

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

IGOR SANTANA DE MELO

**ANÁLISE FUNCIONAL DE COTRANSPORTADORES DE SÓDIO/GLICOSE
(SGLT) NO *STATUS EPILEPTICUS* INDUZIDO POR MICROINJEÇÃO
HIPOCAMPAL DE PILOCARPINA**

MACEIÓ-AL

2016

IGOR SANTANA DE MELO

**ANÁLISE FUNCIONAL DE COTRANSPORTADORES DE SÓDIO/GLICOSE
(SGLT) NO *STATUS EPILEPTICUS* INDUZIDO POR MICROINJEÇÃO
HIPOCAMPAL DE PILOCARPINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Alagoas, em cumprimento às exigências para a obtenção do título de Mestre pela referida Instituição.

Orientador: Prof. Dr. Robinson Sabino da Silva

Coorientador: Prof. Dr. Olagide Wagner de Castro

MACEIÓ- AL

2016

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

M528a Melo, Igor Santana de.
Análise funcional de cotransportadores de sódio/glicose (SGLT) no *Status Epilepticus* induzido por microinjeção hipocampal de pilocarpina / Igor Santana de Melo. – 2016.
120 f. ; il.

Orientador: Robinson Sabino da Silva.
Coorientador: Olagide Wagner de Castro.
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, 2016.

Bibliografia: f. 84-90.
Anexos: f. 92-120.

1. *Status Epilepticus*. 2. Epilepsia. 3. SGLTs. 4. Florizina. I. Título.

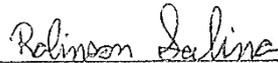
CDU: 616.853

Folha de Aprovação

Igor Santana de Melo

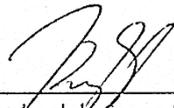
Análise funcional de cotransportadores de sódio/glicose (SGLTS) no Status Epilepticus induzido por microinjeção hipocampal da pilocarpina

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 25 de fevereiro de 2016.

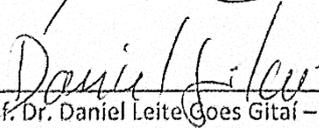


Prof. Dr. Robinson Sabino da Silva (Orientador)

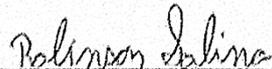
Banca Examinadora



Prof. Dr. Raphael de Souza Pinto – (CESMAC)



Prof. Dr. Daniel Leite Goes Gital – (UFAL)



Prof. Dr. Robinson Sabino da Silva - (UFAL)

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Neurofarmacologia e Fisiologia Integrativa - LNFI, do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde/ ICBS, da Universidade Federal de Alagoas/UFAL, sob orientação do Prof. Dr. Robinson Sabino da Silva e coorientação do Prof. Dr. Olagide Wagner de Castro.

Dedico em primeiro lugar aquele que me constringe com seu amor todo dia e que me dá forças para prosseguir, crescer e conquistar, meu querido amigo Espírito Santo.

A meus pais, Ivan e Adriana, e minha noiva, Juliana, por acreditarem em mim durante mais esta fase na minha vida, assim como todos que estiveram do meu lado.

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte da minha vida, real motivo da minha existência e de estar fazendo mestrado. Se não fosse pelo meu Deus, o SENHOR, hoje não sei se chegaria tão longe. Sou grato ao meu amigo Espírito Santo, por ter me conduzido durante toda essa trajetória, por ter me dado força e instruções sábias e adequadas. A Ele toda honra e louvor acima de tudo.

A minha família, meu pai, mãe, irmã e todos os meus parentes próximos que mostraram satisfação por eu estar cursando uma pós-graduação. Obrigado por me ensinarem a ter um espírito de vencedor e a ter garra para conquistar meus sonhos.

A minha eterna namorada, hoje noiva, que desde da época da escola esteve comigo e sempre acreditou em mim de uma maneira grandiosa. Obrigado, pela sua confiança sincera, pelo seu apoio indispensável nessa trajetória, pela sua alegria ao me ver realizado... nunca esquecerei sua reação quando te liguei para dizer que passei no mestrado. Te amo, linda!

Ao meu orientador, Robinson Sabino, por ter me dado a chance de fazer este mestrado e por toda a confiança. Agradeço a Deus pelo que aprendi com o senhor desde a minha graduação. Hoje digo que a essência do ser pesquisador, parte dela aprendi com o senhor.

Ao meu coorientador, Olagide Castro, por todos os ensinamentos tão presentes ao longo do meu mestrado, desde momentos na bancada em experimento a discussões de conteúdos e *papers*. Obrigado por também sempre pensar alto e me mostrar que eu posso chegar a lugares que nunca imaginei chegar. Nunca esquecerei do seu entusiasmo ao falar da possibilidade do doutorado sanduíche nos Estados Unidos... grato por acreditar em mim.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde que contribuíram na construção do meu conhecimento ao longo deste ciclo. Em especial, posso citar os professores Daniel Gitaí e Adriana Ximenes, suas aulas, conhecimentos e amor pela ciência influenciaram bastante no meu processo de ensino e aprendizagem.

A minha parceira de experimento e amiga, Yngrid Mickaelli, que me proporcionou momentos alegres e satisfatórios durante todo o curso deste ciclo em minha vida. Dizemos que os experimentos do mestrado nos aproximaram... e de fato foi o que aconteceu. Ao término desta jornada, sei que não só ganharei um título de mestre, mas também levarei comigo uma fiel amiga para o resto da vida. Obrigado por tudo, cabeça.

A minha amiga, fiel escudeira, Návylla Medeiros, que me incentivou desde antes do mestrado, também sempre acreditou em mim, mostrando que eu conseguiria. Lembro-me de toda etapa de transição TCC-Mestrado em você esteve ao meu lado e que também vibrou comigo na minha aprovação, dizendo que já sabia que eu passaria. Muito obrigado, *little fish*.

A minha parceira, Nívea Gusmão, representando a minha turma do Mestrado em Ciências da Saúde 2014, por ter me ajudado ao longo destes anos com todos seus conhecimentos farmacêuticos. Lembro-me do início dos experimentos quando você me ajudou com os cálculos da florizina, além de termos passados juntos a tensão do dia da seleção de mestrado, como esquecer? Obrigado, cabeça!

A todos do Laboratório de Neurofarmacologia e Fisiologia Integrativa (LNFI) que hoje faço parte, por terem me ajudado de alguma forma na realização deste trabalho. Maísa, sua colaboração e participação nos meus experimentos, com um espírito de mãe e amiga, foram indispensáveis... obrigado por nunca ter negado uma ajuda, pelo contrário, sempre fez o que estava ao seu alcance para contribuir. Amanda, muito obrigado por todo seu companheirismo, apoio e amizade... você sempre me proporcionou momentos alegres.

Ao Laboratório de Biologia Celular (LBC), que um dia fiz parte, na pessoa dos professores Emiliano Barreto e Salete Smaniotto, pela confiança depositada em mim ao abrirem as portas de seu laboratório, para que grande parte dos resultados deste trabalho fossem gerados. Além disso, agradeço também a alguns membros do LBC pelo carinho e credibilidade: Návylla, Larissa, Janylle, Polliane, Rebecka e Alex.

Aos meus amigos das JIDAT, João Pedro, Douglas e Avanielle, que mesmo depois do término da graduação sempre estiveram perto de mim e me instigaram ao longo da pesquisa. Conversar com cada um de vocês sempre renovava as minhas forças.

A minha amiga, Mykaella, por sempre trazer paz ao meu coração toda vez que nos encontramos através de mensagens sábias vindas diretamente da parte de Deus. Muito obrigado por tudo, Mykinha.

Aos meus amigos de graduação, Ciências Biológicas, na pessoa do João Pedro, Douglas Amorim, Amanda Paula, Monique, Dáphyne e Iara, por suas amizades e por contribuírem na minha formação.

