese e/ou os déficits comportamentais a longo prazo induzido pelo SE. E a intervenção durante o período crônico, por sua vez, objetiva testar drogas eficazes no controle das CREs (LEITE et al., 2002). Esse estudo por sua vez, tem o foco da intervenção antes da ocorrência do SE como será detalhado mais adiante. Esses modelos experimentais usados para avaliação de drogas experimentais são importantes para a descoberta de alternativas terapêuticas no tratamento da ELT.

2.5. Tratamento da epilepsia

O tratamento é realizado, principalmente, pela utilização de FAE, uma substância capaz de diminuir e ou inibir a incidência, frequência ou severidade das crises epilepticas. (SMITH et

al., 2007). Assim, o principal objetivo do tratamento da epilepsia é o controle completo das crises epiléticas com menor quantidade de efeitos adversos, prezando pela qualidade de vida dos pacientes. Porém, no caso da ELT refratária, o alcance do objetivo medicamentoso não ocorre em 40% dos pacientes (CACIAGLE et al., 2017). Na tentativa de uma terapia farmacológica mais eficaz, houve um crescente desenvolvimento de FAEs nos últimos anos conforme representado na figura 2 (GOLYALA; KWAN, 2017).

Figura 2 - Desenvolvimento Cronológico dos Fármacos Antiepiléticos.



Fonte: modificado de Golyala e Kwan, 2017.

A administração de FAE, por meio da monoterapia é considerada como a primeira opção de tratamento, visto que 47% dos pacientes apresentam crises controladas com apenas uma FAE, mas 13% necessitam receber uma politerapia com FAEs para alcançar o controle. Conseqüentemente, os outros 40% dos pacientes continuam a apresentar crises epiléticas apesar do tratamento farmacológico, sendo classificados como pacientes com epilepsia refratária (KWAN; BRODIE, 2000). A associação de dois ou mais FAEs torna-se necessária na epilepsia refratária, entretanto, o emprego da politerapia favorece o aparecimento de interações medicamentosas e intensifica a ocorrência de reações adversas (REYNOLDS, 2002).

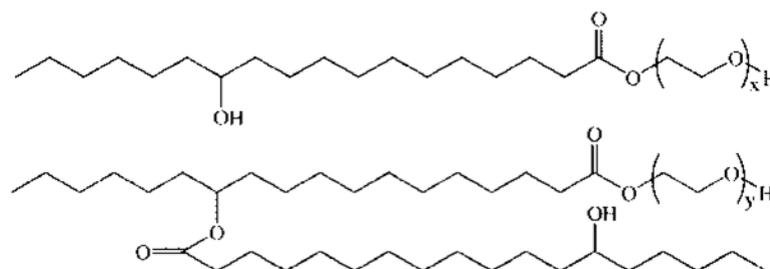
O estudo de Eddy e colaboradores (2011) destaca que o uso FAEs dentre eles a carbamazepina, topiramato, fenobarbital promove a ocorrência de reações adversas cognitivas e psicomotoras que prejudicam a atenção e o desempenho motor dos pacientes.

Diante do exposto, torna-se evidente a importância clínica da ELTM decorre não somente de sua elevada prevalência, mas também por ser refratária à maioria dos tratamentos farmacológicos disponíveis atualmente. Nestes casos, a remoção cirúrgica do foco epilético torna-se a única alternativa de tratamento, porém essa alternativa pode promover comprometimento de funções cognitivas (ENGEL,1993). Portanto, a busca de novos fármacos sintéticos ou naturais é de grande relevância para o desenvolvimento de um tratamento eficaz para a epilepsia do lobo temporal e, conseqüentemente, melhora na qualidade de vida do paciente.

2.6. Solutol[®] HS 15

O Solutol[®] HS 15, é uma substância sintética formada pela reação entre o ácido 12-hidroxiesteárico com polietilenoglicol que produz o ácido 12-hidroxiesteárico polioxietilado que consiste de 70% de monoésteres e diésteres e 30% de polietilenoglicol segundo o fabricante *BAFS Global*. A figura 3 mostra a estrutura química do Solutol[®] HS 15.

Figura 3 - Estrutura química do Solutol[®] HS 15.



Fonte: (HU et al, 2017).

É altamente solúvel e estável em solução aquosa, sendo um solubilizante não iônico e agente emulsificante clinicamente utilizado para solubilizar drogas, tais como vitaminas, miconazol, alfaxalona, nifedipina e piroxicam (KU; VELAGALETI, 2010). Portanto, o Solutol[®] HS 15 é bem utilizado como veículo. Entretanto, estudos recentes têm relatado efeitos biológicos promovidos pelo Solutol[®] HS 15, suscitando uma maior preocupação na escolha de um veículo que seja realmente inerte ao organismo. De fato, excipientes farmacêuticos ativos

no organismo podem gerar erros na interpretação de dados farmacocinéticos e interações medicamentosas indesejáveis (OTTER et al., 2017).

Solutol[®] HS 15 inibe os transportadores de cátions orgânicos (OTC 1-3) e os transportadores de oligopeptídeos (PEPT 1 e 2) (OTTER et al., 2017). O estudo de Chauvet e colaboradores (2015) relata que nanocápsulas lipídicas contendo Solutol[®] HS15 podem influenciar a sinalização celular de cálcio no cérebro, pois causam inibição do transporte de cálcio através de canais ativadas por hiperforina em células neurais. O pré-tratamento e tratamento com Solutol[®] HS 15 (0,6 mL/ Kg) pela via intraperitoneal em ratos confere neuroproteção hipocampal em modelo de isquemia cerebral focal e global (LIN et al., 2014). Essas descobertas podem ter implicações clínicas importantes. Nossa hipótese é de que o Solutol[®] HS 15 apresenta efeito biológico no modelo experimental de epilepsia do lobo temporal induzida por lítio-pilocarpina.

Assim, considerando que na epileptogênese ocorre neurodegeneração hipocampal que culmina no desequilíbrio excitatório/inibitório, a necessidade de terapêuticas alternativas para a ELT e as atividades biológicas apresentadas pelo Solutol[®] HS 15, esse trabalho objetivou investigar a atividade desse solubilizante não iônico na fase aguda da epileptogênese no modelo experimental de ELT.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral:

Investigar o efeito do Solutol[®] HS 15 na fase aguda da epileptogênese em modelo experimental de epilepsia do lobo temporal.

3.2. Específicos:

- 3.2.1 Avaliar o efeito do Solutol[®] HS 15 no perfil das crises epilépticas durante *Status Epilepticus*;
- 3.2.2 Avaliar o efeito do Solutol[®] HS 15 na neurodegeneração hipocampal presente na fase aguda da epileptogênese.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais e divisão dos grupos experimentais

Os animais utilizados nesse estudo foram ratos machos da linhagem *Wistar* com idade entre 60 a 70 dias e peso entre 250 a 300 g provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas. Os animais foram divididos em caixas contendo no máximo 5 animais com acesso livre à água e ração e mantidos no biotério setorial do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde com temperatura de $\pm 22^{\circ}\text{C}$ e com ciclo de 12 horas claro/escuro (6h/18h). O protocolo experimental foi aprovado e realizado seguindo os princípios éticos do Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) (Protocolo 37/2017-ANEXO A). A tabela 3 descreve os diferentes grupos experimentais e a figura 4 ilustra as etapas metodológicas em que os animais foram submetidos.

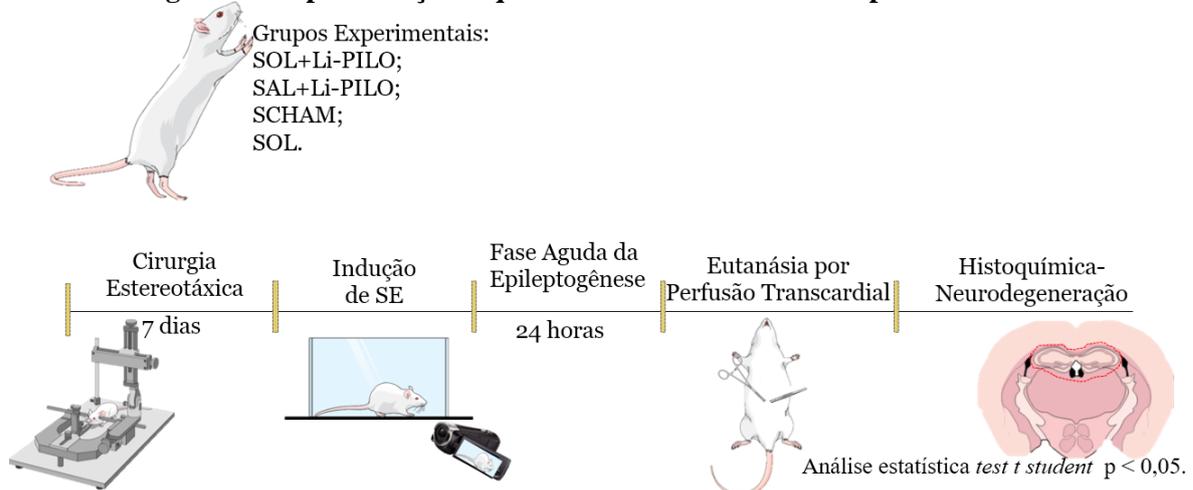
Tabela 3 - Grupos experimentais

| Grupo | Descrição |
|-------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| SOL+Li-PILO | Animais submetidos à microinjeção de Solutol [®] HS 15, 30 minutos antes da injeção de Pilocarpina (n= 10) |
| SAL+Li-PILO | Animais submetidos a microinjeção de salina a 0,9% 30 minutos antes da injeção de Pilocarpina (n= 7) |
| SOL | Animais submetidos somente à microinjeção de Solutol [®] HS 15 (n= 5) |
| SCHAM | Animais submetidos somente a cirurgia estereotáxica (n= 5) |

Fonte: autora.