A todos meus amigos da IEQ, que me ajudaram em oração e com palavras vindas da parte do Pai. A presença de vocês em minha vida, sempre acreditando no meu sucesso, contribuiu para eu alcançar a conclusão deste trabalho. Agradeço aos meus amigos: Jandson, Isabelle, Francinni, Damião, Jack, Leonardo, Karine, Emerson e todos que fazem parte da Mocidade Quadrangular da Pajuçara, grupo que amo de coração.

A Universidade Federal de Alagoas, por seu apoio institucional, bem como aos órgãos de fomento, CNPq, Capes e FAPEAL, pelo apoio financeiro.

A todos que de certa forma contribuíram na conclusão de mais este ciclo em minha vida.

"Tenho posto o SENHOR continuamente diante de mim; por isso que ele está à minha mão direita, nunca vacilarei."

(Salmo 16:8)

RESUMO

Epilepsia do Lobo Temporal Mesial (ELTM) é caracterizada por crises parciais e complexas, iniciando-se a partir de desordens funcionais secundárias devido a diversos insultos epileptogênicos, como convulsão febril, traumas ou *Status Epilepticus* (SE), que é definido como crises contínuas autossustentadas. Embora a hipoglicemia esteja associada ao SE, os efeitos da inibição de cotransportadores de Na⁺/glicose (SGLTs) no hipocampo são desconhecidos. O presente trabalho avaliou o papel funcional de SGLTs no padrão das crises límbicas e no processo de neurodegeneração. Ratos Wistar receberam microinjeções de salina (SAL, 1µL) ou florizina (FLO, 50µg/µL), um inibidor inespecífico de SGLTs, no giro denteado do hipocampo seguido 30 minutos depois por pilocarpina (1,2mg/µL) (SAL+PILO ou FLO+PILO, respectivamente). As crises límbicas foram classificadas usando a escala de Racine e o número de Wet Dog Shake (WDS) foi quantificado antes e durante o SE. O processo de neurodegeneração foi avaliado por Fluoro-Jade (FJ) e os neurônios FJ positivos (FJ+) foram contados. 24h e 15 dias após SE. Animais sujeitos à FLO tiveram um número maior ($p<0,05$) de WDS em relação à SAL. A severidade das crises não foi significativa entre os grupos SAL+PILO e FLO+PILO. Porém, o padrão de crises límbicas foi alterado significativamente em FLO+PILO. Além disso, em relação à evolução do SE, a classe 5 da escala de Racine se repetiu mais vezes ($p<0,05$) que os outros níveis no grupo FLO+PILO, em 50, 60 e 70 min da indução do SE. Depois de 24 horas do SE, animais FLO+PILO tiveram um maior número de FJ+ ($p<0,05$) no giro denteado (GD), *hilus*, CA3 e CA1 do hipocampo quando comparado às mesmas regiões de SAL+PILO. No entanto, após 15 dias do SE, animais FLO+PILO tiveram um menor número de FJ+ ($p<0,05$) na região CA1 em relação à mesma região de SAL+PILO. Em conjunto, nossos dados sugerem que a inibição de SGLTs aumenta a gravidade das crises límbicas em pontos específicos (50-70 min) durante o SE. Além disso, a inibição da função de SGLT no hipocampo também aumenta a neurodegeneração 24h após SE, sugerindo que SGLT1 e SGLT2 podem participar na modulação do estágio inicial do processo epileptogênico.

Palavras-chave: SGLTs. Florizina. *Status Epilepticus*.

ABSTRACT

Temporal Lobe Epilepsy (TLE) is characterized by recurrent spontaneous seizures, starting from secondary functional disorders due to several insults, including self-sustaining continuous seizures identified as *Status Epilepticus* (SE). Although hypoglycemia has been associated with SE, the effect of inhibition of the Na⁺/glucose cotransporters (SGLT) on hippocampus was unknown. Here we evaluated the functional role of SGLT in the pattern of limbic seizures and neurodegeneration process after PILO-induced SE. Vehicle (VEH, 1μL) or phlorizin, a specific SGLT inhibitor (PZN, 1μL, 50μg/μL), were administered in the hippocampus of rats 30 minutes before PILO-induced SE (VEH+PILO or PZN+PILO, respectively). The limbic seizures were classified using the Racine's scale and the amount of Wet Dog Shake (WDS) was quantified before and during SE. Neurodegeneration process was evaluated by Fluoro-Jade (FJ) and FJ positive neurons (FJ+) were counted 24h and 15 days after SE. PZN-treated rats showed higher (p<0.05) number of WDS in relation to VEH+PILO. The seizure severity was not significant between PZN+PILO and VEH+PILO groups. However, the pattern of limbic seizures significantly changed in PZN+PILO. Indeed the class 5 seizures repeated itself more times (p<0.05) than the other classes in PZN group at 50, 60 and 70 min after SE induction. PZN+PILO animals had a higher (p<0.05) number of FJ+ in the dentate gyrus (DG), hilus, CA3 and CA1 of hippocampus when compared with VEH+PILO. Interestingly, 15 days after SE induction, PZN+PILO animals had a decreased number (p<0.05) of FJ+ in CA1 compared to VEH+PILO. Taken together, our data suggest that SGLT inhibition with PZN increased the severity of limbic seizures in a specific time point (50-70 min) during SE. Besides, the inhibition of SGLT function in hippocampus also increases neurodegeneration in hippocampus 24h after SE, suggesting that SGLT1 and SGLT2 could participate in the modulation of earlier stage of epileptogenic processes.

KEYWORDS: SGLTs. Phlorizin. *Status Epilepticus*.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Esquema do processo epileptogênico.....	23
FIGURA 2	Fotomicrografia do hipocampo.....	24
FIGURA 3	Circuito interno da formação hipocampal.....	26
FIGURA 4	Via pós-SE em neurodegeneração.....	32
FIGURA 5	Estrutura secundária do cotransportador SGLT1	35
FIGURA 6	Esquema do transporte de sódio e glicose através do SGLT.....	36
FIGURA 7	Estrutura química da florizina e estrutura conformacional do sítio de ligação entre a florizina e o SGLT, <i>in silico</i> , em 3D.....	37
FIGURA 8	Delineamento experimental.....	42
FIGURA 9	Diferentes secções do hipocampo.....	46
FIGURA 10	Representação de regiões amostrais para contagem de células FJ+.....	48
FIGURA 11	Representação da contagem de neurônios FJ+.....	49
FIGURA 12	Tempo de latência, quantidade de WDS e gravidade das crises límbicas	52
FIGURA 13	Evolução de todos os níveis ao longo do SE no grupo SAL+PILO e FLO+PILO.....	53
FIGURA 14	Evolução dos níveis da escala de Racine durante o SE em SAL+PILO.....	54
FIGURA 15	Evolução dos níveis da escala de Racine durante o SE em FLO+PILO.....	55
FIGURA 16	Quantidade e tempo total de nível 2 durante o SE.....	57
FIGURA 17	Quantidade de nível 2 por janela durante o SE nos SAL+PILO e FLO+PILO.....	57
FIGURA 18	Quantidade e tempo total de nível 3 durante o SE.....	58
FIGURA 19	Quantidade de nível 3 por janela durante o SE nos SAL+PILO e FLO+PILO.....	59
FIGURA 20	Quantidade e tempo total de nível 4 durante o SE.....	60
FIGURA 21	Quantidade de nível 4 por janela durante o nos SAL+PILO e FLO+PILO.....	60
FIGURA 22	Quantidade e tempo total de nível 5 durante o SE.....	61
FIGURA 23	Quantidade de nível 5 por janela durante o SE nos SAL+PILO e FLO+PILO.....	62

FIGURA 24	Sítio de implantação da cânula no hilus do giro dentado.....	62
FIGURA 25	Análise qualitativa e quantitativa da neurodegeneração FJ+ no giro dentado e hilus do hipocampo de ratos Wistar 24 horas após SE.....	64
FIGURA 26	Análise qualitativa e quantitativa da neurodegeneração FJ+ na região CA3 do hipocampo de ratos Wistar 24 horas após SE.....	65
FIGURA 27	Análise qualitativa e quantitativa da neurodegeneração FJ+ na região CA1 do hipocampo de ratos Wistar 24 horas após SE.....	66
FIGURA 28	Análise qualitativa e quantitativa da neurodegeneração FJ+ na região giro dentado e hilus do hipocampo de ratos Wistar 15 dias após SE.....	68
FIGURA 29	Análise qualitativa e quantitativa da neurodegeneração FJ+ na região CA3 do hipocampo de ratos Wistar 15 dias após SE.....	69
FIGURA 30	Análise qualitativa e quantitativa da neurodegeneração FJ+ na região CA1 do hipocampo de ratos Wistar 15 dias após SE.....	70
FIGURA 31	Análise da cinética da neurodegeneração em SAL+PILO e FLO+PILO	71
FIGURA 32	Modelo ilustrando o funcionamento do SGLT1 em um neurônio saudável (A) e a sua inibição por florizina durante o SE (B) aumentando processos neurodegenerativos.....	80

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Classificação de crises.....	21
TABELA 2	Índice de Racine (1972), modificado por Pinel e Rovner (1978).....	45

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
AC	Ácido caínico
AMPA	Receptor ionotrópico de glutamato – <i>3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate acid</i>
ANOVA	Análise de Variância
AP	Antero-posterior
ATP	Adenosina trifosfato
CA1	Corno de Ammon 1
CA2	Corno de Ammon 2
CA3	Corno de Ammon 3
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
dH₂O	Água destilada
DV	Dorso-ventral
ELTM	Epilepsia do Lobo Temporal Mesial
EPM	Erro padrão da média
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FJ	FluoroJade
FLO	Florizina
FLO+PILO	Ratos que receberam microinjeção de florizina 30 minutos antes da pilocarpina
FLO+SAL	Ratos que receberam microinjeção de florizina 30 minutos antes da salina
GD	Giro dentado
GLUT1	Transportadores de glicose por difusão facilitada tipo 1
GLUT2	Transportadores de glicose por difusão facilitada tipo 2
GLUT3	Transportadores de glicose por difusão facilitada tipo 3
GLUT4	Transportadores de glicose por difusão facilitada tipo 4
GLUT5	Transportadores de glicose por difusão facilitada tipo 5
GLUT8	Transportadores de glicose por difusão facilitada tipo 8

GLUTs	Família dos transportadores de glicose por difusão facilitada
H-PILO	Administração de pilocarpina intrahipocampal
ip	Intraperitoneal
ML	Medio-lateral
Na	Sódio
NMDA	Receptor ionotrópico de glutamato – <i>N-methyl-D-aspartate</i>
PBS	Tampão Fosfato Salina
PFA	Paraformaldeído
PILO	Pilocarpina
SAL	Salina
SAL+PILO	Ratos que receberam microinjeção de salina 30 minutos antes da pilocarpina
SAL+SAL	Ratos que receberam apenas microinjeção de salina
SE	Status Epilepticus
SGLT1	Cotransportador Na ⁺ / glicose/ água tipo 1
SGLT2	Cotransportador Na ⁺ / glicose/ água tipo 2
SGLTs	Família dos cotransportadores de glicose acoplados ao sódio
SNC	Sistema nervoso central
S-PILO	Administração de pilocarpina sistêmica
TCA	Ciclo do ácido tricarbóxico
WDS	Wet dog shake

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1	Epilepsia.....	20
2.1.1	Classificação das crises e epilepsias.....	20
2.1.2	Epilepsia do Lobo Temporal Mesial.....	22
2.2	Formação Hipocampal.....	23
2.3	Status Epilepticus (SE).....	26
2.4	Modelo Animal.....	27
2.4.1	Modelo Químico.....	27
2.4.1.1	Pilocarpina.....	27
2.4.1.2	PILO sistêmica e intrahipocampal.....	28
2.5	Comportamento animal após a indução de PILO.....	29
2.6	Estresse oxidativo e Neurodegeneração.....	30
2.7	Neurodegeneração e hipocampo.....	32
2.8	Metabolismo no Sistema Nervoso Central.....	33
2.8.1	Transportadores de Glicose.....	34
2.8.1.1	GLUTs.....	34
2.8.1.2	SGLTs.....	34
2.8.1.3	Florizina.....	37
2.8.1.4	SGLT e estresse metabólico.....	38
3	OBJETIVOS.....	39
3.1	Geral.....	40
3.2	Específicos.....	40
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
4.1	Animais.....	42
4.2	Cirurgia.....	43
4.3	Microinjeções de Florizina e Pilocarpina.....	43
4.4	Análise Comportamental.....	43
4.5	Perfusão, Pós-fixação e congelamento dos cérebros dos animais.....	45
4.6	Cortes dos cérebros.....	45
4.7	Histologia convencional.....	46

4.8	Histoquímica de Fluoro-jade C.....	46
4.9	Contagem de células.....	47
4.10	Análise estatística.....	49
5	RESULTADOS.....	50
5.1	Análise comportamental.....	51
5.1.1	Avaliação geral das crises.....	51
5.1.2	Avaliação do tempo de latência, wet dog shake e gravidade das crises.....	51
5.1.3	Avaliação da evolução das crises.....	52
5.1.4	Avaliação de cada nível das crises.....	56
5.1.4.1	Nível 2.....	56
5.1.4.2	Nível 3.....	58
5.1.4.3	Nível 4.....	59
5.1.4.4	Nível 5.....	61
5.2	Local de implantação da cânula no hipocampo.....	62
5.3	Neurodegeneração FJ+ nas regiões giro dentado, hilus, CA3 e CA1 do hipocampo após 24h do SE.....	63
5.4	Neurodegeneração FJ+ nas regiões giro dentado, hilus, CA3 e CA1 do hipocampo após 15 dias do SE.....	67
5.5	Cinética de neurodegeneração nas regiões giro dentado, hilus, CA3 e CA1 do hipocampo nos tempos 24 horas e 15 dias após SE.....	67
6	DISCUSSÃO.....	72
6.1	Quantificação do <i>wet dog shake</i> durante a latência e o SE.....	73
6.2	Gravidade e evolução das crises ao longo do SE.....	74
6.3	Neurodegeneração após o SE.....	76
6.4	Associação do comportamento e da neurodegeneração.....	79
7	CONCLUSÃO.....	81
	REFERÊNCIAS.....	83
	ANEXOS	91

1 INTRODUÇÃO

A Epilepsia do Lobo Temporal Mesial (ELTM) é caracterizada por parciais e complexas, iniciando-se por lesões ou alterações fisiológicas decorrentes de diversos insultos, tais como *Status Epilepticus* (SE), traumas ou infecções cerebrais. Estes insultos são geralmente seguidos de um período de latência que podem variar entre dias e semanas em modelo animal (PIERSON e LIEBMANN, 1992) e meses a anos em humanos, antes do início das crises recorrentes e espontâneas (CREs) (SHARMA et al., 2007; BAE et al., 2010; O'DELL et al., 2012). Estes insultos promovem uma série de eventos neurobiológicos, bem como alterações bioquímicas e histológicas, que incluem fenômenos como neurodegeneração e neurogênese (ANDRES-MACH et al. 2011; LIEFFERINGE et al., 2013).