Para análise do perfil das crises, os grupos SOL-Li-PILO e SAL+Li-PILO foram constituídos por 10 e 7 animais respectivamente. Para análise histoquímica por Fluoro-Jade, os grupos foram constituídos por 5 animais.

Figura 4 - Representação esquemática do delineamento experimental.



Fonte: autora.

4.2. Cirurgia estereotáxica para implante de cânula

Para o pré-tratamento com Solutol[®] HS 15, os animais passaram por procedimento cirúrgico para implante de cânula no Hilo do giro dentado. Para isso, os animais foram anestesiados com 0,08mL/100g de cetamina (i.p.) e 0,04mL/100g de Xilazina (i.p), para verificar a efetividade da anestesia, observou-se a presença de reflexo através do aperto de pata. Posteriormente, os animais foram tricotomizados na cabeça, fixados no estereotáxico, receberam injeção subcutânea de lidocaína (0,2 ml por animal), anestésico local, e administração de pentabiótico (0,1/100g) administrado na via intramuscular (i.m.) antes do início da cirurgia. A cânula foi implantada estereotaxicamente seguindo as coordenadas de (Paxinos & Watson, 1996): Hilo do giro denteado – 6,30mm Antero posterior (AP) (em relação ao bregma); 4,50mm médio lateral (ML) (em relação ao seio sagital) e 4,50mm dorsoventral (DV) (em relação à dura-máter), de acordo com Furtado et al., (2002). Após cirurgia, um mandril de fio de aço foi utilizado para fechar a cânula e evitar obstrução e infecção. Os animais permaneceram no biotério setorial para recuperação pós-cirúrgica que durou 7 dias.

4.3. Microinjeção do Solutol[®] HS 15 e Indução do *Status Epilepticus* (SE):

O Solutol[®] HS 15 utilizado neste estudo fabricado pela *Sigma-Aldrich* (com nome comercial de Kolliphor[®] HS 15) e foi obtido por colaboração do Laboratório de Farmacologia e Imunidade (LAFI/UFAL). Assim, foi realizada uma diluição em água destilada, para isso, foi pesado 0,5g de Solutol[®] HS 15, aquecido em 37°C e diluído em 1 mL de água destilada obtendo a concentração de (1,6mg/Kg). A microinjeção correspondeu a uma infusão de 1µL de Solutol[®] HS 15 (1,6mg/ Kg, i.h.) através de uma seringa Hamilton de 5µL com velocidade de 0,5µL/minuto no hipocampo esquerdo do animal 30 minutos antes da administração de pilocarpina (30mg/kg, i.p.). No grupo controle positivo, foi microinjetado 1µL de solução salina 0,9% (i.h.).

Para a indução do SE, os animais foram submetidos à injeção intraperitoneal (i.p.) de cloreto de lítio (127mg/kg) 16 horas antes da administração de pilocarpina (30mg/kg, i.p.). No tempo de 30 minutos antes da injeção de pilocarpina, foi microinjetado 1µL Solutol[®] HS 15 (1,6mg/ Kg, i.h.) e injetado butilbrometo de escopolamina (1mg/kg, i.p.). Imediatamente após a administração de pilocarpina, os animais foram vídeo monitorados utilizando-se uma filmadora digital (DCR-SR68- Sony Brasil LTDA) para posterior análise do perfil das crises durante a latência para início do SE e 90 minutos de SE. Após esse período, doses de diazepam (5mg/kg, i.p.) foram administradas para reversão do SE.

4.4. Perfil das Crises Epilépticas durante *Status Epilepticus*

A análise do perfil das crises antes e durante o SE foi realizada utilizando a escala de Racine. Esta escala é composta por índices (de 1 a 5) atribuídos a diferentes tipos de comportamento durante o SE e que reflete de forma arbitrária, porém crescente, a gravidade das crises (RACINE, 1972). Sendo a classe 0 imobilidade, classe 1, os automatismos faciais, classe 2, as mioclonias de cabeça e pescoço, classe 3, clonias de patas anteriores, classe 4, elevação sobre as patas posteriores e, classe 5, elevação e queda.

Tabela 4 - Escala de Racine.

| Índice | Comportamento |
|----------|-------------------------------------|
| 0 | Imobilidade |
| 1 | Automatismos faciais |
| 2 | Mioclonias de cabeça e pescoço |
| 3 | Clonias de patas anteriores |
| 4 | Elevação sobre as patas posteriores |
| 5 | Elevação e queda |

Fonte: Racine, 1972.

Assim, a análise o perfil das crises foi realizado utilizando os parâmetros: I. latência para início do SE; II. total de crises durante a latência para SE; III. total de crises durante SE; além disso, foi analisada a quantidade de doses de diazepam necessária para reverter o SE.

4.5. Eutanásia por perfusão transcardial

Para a perfusão, os animais foram profundamente anestesiados com tiopental sódico (150mg/Kg, i.p.). O coração foi exposto e uma agulha acoplada a um cateter foi colocada no ventrículo esquerdo. Cada animal foi infundido com 200 mL de tampão fosfato heparinizado e posteriormente com 150 mL de paraformaldeído (PFA) 4% em tampão fosfato, pH 7,4. Os animais foram decapitados e os cérebros removidos.

4.6. Pós-fixação e congelamento dos cérebros

Após a remoção dos cérebros, os tecidos foram pós-fixados em solução de PFA a 4% por 24 horas, crioprotetido em solução de sacarose 20%, a precipitação dos cérebros na solução de sacarose 20% foi utilizada como critério para decisão do momento do congelamento. Assim, após precipitação, os cérebros foram congelados em freezer a -20°C por 24 horas e,

posteriormente, em freezer a -80°C , onde foram transferidos para o freezer a -20°C 24 horas antes do processamento dos cortes histológicos em criostato.

4.7. Cortes histológicos

Os cérebros foram cobertos com Tissue Tek e, então, cortados em secções de $30\ \mu\text{m}$ em criostato, com temperatura variando de -18 a -22°C . Os cortes foram colocados em lâminas gelatinizadas (solução para gelatinização: gelatina 0,5% e sulfato duplo de cromo e potássio 0,05%) contendo cada lâmina seis níveis cerebrais representando a extensão anteroposterior do hipocampo de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (1996).

4.8. Histoquímica por Fluoro-Jade

A análise de neurodegeneração foi realizada utilizando a técnica de histoquímica com Fluoro-Jade de acordo com o protocolo proposto por Schmued e colaboradores (1997) e modificado por Castro (2012), essa técnica possui um mecanismo ainda desconhecido, mas é sabido que envolve a afinidade deste corante pela acidose desencadeada neste processo de morte celular. Assim, as lâminas com os cortes histológicos foram submetidas a banhos sucessivos de etanol absoluto por 3 minutos, etanol 70% por 1 minuto, água destilada por 1 minuto, permanganato de potássio 0,06 % por 15 minutos, com agitação branda, 3 lavagens em água destilada por 1 minuto e 30 minutos em Fluoro-Jade (FJ) (0,0001%), sob agitação branda. Posteriormente, as lamínulas foram montadas nas lâminas por meio de uma mistura na proporção de 3:1 de ácido acético 0,1% e Fluoromount respectivamente. Os cortes foram analisados e as imagens capturadas através de um microscópio de fluorescência (Nikon DS RI1).

A contagem de células foi realizada utilizando o programa ImageJ (Wayne Rasband; Research Services Branch, National Institute of Mental Health Bethesda, MD, USA). Foram contados os números de células em três regiões hipocâmpais: CA1, CA3 e Hilo e profundidades (dorsal, medial e ventral) do hipocampo. Para a análise quantitativa, os dados obtidos em diferentes profundidades foram somados, obtendo-se, assim, o padrão de marcação total das sub-regiões CA1, CA3 e Hilo. Essas regiões foram selecionadas devido à alta sensibilidade ao processo neurodegenerativo. Vale ressaltar que todas as células foram contadas tanto no hipocampo contralateral quanto no ipsilateral, o que recebeu a implantação da cânula.