A glicose é o principal substrato metabólico utilizado pelo cérebro, sendo capaz de atravessar a barreira hematoencefálica e atingir o líquido extracelular do sistema nervoso central (SNC), podendo ser usada por neurônios e células da glia (SIESJÖ, 1978). Por ser uma molécula polar, a glicose não atravessa a bicamada lipídica, assim proteínas carreadoras, como os transportadores de glicose por difusão facilitada (GLUTs) e os cotransportadores de Na⁺/glicose (SGLTs), realizam o seu transporte.

O GLUT1 e o GLUT3 já foram identificados no SNC (MANOLESCU et al., 2007). O SGLT1, além de 2 íons Na⁺ e uma molécula de glicose, transporta 264 moléculas de água (SABINO-SILVA et al., 2010). Estudos anteriores mostraram que o SGLT1, além de outras áreas cerebrais, é expresso no hipocampo, especificamente nas subáreas CA1, CA3 e giro dentado (GD). A isoforma SGLT2 realiza o transporte de apenas um íon Na⁺ para cada molécula de glicose (ZHAO; KEATING, 2007). O SGLT2 tem sido observado no hipocampo e cerebelo. (POPPE et al., 1997; YU et al., 2010; YU et al., 2013). Em adição, já foi demonstrado que a utilização reduzida de glicose pode levar à proteção das crises com restrição calórica a longo prazo, porém os mecanismos de ação permanecem desconhecidos (MEIDENBAUER; ROBERTS, 2014). O SGLT1 e SGLT2 são especificamente inibidos por florizina (SABINO-SILVA et al., 2010), contudo os efeitos da dupla inibição dos SGLT no cérebro de ratos sob condições epilépticas são desconhecidos.

O propósito deste estudo foi o de investigar os efeitos da inibição hipocampal de SGLT, reduzindo a utilização de glicose em epileptogênese. A fim de alcançar este objetivo foi quantificado o número de *wet dog shake* antes e durante a SE, na presença de florizina, um inibidor inespecífico de SGLT (EHRENKRANZ et al., 2005). Além disso, foi avaliada a gravidade e evolução das crises límbicas durante o SE. Finalmente, analisou-se o padrão de neurodegeneração em regiões hipocampais, 24 horas e 15 dias após o SE, para verificar a distribuição regional do processo de neurodegeneração.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Epilepsia

O diagnóstico de doenças neurológicas na população humana tem crescido na última década. Esta ascensão ocorre por pelo menos duas razões: o aumento da idade média da população e o maior acesso a plataformas diagnósticas mais sofisticadas para detecção destas doenças (ADAMI; SCESA; BOTTAI, 2014).

A epilepsia é uma desordem neurológica crônica caracterizada pela presença CREs, que são causadas por descargas neuronais de alta frequência com sincronismo anormal (LIEFFERINGE et al., 2013). Estima-se que a prevalência de epilepsia na população mundial seja de 1 a 2%, sendo uma das preocupações em termos de saúde pública o alto número de pacientes com crises convulsivas não tratadas (SANDER, 2003; BAULAC; PITKÄNEN, 2009)

Em 2005, a Liga Internacional contra Epilepsia (*International League Against Epilepsy* – [ILAE]) definiu a epilepsia como uma desordem cerebral caracterizada por uma predisposição persistente a gerar crises epiléticas, com consequências neurobiológicas, cognitivas, psicológicas e sociais (FISHER et al., 2005).

Crise epilética é geralmente confundida com epilepsia. Quando um indivíduo ao longo de sua vida tem uma crise, não implica dizer que esse é portador de epilepsia. Crise epilética é uma ocorrência transitória de sinais e/ou sintomas devido à atividade neuronal excessiva ou sincronização anormal no cérebro (FISHER et al., 2014). Ao passo que epilepsia, como mencionado anteriormente, é caracterizada pela presença de CREs, que são deflagradas a partir de um insulto epileptogênico.

2.1.1 Classificação das crises e epilepsias

As crises epiléticas podem ser classificadas de acordo com a forma que se iniciam ou ainda com os seus fatores etiológicos.

Baseado nos sinais clínicos, as crises epiléticas podem ser classificadas em: focais (ou parciais) e generalizadas (Tabela 1). As crises epiléticas focais se originam a partir de um foco de neurônios em um hemisfério cerebral, podendo ser discretamente localizada ou profundamente distribuída, e são subclassificadas como simples ou complexa. As crises focais simples podem estar associadas a sintomas psíquicos, autonômicos, sensoriais ou somatosensório, no entanto, não promovem perda de consciência e não apresentam duração

maior que um minuto. As crises focais complexas estão sempre associadas à perda de consciência e pode durar mais de um minuto. Ambos os tipos podem desenvolver crises generalizadas secundárias de curta duração. Em contraposição, as crises generalizadas primárias resultam de descargas paroxísticas que ocorrem em ambos os hemisférios cerebrais, podendo se manifestar como crises tonico-clônicas, com perda de consciência (crises de grande mal), crises clônicas ou tônico generalizadas, com ou sem perda de consciência (SHARMA et al., 2007; BERG et al., 2010).

Tabela 1. Classificação de crises

Crises focais
Simples
Complexas
Crises generalizadas
Tônico-clônica
Ausência
Típica
Atípica
Ausência com características especiais
Ausência mioclônica
Mioclonia de pálpebras
Mioclônica
Mioclônica atônica
Mioclônica tônica
Clônica
Tônica
Atônica

Adaptado de Berg et al., 2010.

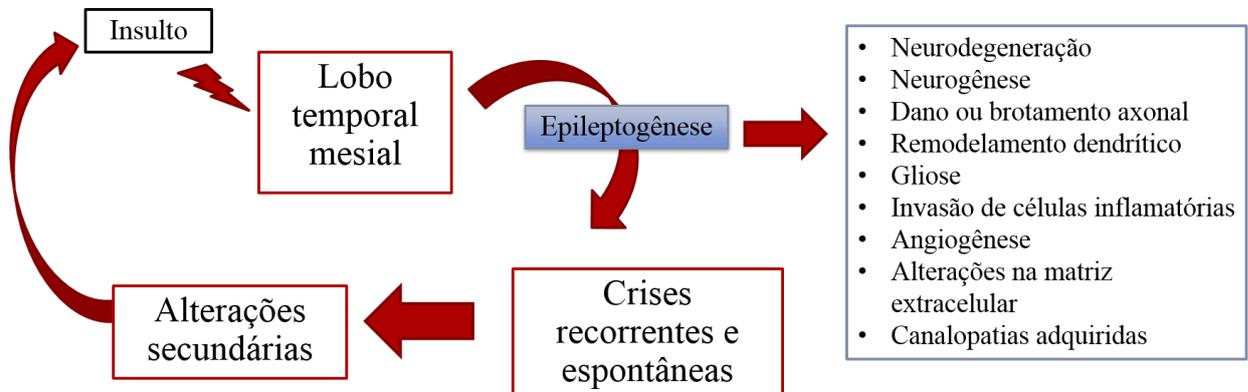
Quanto à etiologia, a epilepsia classifica-se como: genética (idiopática), estrutural/metabólica (sintomática) e causa desconhecida (criptogênica). Epilepsia genética advém de uma alteração genética conhecida ou presumida, podendo ser uma mutação gênica que promove alterações funcionais de proteínas. Uma mutação nos genes que codificam os canais de K^+ dependentes de voltagem (KCNQ2 e KCNQ3) está relacionada a convulsão neonatal familiar benigna, que é uma rara epilepsia idiopática autossômica dominante (GARDINER, 2005). A classificação estrutural/metabólica envolve lesões que incluem desordens adquiridas, tais como acidente vascular cerebral, trauma e infecção. Em se tratando da última classificação etiológica, o termo desconhecido foi considerado o mais adequado para categorizar a presença de epilepsia cuja a causa ainda não está completamente elucidada (BADAWY; HARVEY; MACDONELL, 2009; BERG et al., 2010).

2.1.2 Epilepsia do Lobo Temporal Mesial

A Epilepsia do Lobo Temporal Mesial (ELTM) é o tipo mais comum das epilepsias, marcado por um estado de hiperexcitabilidade e hipersincronização neuronal crônica que é manifestado através de crises focais complexas e recorrentes na presença ou ausência de generalização secundária com origem no lobo temporal mesial (CAVAZOS; JONES; CROSS, 2004; SHARMA et al., 2007).

A ELTM é iniciada por um insulto epileptogênico que pode ser um trauma, uma infecção, acidente vascular encefálico, convulsões febris ou SE. Após essa injúria inicial, segue-se uma cascata de eventos neurobiológicos e diversas alterações celulares, histológicas, bioquímicas e eletrofisiológicas durante o período de latência. Este período permanece sem a presença de sintomas, embora um estado epiléptico esteja sendo estabelecido no cérebro, o que se denomina epileptogênese. Basicamente, a epileptogênese refere-se à alteração de uma rede neuronal normal em uma rede hiperexcitável, transformando um cérebro normal em um “cérebro epiléptico” capaz de gerar CREs. Diversas alterações ocorrem durante este processo incluindo neurodegeneração, neurogênese, dano ou brotamento axonal, remodelamento dendrítico, gliose, invasão de células inflamatórias, angiogênese, alterações na matriz extracelular e canalopatias adquiridas, conforme ilustrado na figura 1 (CAVALHEIRO, 1995; SHARMA et al., 2007; BADAWEY; HARVEY; MACDONELL, 2009; BAULAC; PITKÄNEN, 2009; PITKANEN; LUKASIUK, 2009; O’DELL et al., 2012).

A epilepsia é comumente relacionada à patologia hipocampal, sendo desconhecido se as crises decorrentes da epilepsia são geradas a partir do dano hipocampal ou se as mesmas são a causa do dano (SPIERS, 2012). O interesse pelo hipocampo, como fonte da epileptogênese, advém de muitas observações na esfera clínica. Por volta do século XIX, médicos notaram a presença de danos estruturais em cérebros de epilépticos, mais frequentemente no hipocampo e em estruturas parahipocampais adjacentes. Outros estudos fisiológicos em pacientes submetidos à avaliação para a remoção cirúrgica de um "foco epiléptico" mostraram que as crises frequentemente envolviam em primeiro lugar o hipocampo. Já foi visto que a remoção do hipocampo sozinho pode prevenir mais crises em certos pacientes. Além disso, quando o hipocampo se encontra isolado do restante do cérebro, ainda retém suas propriedades para descargas epileptiformes. O conjunto desses dados da literatura indica que o hipocampo exerce participação considerável na gênese, manutenção e disseminação das crises epiléticas (LEE; HONG, 1990; LOTHMAN; BERTRAM; STRINGER, 1991).

FIGURA 1. Esquema geral do processo epileptogênico

Adaptado de Pitkanen e Lukasiuk, 2009

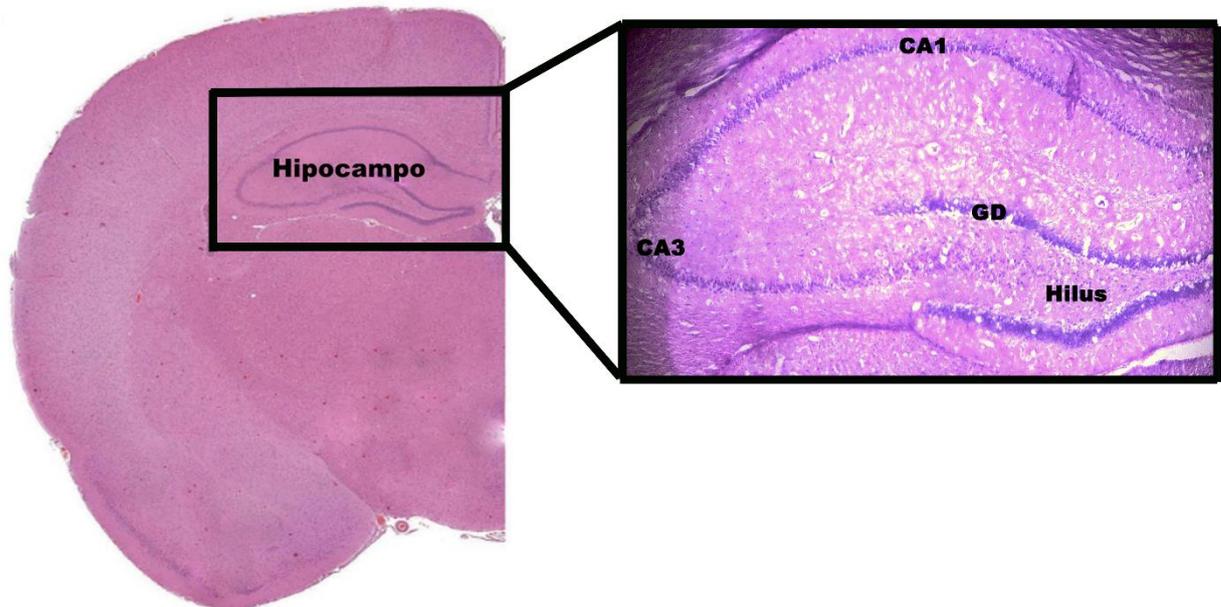
2.2 Formação Hipocampal

O hipocampo desempenha um papel crucial na memória e aprendizagem, encontra-se ao lado do córtex entorrinal e faz parte de uma estrutura maior que recebe o nome de formação hipocampal. Esta região juntamente com o giro do cíngulo, giro parahipocampal, amígdala, área septal e hipotálamo compõem o sistema límbico (SELIG; MALENKA, 1997; RAJMOHAN; MOHANDAS, 2007).

A ELTM promove a esclerose hipocampal, que é uma das mais comuns patologias. A esclerose hipocampal é caracterizada pela perda de neurônios hipocampais e gliose, que se refere à ativação das células gliais em resposta a um dano no sistema nervoso central, consistindo na proliferação de astrócitos, micróglia e oligodendrócitos e na formação de uma cicatriz glial. Na ELTM esses danos podem se estender a outras regiões vizinhas (SILVER; MILLER, 2004; RAJMOHAN; MOHANDAS, 2007; THOM, 2014).

A formação hipocampal é constituída por quatro regiões: o giro dentado (GD); o hipocampo propriamente dito, o qual está subdividido em três sub-regiões, CA3, CA2 e CA1 (Corno de Ammon - CA); o complexo subicular (formado pelo subículo, pré-subículo e parasubículo) e córtex entorrinal (AMARAL; WITTER, 1989). Em outras nomenclaturas, o córtex entorrinal, pré-subiculum e parasubiculum são separados da formação hipocampal e considerados como região parahipocampal. Geralmente, o termo hipocampo é utilizado para se referir coletivamente ao giro dentado e ao hipocampo propriamente dito (SPIERS, 2012). O hipocampo propriamente dito está ilustrado na figura 2.