4.9. Análise Estatística

Os dados foram analisados por meio do teste *t Student* e de normalidade *Kolmogorov–Smirnov* seguido pelo teste paramétrico ou não paramétrico utilizando o programa estatístico GraphPad, Prism 6.0. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análise do efeito do Solutol[®] HS 15 no *Status Epilepticus* (SE)

Para verificar o efeito Solutol[®] HS 15 no SE, foram utilizados 7 animais no grupo SAL+Li-PILO e 10 animais no grupo SOL+Li-PILO sendo avaliados os seguintes parâmetros: latência para início do SE; total de crises durante latência para início do SE; total de crises durante SE; além disso, foi analisada o total de doses de diazepam necessária para reverter o SE.

Nos parâmetros de tempo de latência para o início do SE, assim como no total de crises durante a latência não houve diferença estatística significativa entre os grupos SAL+Li-PILO e SOL+Li-PILO. A tabela 5 mostra os valores expressos em média \pm erro padrão da média.

Tabela 5 - Efeito do Solutol[®] HS 15 antes do início do SE.

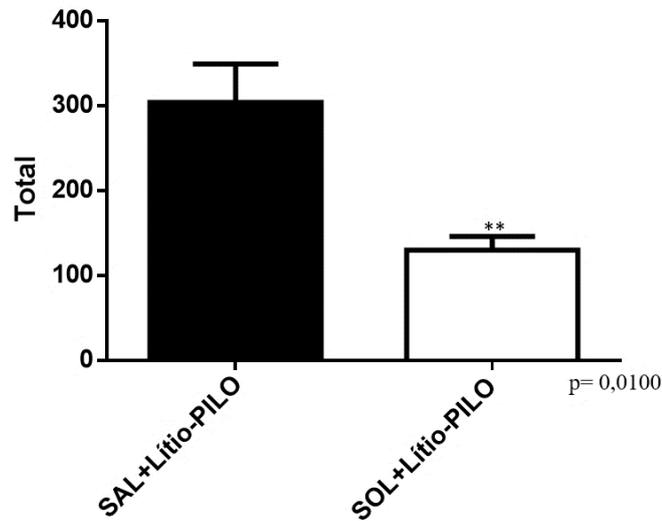
| Parâmetros | Grupos Experimentais | |
|------------------------------------|----------------------|-------------------|
| | SAL+Li-PILO | SOL+Li-PILO |
| Latência para início do SE | 48.71 \pm 4.643 | 47.20 \pm 2.874 |
| Total de crises na latência | 61.86 \pm 12.11 | 41.90 \pm 3.459 |

A latência para entrar em SE. Teste não paramétrico, $p > 0,05$. Valores expressos em média \pm erro padrão da média. Grupo SAL+Li-PILO (n=7), grupo SOL+Li-PILO (n=10). Fonte: Autora.

A importância biológica da latência para o início do SE e da quantidade de crises que ocorrem durante esse período ainda não é bem definida. Kondratyev e Gale (2004) que afirmam que o tempo de latência para o início da SE contribui para a degeneração após SE, onde uma maior latência gera o mecanismo de morte celular por apoptose e uma curta latência gera o mecanismo de morte por necrose e sugere que as crises que ocorrem nesse período servem como uma pré-condição para resistir à necrose, assim a ausência deste pré-condicionamento em casos de SE de início rápido pode predispor a mecanismos necróticos de degeneração.

Foi observado um efeito do Solutol[®] HS 15 na quantidade de crises durante os 90 minutos de SE, onde houve menor quantidade de crises no total no grupo SOL+Li-PILO (38%) quando comparados com o grupo SAL+Li-PILO (62%) conforme representado na figura 5.

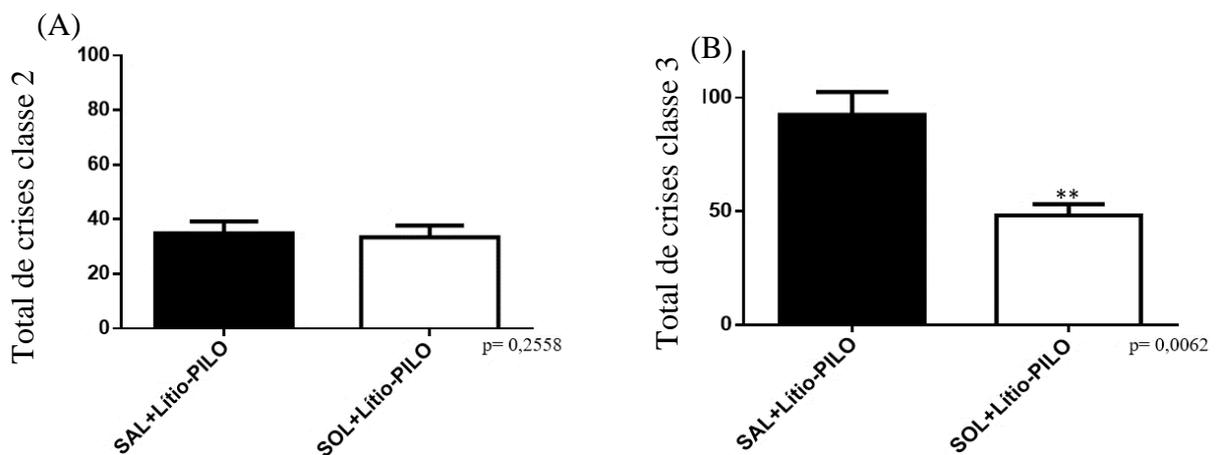
Figura 5 - Total de crises durante SE.

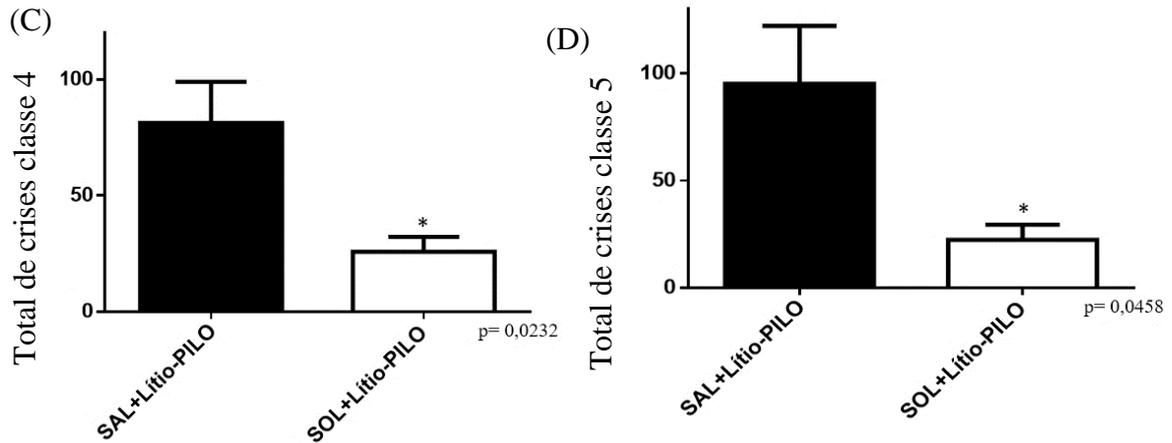


Total de crises durante 90 minutos de SE. Teste paramétrico, $p < 0,05$. Valores expressos em média ± erro padrão da média. ** comparado com o grupo SAL+Li-PILO. Grupo SAL+Li-PILO (n=7), grupo SOL+Li-PILO (n=10). Fonte: Autora.

Ao avaliar o total de cada tipo de crise apresentada durante o SE, foi observado uma redução significativamente estatística na quantidade de crises classe 3, 4 e 5 no grupo SOL+Li-PILO quando comparado ao grupo SAL+Li-PILO, conforme representado na figura 6. As crises da classe 1 não foram analisadas devido a dificuldade de visualização nas gravações dos vídeos.

Figura 6 - Total de cada classe de crises durante SE.