FIGURA 2. Fotomicrografia do hipocampo



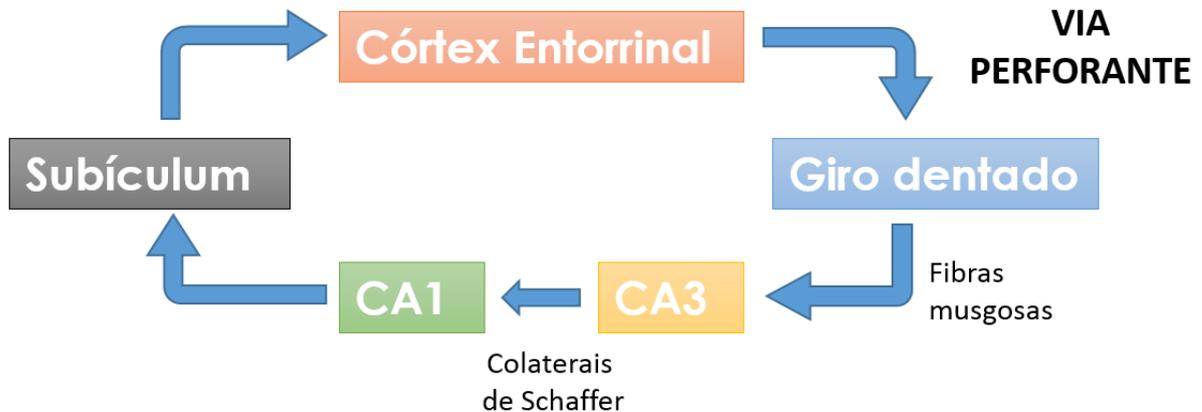
Melo et al., 2015, adaptado de Sharma et al., 2007

A população neuronal do hipocampo pode ser classificada como neurônios principais e interneurônios. Os neurônios principais recebem esta nomenclatura por receberem e realizarem sinapses com neurônios fora do hipocampo, sendo principalmente excitatórios. Já os interneurônios em sua maioria são inibitórios e realizam sinapses locais. Estes interneurônios são responsáveis por controlar os neurônios principais, que equivalem a 90% da população neuronal do hipocampo (FREUND; BUZSAKI, 1996; BERNARD et al. 1998).

O giro dentado é composto por neurônios com formato granular que são os principais neurônios desta região, sendo aproximadamente 18 milhões no cérebro humano. Os corpos celulares destes neurônios constituem uma camada do GD que é denominada granular, enquanto os seus extensos prolongamentos dendríticos formam a camada molecular. A camada molecular do GD é uma área que possui poucas células, como células granulares "deslocadas" e neurônios triangulares e fusiformes com axônios curtos. Existe uma terceira camada do GD que é chamada de camada polimórfica ou *hilus* do GD, que se encontra entre as lâminas da camada granular. Nesta região está presente uma variedade de interneurônios, juntamente com os axônios de células granulares, os quais são conhecidos como fibras musgosas e se projetam para o corno de Ammon. Vale ressaltar que o corno de Ammon começa entre as lâminas das células granulares, porém não é considerada uma parte do hilus (LOTHMAN; BERTRAM; STRINGER, 1991).

As subáreas do CA são caracterizadas por uma única camada de células piramidais que começa no hilus do GD e subsequentemente faz curva para cima do GD e finaliza distalmente no subículo. Como consequência as regiões CA e GD parece duas letras “C” interligadas. CA1, que é mais distante do GD e se estende para o subículo, é facilmente distinguida das duas outras regiões e possuem células piramidais menores e mais densas que as outras. Já CA2 e CA3 se destacam por terem corpos celulares maiores (LOTHMAN; BERTRAM; STRINGER, 1991).

As áreas da formação hipocampal estão ligadas por conexões unidirecionais. O córtex entorrinal é o local onde se origina uma forte projeção para o giro dentado e hipocampo, a via perforante (ou trissináptica), a qual recebe este nome por perfurar a fissura hipocampal. Esta via inicia-se com neurônios do córtex entorrinal que projetam seus axônios na camada molecular do giro dentado, fazendo a primeira sinapse com dendritos apicais das células granulares. Em seguida, estas células granulares projetam através da camada polimórfica (hilus) seus axônios, conhecidos como fibras musgosas, na região CA3, ocorrendo a segunda sinapse da via entre as fibras musgosas e os dendritos apicais dos neurônios piramidais de CA3. Logo após, as células piramidais de CA3 emitem suas projeções axonais, chamadas de colaterais de Schaffer, que fazem a terceira sinapse com os dendritos apicais dos neurônios piramidais de CA1. Posteriormente, axônios são projetados da região CA3 que fazem sinapse com dendritos do subículo. Por fim, axônios do subículo realizam conexão com dendritos do córtex entorrinal, finalizando assim a via trissináptica (RAJMOHAN; MOHANDAS, 2007) (Figura 3).

FIGURA 3. Circuito interno da formação hipocampal

Adaptado de RAJMOHAN e MOHANDAS, 2007

2.3 Status Epilepticus (SE)

Status Epilepticus (SE), também conhecido como estado de mal epilético, é conceituado como sendo um estado em que crises contínuas duram pelo menos 5 minutos ou em que crises distintas ocorrem sem recuperação completa da consciência (SLOVITER, 1999). Porém, alguns outros autores definem SE como crises contínuas que tem duração de 30 minutos ou mais, o que pode levar a um estado epilético crônico (MOHAPEL; EKDAHL; LINDVALL, 2004).

Em pacientes com ELT e em modelos animais quimioconvulsivantes revelaram que o SE está associado com a perda de células em diversas áreas do cérebro. No entanto, nem todas as alterações provenientes do SE estão relacionadas à degeneração. SE também está associado com rearranjos sinápticos anormais, por meio de que uma protuberância de axônios de células granulares do giro dentado (brotamento de fibras musgosas) são encontrados na camada molecular interna do GD e na região CA3 e CA1 (MOHAPEL; EKDAHL; LINDVALL, 2004). Após este período agudo de severas atividades epiléticas contínuas, segue-se o período de latência, podendo ocorrer o surgimento das CREs (COVOLAN; MELLO, 2006).

2.4 Modelo Animal

A possibilidade de reproduzir doenças humanas em modelos animais apresenta uma grande vantagem para a medicina experimental moderna. O modelo animal ideal é homólogo, reproduzindo as doenças humanas em todos os aspectos. Alternativamente, o modelo animal pode ser isomórfico, quando reproduz a doença, mas não a etiologia, a qual em muitas doenças neurológicas é desconhecida (CURIA et al, 2008).

Ao longo dos últimos anos, modelos animais vêm sendo utilizados em pesquisas translacionais, a fim de aprimorar estudos clínicos em humanos, bem como ampliar o conhecimento no tocante à doença. Os modelos de ELTM buscam mimetizá-la, logo roedores devem desempenhar um “histórico clínico” similar ao que ocorre com humanos. Isto inclui um insulto epileptogênico que atinge o hipocampo e /ou o lobo temporal, um período de latência entre o insulto e a ocorrência das crises espontâneas, a manifestação crônica das crises espontâneas (geralmente crises focais e tônico-clônicas) e as alterações histopatológicas características da ELTM (KANDRATACIUS et al., 2014).

2.4.1 Modelo Químico

A partir do uso de quimioconvulsivantes, principalmente pilocarpina e ácido caínico, têm sido gerados, ao longo das últimas décadas, modelos animais que mimetizam a ELT. A administração local ou sistêmica de pilocarpina (PILO) e ácido caínico em roedores leva a um padrão de crises límbicas repetidas e/ou SE, que pode durar muitas horas (LEITE et al., 1990; FURTADO et al., 2002; LEITE; GARCIA-CAIRASCO; CAVALHEIRO, 2002).

2.4.1.1 Pilocarpina

O modelo de indução de SE com PILO em animais experimentais é homólogo com a doença humana. A indução com PILO é frequentemente utilizada como modelo de ELTM em roedores. Em 1983, Turski et al. induziram SE em ratos a partir de pilocarpina, promovendo alterações comportamentais e eletroencefalográficas. A PILO é um agonista de receptores colinérgicos muscarínicos, que reproduz muitos aspectos clínicos e morfológicos de ELTM em roedores, porém as lesões são mais proeminentes no neocórtex que no hipocampo (CURIA et al, 2008; KANDRATACIUS et al., 2014).