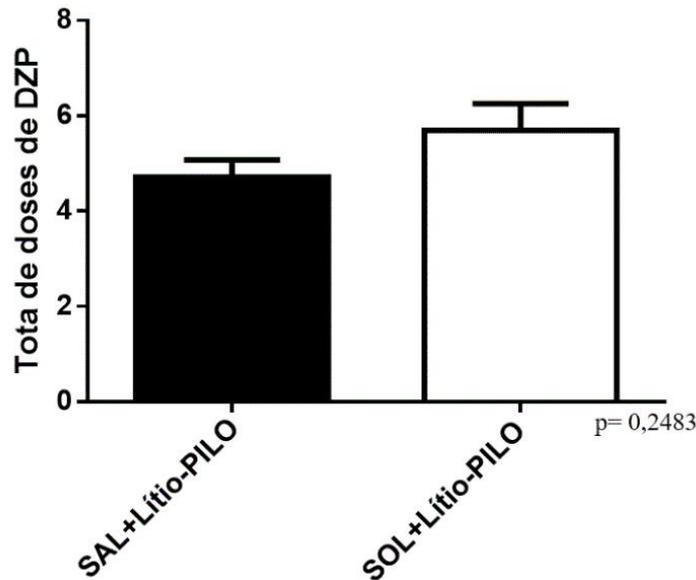
(A) total de crises tipo 2 durante 90 minutos de SE, teste paramétrico, $p > 0,05$. (B) total de crises classe 3, (C) total de crises classe 4 e (D) total de crises classe 5 durante 90 minutos de SE. Teste paramétrico, $p < 0,05$. Valores expressos em média±erro padrão da média * e ** comparado com o grupo SAL+Li-PILO. Grupo SAL+Li-PILO (n=7), grupo SOL+Li-PILO (n=10). Fonte: Autora.

Kudin e colaboradores (2004) afirmam que é difícil explicar se efeitos benéficos como na sobrevivência animal, sobrevivência neuronal, frequência de convulsões podem ser decorrentes de uma diminuição da intensidade do SE.

O efeito do Solutol[®] HS 15 em reduzir a quantidade de crises durante SE gera interesse em saber quais os mecanismos no qual ele age. O estudo de Rege e colaboradores (2002) mostra que excipientes farmacêuticos alteram a fluidez de membranas e essa propriedade pode perturbar uma diversidade de proteínas, como transportadores e canais iônicos presentes na membrana celular podendo assim alterar a maquinaria bioquímica (CHAUVET et al., 2015). Otter e colaboradores (2017) mostraram que Solutol[®] HS 15 inibiu transportadores de cátions orgânicos (OTC 1-3) e transportadores de oligopeptídeos (PEPT 1 e 2). Além disso, o estudo de Engel e colaboradores (2012) mostrou que Solutol[®] HS 15 inibiu polipeptídeos transportadores de ânions orgânicos (OATP) e proteínas co-transportadoras de Na⁺ dependente como taurocolato (NTCP). Dessa forma, é possível que o Solutol[®] HS 15 promova uma ação em canais iônicos e transportadores de membrana neuronal de modo a alterar o influxo e efluxo de íons assim como na captação e recaptção de neurotransmissores de forma a modular a homeostase excitatória-inibitória.

Referente ao total de doses de diazepam necessária para reversão do SE convulsivo, foi observado que não houve diferença significativa entre as médias de cada grupo experimental conforme observado na figura 7.

Figura 7 - Doses de Diazepam necessárias para reversão do SE convulsivo.



Total de doses de diazepam para reverter o SE. Teste não paramétrico, $p > 0,05$. Valores expressos em média±erro padrão da média. Grupo SAL+Li-PILO (n=7), grupo SOL+Li-PILO (n=10). Fonte: Autora.

Apesar de não apresentar uma diferença estatística significante, esse dado gera interesse em saber que o Solutol[®] HS 15 pode influenciar de algum modo na metabolização de diazepam, pois estudos investigaram o efeito do Solutol[®] HS 15 na metabolização e farmacocinética do midazolam, um tipo de fármaco benzodiazepínico utilizado para o tratamento da epilepsia. Foi relatado que Solutol[®] HS 15 alterara o metabolismo do midazolam em teste *in vitro* de células hepáticas de ratos, visto que diminui significativamente a depuração intrínseca (GONZÁLEZ et al., 2004).

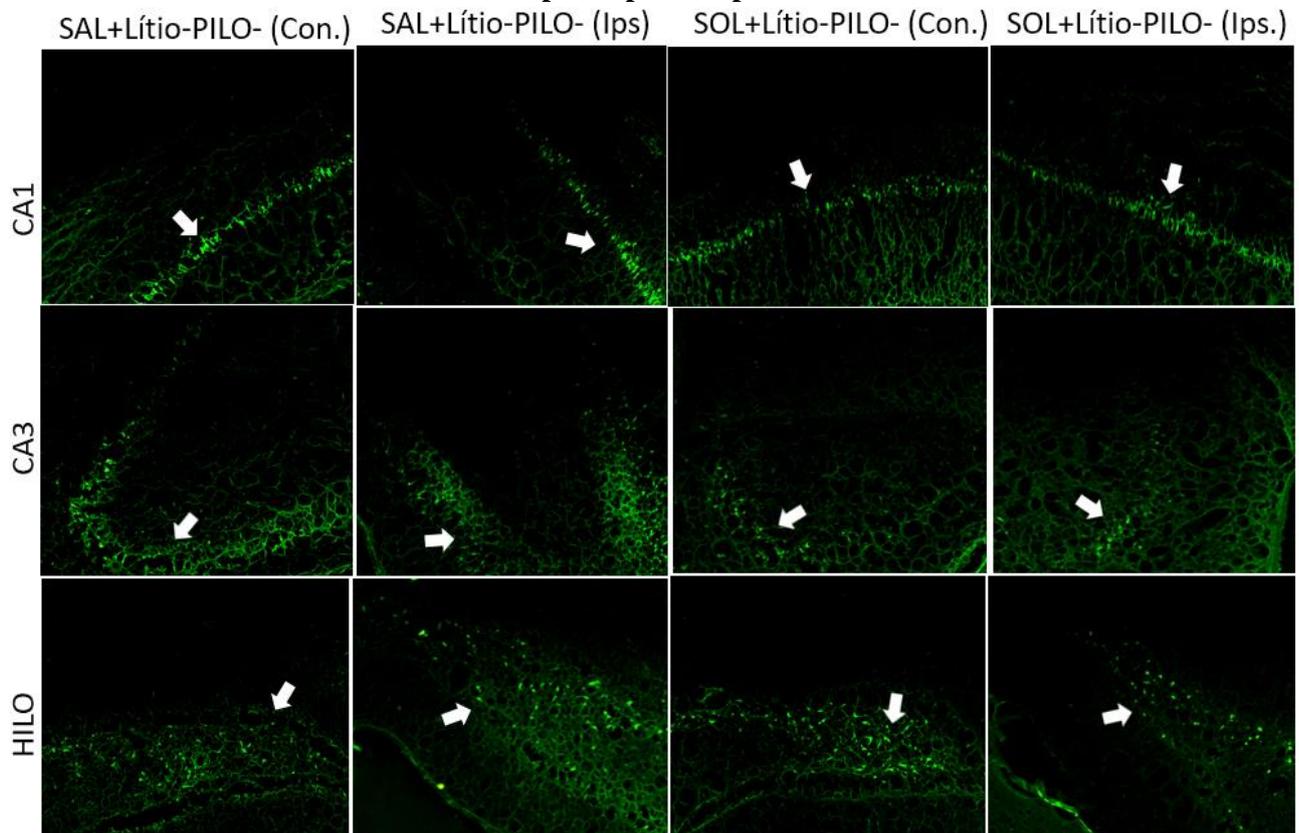
Entretanto, no estudo de Bittner e colaboradores (2003) foi observado que Solutol[®] HS 15 não alterou a farmacocinética do midazolam e de seus metabólitos, pois o Solutol[®] HS 15 não afeta a depuração global do midazolam em teste *in vivo* com administração intravenosa em ratos e sugere que a falta desse efeito pode se dar pela alta razão de extração hepática de midazolam e que em humanos esse efeito pode ser diferente, já que a depuração do midazolam em humanos ocorre de modo diferente do que em roedores. O Solutol[®] HS 15 é considerado um fraco inibidor de CYP3A (BITTNER et al., 2003), é possível que influencie na metabolização de fármacos antiepilépticos benzodiazepínicos se utilizados concomitantemente como excipiente.

5.2. Análise do efeito do Solutol® HS 15 na neurodegeneração necrótica que ocorre na fase aguda da epileptogênese

Para investigar o potencial efeito neuroprotetor do Solutol® HS 15 na fase aguda da epileptogênese (24 horas após o SE), foram utilizados 5 animais por grupo e foi realizada a contagem dos neurônios marcados com o corante Fluoro-Jade (FJ) que apresenta especificidade para neurônios em degeneração. Esta análise foi direcionada para as sub-regiões CA1, CA3 e Hilo nas profundidades dorsal, medial e ventral do hipocampo contralateral e ipsilateral. A quantidade de células FJ positivas de todas as profundidades foram somadas para a análise quantitativa, obtendo-se, assim, o padrão de marcação total das regiões CA1, CA3 e Hilo. Os grupos SHAMe SOL não apresentaram neurônios marcados por FJ, isso implica que a cirurgia estereotáxica assim como a substância Solutol® HS 15 não promovem neurodegeneração.

A figura 8 apresenta o padrão de marcação de FJ no hipocampo dos animais dos diferentes grupos SAL+Li-PILO e SOL+Li-PILO. Foi observado que a presença de neurônios FJ-positivos nas regiões CA1 e CA3 e no Hilo 24 horas após a reversão do SE nos dois grupos experimentais.

Figura 8 - Efeito do Solutol® HS 15 na neurodegeneração nas regiões CA1, CA3 e Hilo do hipocampo 24h após SE.

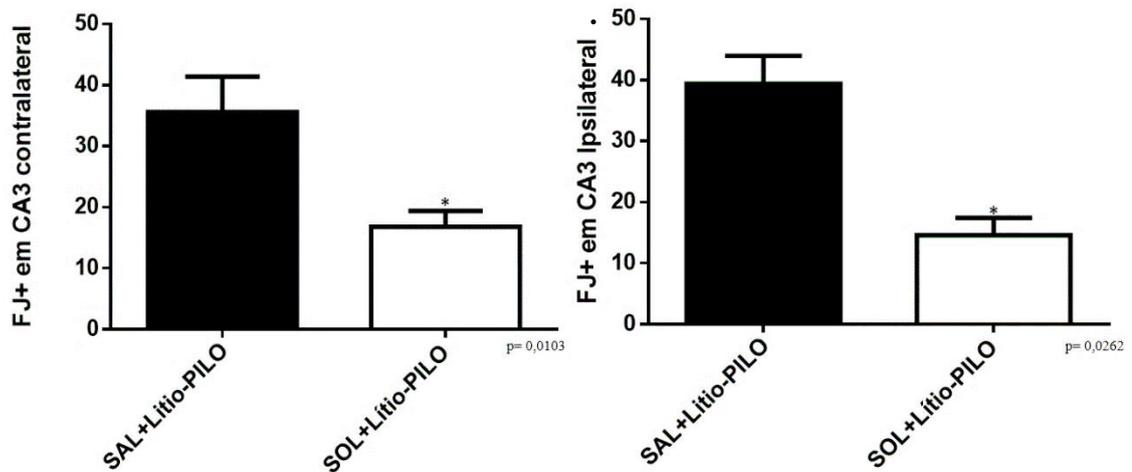


Cortes histológicos submetidos a técnica Fluoro-Jade. Os pontos em verde brilhante indicam marcação de neurônios em degeneração necrótica. Na horizontal estão as regiões analisadas do hipocampo, com

seta branca indicando cada região. Na vertical estão os grupos experimentais. Aumento de 10x. Fonte: Autora.

Ao analisar quantitativamente as sub-regiões CA1, CA3 e Hilo, foi observado um número significativo menor de neurônios marcados por FJ+ na sub-região CA3 contralateral e ipsilateral no grupo SOL+Li-PILO quando comparado ao grupo SAL+Li-PILO conforme podemos observar na figura 9.

Figura 9 - Redução da marcação de neurônios FJ positivos em CA3 no hipocampo contralateral e ipsilateral



Marcação de neurônios em processo de degeneração em CA3 contralateral e ipsilateral. Teste paramétrico, $p < 0,05$. Valores expressos em média±erro padrão da média. * comparado com o grupo SAL+Li-PILO. Grupo SAL+Li-PILO (n=5), grupo SOL+Li-PILO (n=5). Fonte: Autora.

Não houve diferença estatística significativa nas sub-regiões CA1 e Hilo no grupo SOL+Li-PILO quando comparado ao SAL+Li-PILO. A tabela 6 mostra os valores expressos em média ± erro padrão da média.

Tabela 6 - Quantificação de neurônios FJ+ em CA1 e HILO.

| Grupos Experimentais | Sub-região hipocampal | | | |
|----------------------|-----------------------|--------------------|-----------------------|---------------------|
| | CA1 Contralateral | CA1 Ipsilateral | HILO Contralateral | HILO Ipsilateral |
| SAL+Li-PILO | 41,20±22,22 | 54,60±46,19 | 85,80±31,57 | 86,00±20,99 |
| SOL+Li-PILO | 11,80±5,404 | 9,800±7,596 | 56,00±14,20 | 58,80±6,380 |

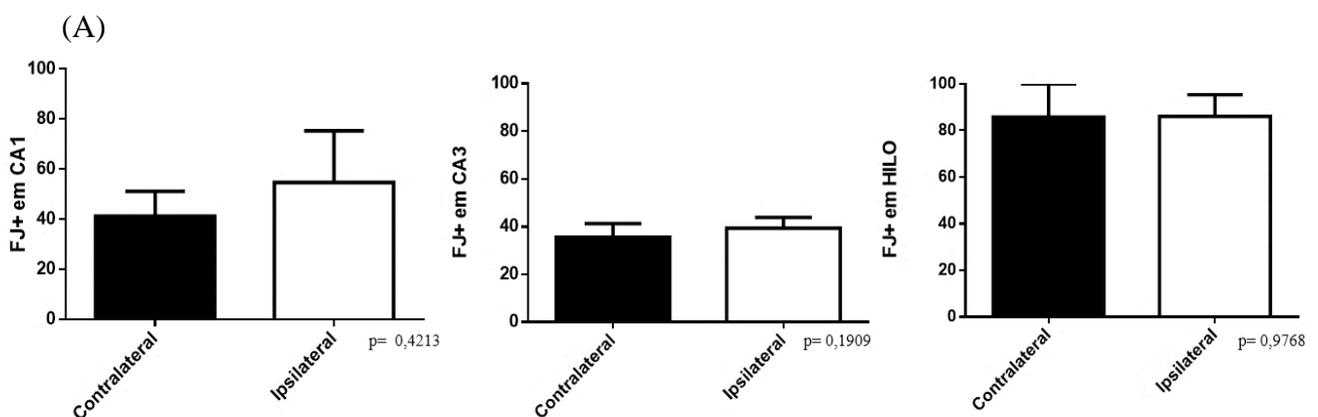
Marcação de neurônios em processo de degeneração em CA1 e HILO contralateral e ipsilateral. Teste paramétrico, $p > 0,05$. Valores expressos em média±erro padrão da média. Grupo SAL+Li-PILO (n=5), grupo SOL+Li-PILO (n=5). Fonte: Autora.

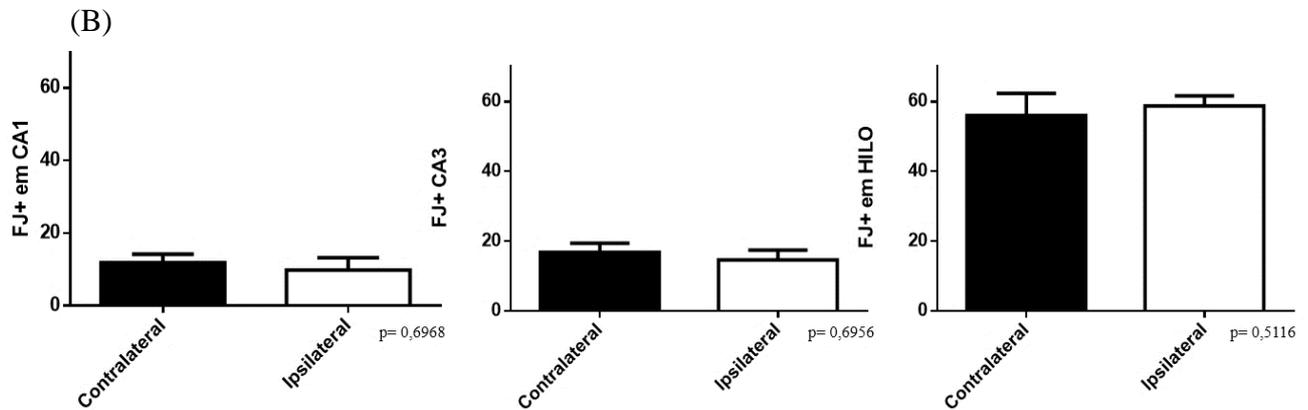
A observação de neuroproteção somente na região CA3 é um achado curioso, pois outros estudos também relatam que as drogas experimentais promovem efeito em algumas regiões do hipocampo. Tang e colaboradores (2013) mostraram que o tratamento por 10 dias com Tenidap um anti-inflamatório não esteroideal conferiu efeito neuroprotetor somente em CA3 em hipocampo de ratos. Já no estudo de Kudin e colaboradores (2004) foi investigado a ação neuroprotetora em hipocampo de ratos do Topiramato, um medicamento antiepiléptico, que promoveu neuroproteção nas regiões CA1 e CA3, além disso, foi observado que o Topiramato aumentou da atividade do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial na células piramidais CA1 e CA3 e promoveu inibição do efeito despolarizante mitocondrial do Ca^{+2} .