A PILO induz SE a partir da ativação do subtipo M1 do receptor muscarínico, que desempenha papel crucial na iniciação das crises, uma vez que camundongos nocautes para o receptor M1 não desenvolveram crises em resposta à PILO (HAMILTON et al., 1997). No modelo de PILO, o SE é ativado por uma via colinérgica, que logo é seguido por uma evolução e manutenção glutamatérgica (TURSKI et al., 1984). Isso foi reiterado por experimentos em que os mesmos autores usaram atropina, um antagonista de receptores muscarínicos, imediatamente após a administração de PILO e os animais não desenvolveram SE. Entretanto, quando a atropina foi injetada após o início do SE, os animais não pararam as crises, o que constatou que o SE possui uma manutenção glutamatérgica.

Algumas importantes características do modelo de PILO são: a indução de SE aguda é mais rápida que com ácido caínico intraperitoneal; a presença de um período de latência seguido do aparecimento de CREs (LEITE et al., 1990); a ocorrência de lesões em várias áreas do tecido nervoso, algumas delas localizadas nas mesmas áreas cerebrais afetadas em pacientes com ELTM e associadas com reorganização de rede neural em regiões hipocampais e parahipocampais (brotamento de fibras musgosas e perda de interneurônios são fenômenos compartilhados por pacientes com ELTM e animais tratados com PILO); as crises são pouco controladas por drogas anti-epilépticas em pacientes e em roedores portadores de epilepsia, induzidos por PILO (CURIA et al, 2008).

2.4.1.2 PILO sistêmica e intra-hipocampal

O modelo de administração de PILO sistêmico (S-PILO) passou a ser largamente utilizado por diversos grupos de pesquisa, uma vez que foi ao encontro da hipótese que estabelecia a relação entre o sistema colinérgico e a epilepsia (BRENNER; MERRIT, 1942), além de se assemelhar à ELTM em humanos, no tocante às alterações morfológica, comportamental e eletrográfica (TURSKI et al., 1984; CAVALHEIRO et al., 1991). Artigos publicados posteriormente (CROISSET; DE WIED, 1992; MILLAN et al., 1993) apresentaram modelos de PILO a partir de microinjeções intracerebroventricular ou intra-hipocampal (H-PILO), no entanto, não houve um detalhamento quanto a análises morfológica, comportamental e eletrofisiológica. Em virtude disso, Furtado et al. (2002) microinjetaram PILO no hilus do giro denteado e os seus achados mostraram que os animais tratados com H-PILO exibiram SE, CREs, brotamento de fibras musgosas, bem como atividade epileptiforme límbica (hipocampo e amígdala), sem perda de animais após o SE, reproduzindo de forma seletiva os dados encontrados no modelo S-PILO.

Embora os modelos S-PILO e H-PILO possuam similaridades essenciais, existem algumas vantagens e desvantagens presentes em ambos. As vantagens do modelo H-PILO incluem uma mortalidade próxima a zero, quando comparada a aproximadamente 70% observado no modelo S-PILO; desenvolvimento de SE em mais de 90% dos animais, quando comparado a quase 50% no modelo S-PILO; uma possível indução de SE por ativação de áreas mais restritas do cérebro; não há necessidade de pré-tratamento com bloqueadores de receptores muscarínicos periféricos (metilescopolamina); rápida recuperação após a injeção de diazepam (CASTRO et al 2011). Entretanto, animais S-PILO requerem cuidados intensivos após a recuperação do SE, o que não é necessário no modelo H-PILO. Não obstante, as desvantagens relacionadas ao modelo H-PILO referem-se à necessidade de cirurgias estereotáxicas em todos os animais, o que claramente aumenta a demanda de tempo para preparação dos experimentos, além da ocorrência de uma lesão mecânica, que é causada pela cânula no tecido nervoso, na área hipocampal que é estimulada, algo que pode ser controlado com grupos independentes que possuam cânulas, mas que apenas recebam o veículo (FURTADO et al. 2002; CASTRO et al. 2011). Ainda que existam essas desvantagens, Castro et al. (2011) mencionam que as vantagens acima citadas justificam o esforço adicional necessário para a indução do modelo H-PILO.

2.5 Comportamento animal após a indução de PILO

Após a indução com PILO, os animais permanecem imóveis por 5 a 10 minutos, o que é seguido por movimentos oro-faciais, salivação, piscar de olhos e contorção das vibrissas, que persiste até 45 minutos (LEITE et al., 1990). Crises descontínuas são observadas 30 minutos após a injeção, durando até 90-150 minutos, antes dando espaço a crises motoras límbicas com intensa salivação, elevação, clonia nas extremidades superiores e queda (TURSKI et al., 1983).

Wet dog shake (WDS) é um padrão motor estereotipado que mimetiza a sacudida de um cachorro molhado, sendo um comportamento típico que ocorre com os ratos após a infusão de H-PILO, em que estes agitam fortemente apenas a cabeça ou a cabeça juntamente com o tronco. Assim que os animais recebem a infusão de PILO no hipocampo ventral, a quantidade de WDS é elevada, porém esse número decresce após o SE (RODRIGUES et al., 2005). WDS já foi estudado em diferentes modelos de epilepsia em ratos, modelos tipo *kindling* – “abrasamento” – (LE GAL LA SALLE; CAVALHEIRO, 1981; RONDOUIN et

al., 1987) e agudo (LOTHMAN; COLLINS, 1981; GRIMES et al., 1988; DAGCI et al., 2002; RODRIGUES et al., 2005).

Em um modelo de PILO intracerebral, semelhantemente ao que foi desenvolvido no presente estudo, Rodrigues et al. (2005) mostrou que a presença de WDS pode ser explicada pela hipótese anticonvulsivante. Nos experimentos deste grupo, neste modelo citado, foi observado que os animais que tiveram SE apresentaram, inicialmente, um número elevado de WDS que diminuiu drasticamente após o SE. Logo, o WDS pode ser a expressão de uma estratégia central de controle de crises

Os numerosos WDS têm sido abordados na literatura como um comportamento associado a crises límbicas no curso de epilepsia focal induzido por estimulações *kindling* ou injeções locais de ácido cáinico ou PILO, que progressivamente desaparecem durante a generalização. WDS pode agir como um indicador de progressão das crises límbicas em direção às generalizadas (RONDOUIN et al., 1987). No entanto, vale ressaltar que a expressão de WDS e crises não dependem de uma via em comum, podendo, então, serem propagados por vias distintas (GRIMES et al., 1988; LEE; HONG, 1990).

2.6 Estresse oxidativo e Neurodegeneração

Em condições fisiológicas normais, os níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) são bem regulados, a fim de realizar funções importantes na célula, como autofagia, sinalização química, divisão celular e apoptose (MAO; FRANKE, 2013). Os radicais livres são gerados pela perda ou ganho de um elétron durante a clivagem homolítica. Devido à presença ou ausência de um elétron em sua órbita, esses radicais comportam-se como fortes oxidantes ou redutores. Tais radicais são altamente instáveis e capazes de iniciar uma reação em cadeia, retirando elétrons de outras moléculas próximas, como lipídios, proteínas e DNA, o que resulta na alteração de suas morfologias e funções (PUTTACHARY et al., 2015).