O cálcio citosólico em alta concentração desencadeia a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (MPT), que despolariza a membrana mitocondrial e é um fator na indução de morte celular neuronal (NICHOLLS; BUDD 2000). Traub e Llinas (1979) afirmam que os dendritos apicais de neurônios de CA3 contêm múltiplas regiões com alta densidade de canais de cálcio e o influxo de Ca^{2+} pode desempenhar um papel crítico na alteração morfológica e estrutural dos neurônios de CA3 (ZHANG et al., 2003). O estudo de Chauvet e colaboradores (2015) mostrou que Solutol[®] HS 15 inibiu canais de cálcio ativados por hiperforina em cultura de célula neural. Assim, é possível que Solutol[®] HS 15 reduziu a morte neural em CA3 através da modulação de cálcio.

Além de verificar a ocorrência da neurodegeneração hipocampal entre os grupos experimentais, foi realizada uma comparação entre as sub-regiões dos dois hipocampus para verificar se o implante da cânula poderia causar mais morte neural no hipocampo ipsilateral do que o contralateral após passar por SE, porém não foi observado diferença significativa na quantidade de neurônios marcados com FJ+ ao analisar especificamente suas sub-regiões hipocampais no grupo SAL-Li-PILO figura 10A e no grupo SOL-Li-PILO figura 10B.

Figura 10 - Comparação entre os do perfil de neurogeneração entre os hipocampus contralateral e ipsilateral de cada sub-região dos grupos SAL+LiPILO e SOL+Li-PILO.





(A) Marcação de neurônios em processo de degeneração nas regiões CA1, CA3 e HILO contralateral e ipsilateral do grupo SAL+Li-PILO (n=5). (B) Marcação de neurônios em processo de degeneração nas regiões CA1, CA3 e HILO contralateral e ipsilateral do grupo SOL+Li-PILO (n=5). Teste paramétrico, $p > 0,05$. Valores expressos em média±erro padrão da média. Fonte: Autora.

Neste estudo, houve a preocupação de se verificar se a cirurgia estereotáxica por si só poderia promover morte neural ou intensificar esse fenômeno na ocorrência do SE e foi observado que esse tipo de cirurgia não foi capaz de causar esse efeito. O estudo de Antunes (2013) mostra por meio da técnica de *western blotting* que a cirurgia estereotáxica no estriado de ratos *wistar* não induziu astrogliose apesar da lesão tecidual ocorrida pela técnica cirúrgica. A astrogliose é um tipo de fenômeno que acompanham a morte neural (LIU et al., 1999), assim, é possível que a ocorrência de astrocitos reativos também não ocorra ou seja intensificada devido a técnica de cirurgia estereotáxica.

5.3. Perspectivas do uso do excipiente Solutol[®] HS 15 na fase crônica da epileptogênese

A ELT instiga a busca de novas opções terapêuticas, principalmente, devido a ocorrência da farmacoresistência. O tratamento cirúrgico é alternativa terapêutica de escolha para os pacientes que não apresentam crises controladas por medicamentos (OLIVEIRA et al, 2013), pois visa promover uma qualidade de vida mais adequada e próxima possível do normal de modo a garantir uma melhor sensação de bem-estar, aliviar disfunções psicossociais, reduzir os riscos de ocorrência de novas crises e a mortalidade (DUCHOWNY et al, 1996). Porém, muitos estudos buscam alternativas medicamentosas por se tratar de uma alternativa menos invasiva. Entretanto, os medicamentos disponíveis agem contra crises e não sobre as causas que promovem as crises. Assim, a busca de potenciais fármacos que possam agir modulando o processo epileptogênico passa a ser de grande importância.

Os medicamentos geralmente são compostos por fármacos combinados com agentes não farmacológicos chamados de excipientes farmacêuticos (ANSEL et al., 2000). Esses excipientes eram considerados como substâncias que funcionavam somente como um meio para administrar fármacos sem poder terapêutico, inertes ao organismo, usados para assegurar a estabilidade e as propriedades físico-químicas e organolépticas dos produtos farmacêuticos (BALBANI, 2006). Hoje, os excipientes são vistos sob outra perspectiva, pois podem promover interações físicas ou reações químicas (VILLANOVA; SÁ, 2009) que podem ter efeitos no organismo, tais como ocorrência reações adversas (NAPKE, 2004).

O Solutol[®] HS 15 é um excipiente farmacêutico utilizado como solubilizante não iônico de fármacos e vitaminas e também é muito utilizado como carreador de substâncias. Porém, como apresenta efeitos biológicos, deixa de ser somente um excipiente inerte e passa a ter uma importância biológica. Foi observado no presente estudo que os animais pré-tratados com Solutol[®] HS 15 na concentração de 1,6mg/Kg injetado pela via intra-hipocampal no modelo de indução de SE por lítio-pilocarpina apresentaram redução na quantidade de crises durante SE e também redução da quantidade de neurônios hipocampais da região CA3 em degeneração quando comparados com os animais que não foram pré-tratados. Isso implica dizer que Solutol[®] HS 15 apresenta efeito biológico em modelo experimental de ELT.

Waterman e colaboradores (2002) afirmam que a presença de grupos funcionais nos excipientes, como carboxilas, sulfitos, aminas, álcoois, ésteres e fenóis, favorece a ocorrência de reações químicas, pois podem agir como sítios para indução de oxidação por transferência de elétrons. Esse efeito acontece em excipientes como polietilenoglicol (FERRERA; VILLANOVA, 2006). E interessante, o Solutol[®] HS 15 é um composto sintético cuja fórmula molecular é $C_{47}H_{94}O_{19}$ e possui em sua composição a presença de ésteres e polietilenoglicol.

Alguns efeitos biológicos de polietilenoglicol (PEG) são relatados na literatura, como no estudo de Luo e colaboradores (2002) que mostrou que em modelo *in vitro* de lesão medular de porquinho da índia, PEG promoveu restauração da integridade da membrana lesionada. E teve efeito de reduzir a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a peroxidação lipídica (LPO) sugerindo que o reparo da membrana seja alvo eficaz na redução da formação (EROs). PEG pode reduzir a concentração de radicais livres por uma ação direta no reparo da membrana da mitocôndria (LUO et al., 2004). No estudo de Liu-Snyder e colaboradores (2007), PEG reduziu a concentração de espécies reativas de oxigênio na medula espinhal danificada e reduziu a lipoperoxidação das membranas por meio de uma interação física com as membranas de mitocôndrias, promovendo um evento inicial de neuroproteção. Já no estudo de Koob e

colaboradores (2006), o tratamento com PEG após lesão cerebral traumática reduz os níveis da proteína precursora beta-amilóide (APP) um tipo de proteína que indica degeneração axonal e causa um prejuízo que pode levar à morte da célula. Interessantemente, foi observado que existe uma relação entre a redução de peptídeo beta-amilóide com a neuroproteção de células piramidais hipocâmpais de CA3 (BALLEZA-TAPIA et al., 2018). Além disso, Solutol[®] HS15 causa inibição do transporte de cálcio através de canais ativados por hiperforina em células neurais (CHAUVET et al, 2015). Os efeitos apresentados por PEG e Solutol[®] HS 15 nesses modelos experimentais podem dar suporte para uma possível explicação dos achados observados sob as crises durante os 90 minutos de SE e na neurodegeneração hipocâmpal presente na fase aguda da epileptogênese.

A elucidação dos mecanismos que ocorrem na epileptogênese são essenciais para o desenvolvimento de intervenções que promovam a prevenção do distúrbio epiléptico crônico (DI MAIO, 2014). Bumanglag e Sloviter (2018) sugerem que a perda de neurônios do hipocampo pode ser o principal mecanismo epileptogênico. E esse fator perdura na fase crônica, visto que as CREs promovem a necrose e apoptose neuronal, por exemplo, pela ativação de proteínas anti / pró-apoptóticas Bcl-2 (HENSHALL; ENGEL, 2013).

Portanto, que são necessários estudos para verificar o efeito do Solutol[®] HS 15 nas CREs e neurodegeneração presente na fase crônica da epileptogênese. Além disso, são necessárias metodologias que expliquem o mecanismo de ação do Solutol[®] HS 15 nas vias moleculares do processo epileptogênico que ocorre no modelo experimental de ELT para esclarecer melhor o papel desse excipiente farmacêutico no tratamento da ELT.

6. CONCLUSÃO

Solutol[®] HS 15 apresenta efeito nas crises durante SE e na neurodegeneração hipocampal presente na fase aguda da epileptogênese em modelo experimental de ELT, sugerindo uma ação anticonvulsivante e neuroprotetora. O trabalho, portanto, é promissor e abre perspectiva para investigar o efeito deste excipiente durante a fase crônica da epileptogênese e avaliar a possibilidade e eficácia de ser utilizado no tratamento da ELT.

REFERÊNCIAS

- ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN JUNIOR, L. V. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistema de liberação de fármacos**. 6. ed. São Paulo: Premier, 2000. 568p.
- ANTUNES, M. F. D. **Investigação do efeito de analgésicos no pós-operatório de ratos wistar submetidos ao modelo de cirurgia estereotáxica**. 43 f. Dissertações. Mestrado em Fisiologia Comparada. Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Norte. 2013.
- BABB, T.L., et al. Distribution of pyramidal cell density and hyperexcitability in the epileptic human hippocampus. **Epilepsia**. 1984. 25:721-8.
- BALLEZA-TAPIA, H.; et al. TrpV1 receptor activation rescues neuronal function and network gamma oscillations from Ab-induced impairment in mouse hippocampus in vitro. **eLife**. 2018.
- BERG, A.T. The natural history of mesial temporal lobe epilepsy. **Curr Opin Neurol**. 2008. 21(2):173-8.
- BERG, A.T., et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology. **Epilepsia**, 2010. v. 51(4) p. 676-685.
- BITTNER, B.; et al. Impact of Solutol HS 15 on the pharmacokinetic behavior of midazolam upon intravenous administration to male Wistar rats. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. 2003. 56: 143–146.
- BLUMCKER, I., et al. Altered distribution of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4- isoxazole propionate receptor subunit subunit NMDAR1 in hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy. **Acta. Neuropathologica**. 1999. 92 (2-3): 205-23.
- BUMANGLAG, A. V.; SLOVITER, R. S. No latency to dentate granule cell epileptogenesis in experimental temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. **Epilepsia**. 2018. 59: 2019–2034.
- BUMANGLAG, V. A.; SLOVITER, S. R. Minimal latency to hippocampal epileptogenesis and clinical epilepsy after perforant pathway stimulation-induced status epilepticus in awake rats. **J Comp Neurol**. 2008. 510 (6): 561–580.
- CACIAGLI, L.; et al. A meta-analysis on progressive atrophy in intractable temporal lobe epilepsy Time is brain? **Neurology**. 2017. 89 (5): 506–516.
- CASTRO, O.W. **Análise comparativa da neurodegeneração e neurogênese após Status Epilepticus induzido por administração sistêmica de pilocarpina e microinjeções na formação hipocampal de pilocarpina e extrato bruto de carambola, modelos de epilepsia do lobo temporal**. 2012. 276 f. Tese (Doutorado em Fisiologia) –Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2012.

CAVALHEIRO, E.A., et al. Long-term effects of intrahippocampal kainic acid injection in rats: a method for inducing spontaneous recurrent seizures. **Electroenceph Clin Neurophysiol**. 1982. 53: 581-589.

CHAUVET, S. et al. Lipid nanocapsules containing the non-ionic surfactant Solutol HS15 inhibit the transport of calcium through hyperforin-activated channels in neuronal cells. **Neuropharmacology**. 2015. 99: 726-734.

DA COSTA, J.C.; et al. **Fundamentos neurobiológicos das epilepsias: aspectos clínicos e cirúrgicos**. São Paulo: Lemos Editorial. 1998.

DE BRUIN, V. M. S., et al. Behavioral and neurochemical alterations after lithium–pilocarpine administration in young and adult rats: A comparative study. **Pharmacol Biochem Behav** 2000. 65 (3) 547–551.

DI MAIO, R. Neuronal mechanisms of epileptogenesis. **Front. Cell. Neurosci**. 2014.

DREIFUSS, F.E. **O que é a epilepsia**. In REISNER, Helen (org.). Crianças com epilepsia. Campinas: Papirus Editora, 1996.

DUCHOWNY, M. S.; et al. Language cortex representations: effects of developmental versus acquired pathology. **Ann Neurol**. 1996. n. 40, p. 3-38.

DUDEK, F.E.; STALEY, K.J. The time course and circuit mechanisms of acquired epileptogenesis. In **Jasper's basic mechanisms of the epilepsies** (ed. NOEBELS, J.L.; et al.). National Center for Biotechnology Information. 2012.

EADIE M. Epilepsy-from the Sakikku to hughlings Jackson. **J Clin Neurosci**. 1995. 2: 156-162.

EDDY, C. M.; RICKARDS, H. E.; CAVANNA, A. E. The cognitive impact of antiepileptic drugs. **Ther Adv Neurol Disord**. 2011. 4 (6): 385–407.

ENGEL J. J.; SHIELDS, W D. Surgically remediable syndromes. In: Engel JJ, Peddley TA, editors. **Epilepsy: A comprehensive textbook**. Philadelphia: Lippincott-Raven. 1997. p. 1687-96.

ENGEL Jr. J., et al. Outcome with respect to epileptic seizures. In: Engel Jr J, editor. Surgical treatment of the epilepsies. 2^a ed. New York: Raven Press. 1993. p. 609-21.

ENGEL, A.; et al., Pharmaceutical Excipients Influence the Function of Human UptakeTransporting Proteins. **Mol. Pharmaceutics**. 2012. 9: 2577–2581.

ENGEL, J. Report of the ILAE classification core group. **Epilepsia**. 2006. 47, 1558-1568.

FERNANDES, P. T. **Estigma na Epilepsia**. 196 f. Teses (Doutorado em Ciências Médicas) Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2005.

FERNANDES, P. T.; LI M. L. Percepção de Estigma na Epilepsia. **J Epilepsy Clin Neurophysiol**. 2006. 12(4):207-218.

FERREIRA, A.O.; VILLANOVA, J. **Excipientes e adjuvantes farmacotécnicos**. São Paulo, 2006.

FISHER, R. S.; et al. Epileptic seizures and epilepsy definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau of Epilepsy (IBE). **Epilepsies**. 2005. 17(3): 129-32.

FRENCH, J.A.; WILLIAMSON, P.D.; THADANI, V.M.; et al. Characteristics of medial temporal lobe epilepsy: results of history and physical examination. **Ann Neurol**. 1993. v. 34, p. 774.

GARCÍA-GARCÍA, F., et al. Growth hormone improves hippocampal adult cell survival and counteracts the inhibitory effect of prolonged sleep deprivation on cell proliferation. **Brain res bull**. 2011. v 28843 p. 252-7.

GILGUN-SHERKI, Y.; et al. Antioxidant therapy in acute central nervous system injury: current state. **Pharmacological Reviews**. 2002. 54 (2): 271-284.

GOLYALA, A., KWAN, P. Drug development for refractory epilepsy: The past 25 years and beyond. **Seizure**. 2017. 44: 147–156.

GOMES, M. M. História da Epilepsia: Um Ponto de Vista Epistemológico. **J Epilepsy Clin Neurophysiol**. 2006. 12(3):161-167.

GONZÁLEZ, R. C. B.; et al. In vitro Investigation on the Impact of the Surface-active Excipients Cremophor EL, Tween 80 and Solutol HS 15 on the Metabolism of midazolam. **Biopharm. Drug Dispos**. 2004. 25: 37–49.

HENSHALL, D. C.; ENGEL, T. Contribution of apoptosis-associated signaling pathways to epileptogenesis: lessons from Bcl-2 family knockouts. **Front. Cell. Neurosci**. 2013. 7:110.

HU, L.; et al. Effect of the additives on clouding behavior and thermodynamics of coenzyme Q10-Kolliphor HS15 micelle aqueous solutions. **Chemical Physics Letters**. 2017. 687: 264–269.

JACOBY, A., BAKER, G.A. Quality-of-life trajectories in epilepsy: a review of the literature. **Epilepsy Behav**. 2008. 12:557–71.

KONDRATYEVA, A.; GALE, K. Latency to onset of status epilepticus determines molecular mechanisms of seizure-induced cell death. **Molecular Brain Research**. 2004. 121: 86–94.

KOOB, A.O.; BORGENS, R.B.; Polyethylene glycol treatment after traumatic brain injury reduces betaamyloid precursor protein accumulation in degenerating axons. **Journal of neuroscience research**. 2006. 83(8):1558–63.

KU, S.; VELAGALETI, R. Solutol HS15 as a Novel Excipient: Identification of the Need for and Implementation of a US Regulatory Strategy. **Pharmaceutical Technology**. 2010. 34(11):108–10.

- KUDIN, A. P.; et al. The Mechanism of Neuroprotection by Topiramate in an Animal Model of Epilepsy. **Epilepsia**. 2004. 45(12):1478–1487.
- KWAN, P.; BRODIE, M.J. Early identification of refractory epilepsy. **N Engl J Med**. 2000. 342(5):314-9.
- LEITE, J. P.; BORTOLOTTI, Z. A.; CAVALHEIRO, E. A. Spontaneous recurrent seizures in rats: an experimental model of partial epilepsy. **Neurosci. Biobehav. Rev.** 1990. 14:511-517.
- LEITE, J. P.; GARCIA-CAIRASCO, N.; CAVALHEIRO, E. A. New insights from the use of pilocarpine and kainite models. **Epilepsy Research**. 2002. v. 50 p. 93-103.
- LEITE, J.P., et al. **Fundamentos neurobiológicos das epilepsias: aspectos clínicos e cirúrgicos**. São Paulo: Lemos Editorial. 1998. 129-136.
- LIN, H. W. et al. Fatty Acid Methyl Esters and Solutol HS 15 Confer neuroprotection After Focal and Global Cerebral Ischemia. **Transl Stroke Res**. February; 2014. 5(1): 109–117.
- LIU, D.; et al. Astrocytic demise precedes delayed neuronal death in focal ischemic rat brain. **Molecular Brain Research**. 1999. 68: 29–41.
- LIU-SNYDER, P., et al. Neuroprotection from secondary injury by polyethylene glycol requires its internalization. **The Journal of experimental biology**. 2007. 210(Pt 8):1455–62.
- LOWENSTEIN, D. H.; BLECK, T.; MACDONALD, R. L. It's Time to Revise the Definition of Status Epilepticus. **Epilepsia**. 1999. 40(1):120-122.
- LUO, J.; BORGES, R.; SHI, R. Polyethylene glycol immediately repairs neuronal membranes and inhibits free radical production after acute spinal cord injury. **Journal of Neurochemistry**. 2002. 83, 471–480.
- MAGIORKINIS, E.; SIDIROPOULOU, K.; DIAMANTIS, A. Hallmarks in the History of Epilepsy: From Antiquity Till the Twentieth Century. In: Foyaca-Sibat H, ed. **Novel Aspects on Epilepsy: INTECH**. Open Access Publisher. 2011. 131-156.
- MASIA, S.L., DEVINSKY, O. Epilepsy and behavior: A brief history. **Epilepsy Behav**. 2000;1(1):27-36.
- MATHERN, G.W., et al. The pathogenic and progressive features of chronic human hippocampal epilepsy. **Epilepsy Research**. 1996. 26: 151-161.
- McNAMARA, J. O. Cellular and molecular basis of epilepsy. **The journal of neuroscience**. 1994. 14(6): 3413-3425.
- McNAMARA, J.O. Emerging insights into the genesis of epilepsy. **Nature**. 1999. v. 399 p. A15–A22.
- MELLO, L.E.; BORTOLOTTI, Z.A.; CAVALHEIRO, E.A. Modelos experimentais de epilepsias. Uma Revisão. **Neurobiologia**. 1986. 49:231-268.

MOREIRA, S. R. G. Epilepsia: concepção histórica, aspectos conceituais, diagnóstico e tratamento. **Mental**. 2004. 107-122.

NAPKE, E. **A commitment to pharmacovigilance: 40 years on Ed Napke reflects on his life in pharmacovigilance**. Uppsala Rep. 2004. 25:1-15.

OHTAKI, H.; et al. Evaluation of brain ischemia in mice. **Acta Histochemica et Cytochemica**. 2005. 38 (2): 99-106.

OLIVEIRA, J.; GOUVEIA, O. Transtornos psiquiátricos associados à epilepsia. **Revista de Psiquiatria clínica**. 2003. n. 30, p. 60-164.

OTTER, M. et al. Effects of frequently used pharmaceutical excipients on the organic cation transporters 1–3 and peptide transporters 1/2 stably expressed in MDCKII cells. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. 2017. 112: 187–195.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. Academic Press, Inc. 1996.

RACINE, R.J. Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizure. **Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol**. 1972. v. 32, p. 281–294.

REDDY, D.S.; KURUBA, R. Experimental Models of Status Epilepticus and Neuronal Injury for Evaluation of Therapeutic Interventions. **Int J Mol Sci**. 2013. v. 14(9) p. 18284–18318.

REGE, B. D.; KAO, J. P. Y.; POLLI, J. E. Effects of nonionic surfactants on membrane transporters in Caco-2 cell monolayers. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. 2002. 16: 237–246.

REYNOLDS, E.H. The ILAE/IBE/WHO epilepsy global campaign history. International League Against Epilepsy. **International Bureau for Epilepsy**. Epilepsy, New York. 2002. v. 43, n. 6, p. 9-11.

RIGGS, A. J.; RIGGS, J. E. Epilepsy's Role in the Historical Differentiation of Religion, Magic, and Science. **Epilepsia**. 2005. 46(3):452–453.

SCHEFFER, I. E., et al. Classificação das epilepsias da ILAE: Relatório da Comissão de Classificação e Terminologia da ILAE. **Epilepsia**. 2017. 58(4):512-521.

SCHWABE K, EBERT U, LÖSCHER W. Bilateral Lesions of the Central but not Anterior or Posterior Parts of the Piriform Cortex Retard amygdala Kindling in Rats. **Neurosci**. 2000. 101(3):513-521.

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 Behav**. 2014. 31: 228-242.

SIDIROPOULOU, K.; DIAMANTIS, A.; MAGIORKINIS, E. Hallmarks in 18th- and 19th-century epilepsy research. **Epilepsy Behav**. 2010. 18: 151-161.

SILVA, A. V.; Cabral, F. R. Ictogênese, Epileptogênese e Mecanismo de Ação das Drogas na Profilaxia e Tratamento da Epilepsia. **J Epilepsy Clin Neurophysiol**. 2008. 14(2):39-45

SILVA, I.R.; et al. Epilepsia e Neuroproteção: O Papel do Agonista Adenosinérgico A1(RPia) na Modulação da Crise Induzida por Pilocarpina. **J Epilepsy Clin Neurophysiol**; 2008. 14(3):106-110.

SILVA. F. B.; FILHO, R. C. M. F. Estigma na Epilepsia: Aspectos Conceituais, Históricos e Suas Implicações na Escola. **Revista Thema**. 2014. 11 (02).

SMITH, M.; WILCOX, K.S.; WHITE, H. S. Discovery of antiepileptic drugs. Neurotherapeutics: **The Journal of the American Society for Experimental Neuro Therapeutics**. 2007. 4:12-17.

TANG, X. H.; et al. Tenidap is neuroprotective in a pilocarpine rat model of temporal lobe epilepsy. **Chin Med J**. 2013.126 (10).

TÉLLEZ-ZENTENO, J. F.; HERNÁNDEZ-RONQUILLO, L. A Review of the Epidemiology of Temporal Lobe Epilepsy. **Epilepsy Res Treat**. 2012. p. 630853.

TRAUB, R.D.; LLINAS, R. Hippocampal pyramidal cells: significance of dendritic ionic conductances for neuronal function and epileptogenesis. **J. Neurophysiol**. 42 (1979) 476-496.

TURSKI, W.A., et al. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. **Behav Brain Res**. 1983. 9:315- 35. 27.

VENTURIN, G.T. **Efeito do transplante de células mononucleares de medula óssea na frequência de crises e no desempenho cognitivo de ratos com epilepsia por lítio pilocarpina**. (Mestrado Neurociências). UFRS- Porto Alegre- Rio Grande do Sul-Brasil. 2008.

VILLANOVA, J.C.O.; SÁ, V.R. **Excipientes, guia prático para padronização**. São Paulo: Pharmabooks, 2009.

WATERMAN, K.C. et al. Stabilization of Pharmaceuticals to Oxidative Degradation. **Pharmaceutical Development and Technology**. 2002. 7 (1): 1-32

WEISZ G. The emergence of medical specialization in the nineteenth century. **Bull Hist Med**. 2003. 77: 536-575.

WOODS, A. S.; et al. Gangliosides and Ceramides Change in a Mouse Model of Blast Induced Traumatic Brain Injury. **ACS Chem. Neurosci**. 2013.

YACUBIAN E. **Epilepsia da antiguidade ao segundo milênio: saindo das sombras**. São Paulo: Lemos Editorial. 2000.

ZHANG, Y.M.; et al. Effects of phenytoin on morphology and structure of hippocampal CA3 pyramidal neurons of rats in chronic stress. **Acta Pharmacol**. 2003. 24 (5): 403-407.

ANEXOS

ANEXO A



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

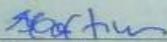


CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "*Efeito do Solutol HS 15 na fase aguda da epileptogênese em modelo experimental de epilepsia do lobo temporal induzida por pilocarpina*", registrada com o nº 37/2017, sob a responsabilidade do pesquisador **Prof. Daniel Leite Góes Gital**, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alagoas (CEUA/UFAL), em reunião de 06.09.2017.

| | |
|----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| Vigência da autorização | 20/10/2017 a 20/12/2018 |
| Espécie/linhagem/raça | Rato heterogênico / Wistar |
| Nº de animais | 112 |
| Peso/idade | 150-250 g / 30 dias |
| Sexo | Machos |
| Origem/Local de manutenção | Biotério Central / Biotério do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do ICBS-UFAL |

Maceió, 13 de setembro de 2017.


Prof. Dr. Silvana Ayres Martins
Coordenadora CEUA/UFAL

Profa. Dra. Silvana Ayres Martins
Coordenadora da Comissão de
Ética no uso de Animais
SIAPE 1120858