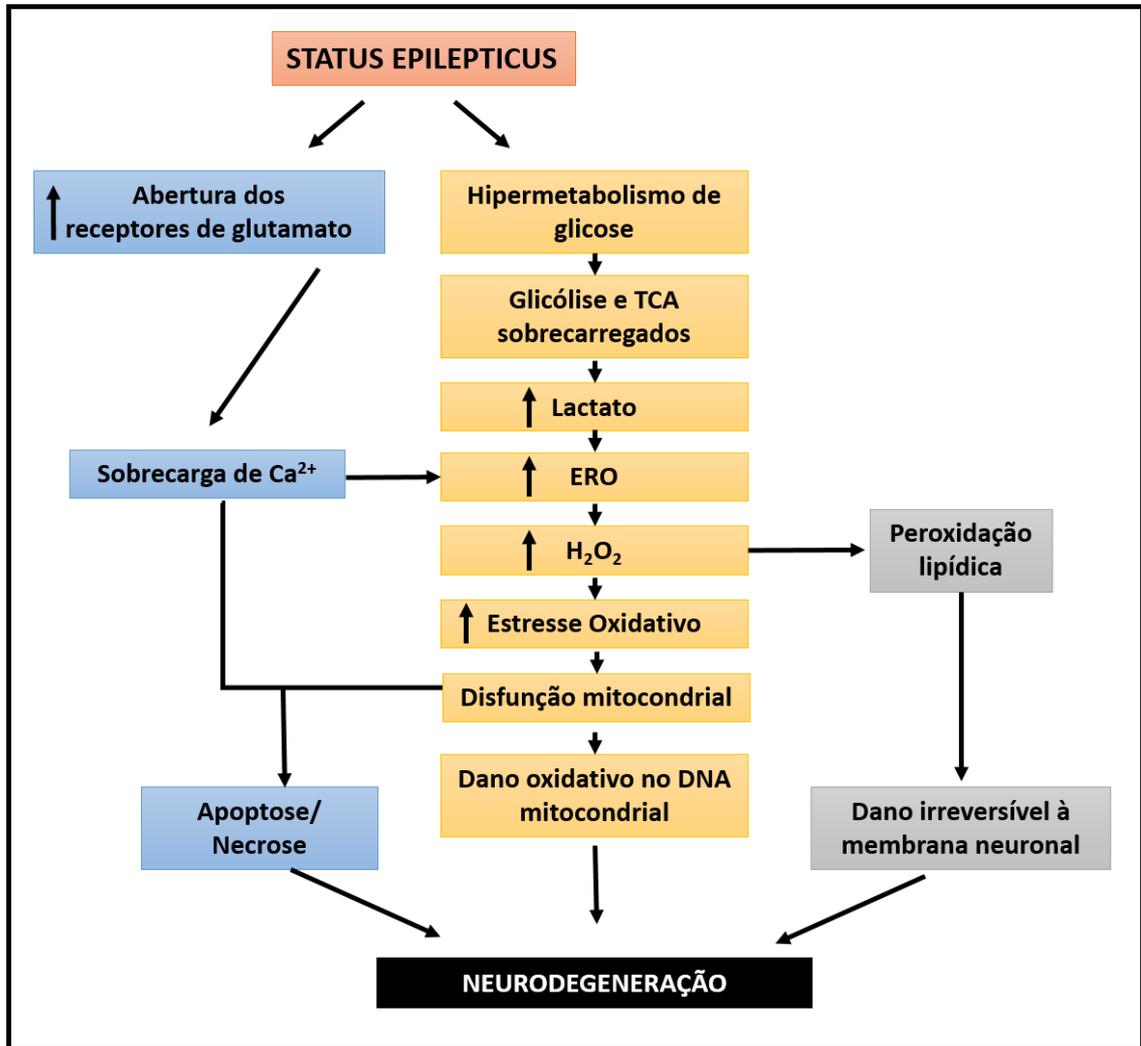
Estresse oxidativo geralmente refere-se a um estado bioquímico em que a produção de ERO e ERN está desregulada, resultando em danos na membrana plasmática, proteínas, enzimas, componentes do DNA dentro do núcleo e da mitocôndria (CARDENAS-RODRIGUEZ et al., 2013).

A disfunção mitocondrial e o estresse oxidativo têm sido reconhecidos como mecanismos chaves em inúmeras desordens neurológicas. O estresse oxidativo é manifestado como consequência de um primeiro insulto epileptogênico, podendo tornar-se posteriormente

a causa da epileptogênese (PATEL, 2004). Um tipo de insulto pode ser o SE que é capaz de aumentar o tráfego de receptores glutamatérgicos (NMDA, AMPA e metabotrópicos) para a membrana pós-sináptica o que desencadeia um rápido influxo e sobrecarga de cálcio. Como resultado disto, várias enzimas dependentes de cálcio são ativadas descontroladamente, o que promove a ativação de várias vias de sinalização que causa o inchamento mitocondrial, diminuição do nível de ATP e aumento de ERO, desencadeando a oxidação de proteína, lípidio e DNA, que leva a morte neuronal. Durante este processo observa-se também um aumento significativo na captação e metabolismo de glicose neuronal. Em consequência, o fluxo sanguíneo cerebral aumenta com o objetivo de lidar com o hipermetabolismo de glicose, resultando no acúmulo de lactato, assim sobrecarregando a glicólise normal e o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA). Esses fatores aumentam ainda mais a taxa de ERO/ERN durante o SE. A alta produção de lactato pode causar acidose láctica cerebral, produzindo ERO e causando mais danos devido à disfunção mitocondrial. O excesso de cálcio e ERO leva ao colapso do potencial de membrana mitocondrial e à ativação de enzimas da matriz mitocondrial, diminuindo a produção de ATP (GRAAF et al., 2004; PATEL et al., 2004).

As CREs também podem resultar em produção excessiva de superóxido mitocondriais em modelos de roedores (LIANG; HO; PATEL, 2000). Estes eventos em conjunto aumentam a excitabilidade neuronal e diminuem o limiar de crises. Todas as mudanças citadas induzirão o rearranjo dos circuitos neurais, perda neuronal e neurogênese, migração anormal de neuroblastos que pode contribuir para o aumento da hiperexcitabilidade e o início das CREs, como apresentado na figura 4 (PUTTACHARY et al., 2015).

FIGURA 4. Via pós-SE em neurodegeneração



Adaptado de PUTTACHARY et al., 2015. ERO, espécie reativa de oxigênio; TCA, ácido tricarbóxico

2.7 Neurodegeneração e hipocampo

Considerando que durante o SE populações neuronais se encontram em um estado de hiperexcitabilidade, o que resulta em grande influxo de cálcio na membrana pré-sináptica, os neurônios entram em processo de degeneração por excitotoxicidade (CASTRO et al., 2011). Em particular, o hipocampo apresenta degeneração seletiva de interneurônios presente no hilus e em neurônios piramidais das regiões CA1 e CA3 (MOHAPEL; EKDAHL; LINDVALL, 2004; RAO et al., 2006). Em contrapartida, a área CA2 apresenta-se mais resistente ao processo de neurodegeneração pela presença de uma quantidade significativa de proteínas ligantes de cálcio.

2.8 Metabolismo no Sistema Nervoso Central

Embora o cérebro represente apenas 2% da massa corporal, o mesmo recebe 15% do débito cardíaco, 20% do consumo de oxigênio e 25% do fornecimento de glicose (SOKOLOFF, 1981). A glicose é transportada através da barreira hematoencefálica em direção ao líquido cerebrospinal por meio de transportadores de glicose (SIESJÖ, 1978).

A glicose que sai dos capilares é principalmente transportada para dentro dos astrócitos que estão próximos à barreira e ao redor da população neuronal, onde é metabolizada pela glicólise, sendo regulada durante a atividade neuronal (TSACOPOULOS E MAGISTRETTI, 1996). O lactato gerado durante a glicólise é liberado dessas células da glia e pode ser transportado para dentro dos neurônios e metabolizado por fosforilação oxidativa, servindo como fonte de energia. Além dessa via, a glicose do interstício também pode ser diretamente transportada para o interior dos neurônios (POPPE et al., 1997).

Quando a glicose entra nos neurônios ocorre o fornecimento de uma grande quantidade de energia (ATP) por meio da fosforilação oxidativa promovida pela mitocôndria. O ATP é a fonte de energia necessária para o funcionamento celular que inclui a manutenção da bomba de sódio/potássio, de diversos canais iônicos expressos na membrana celular e, conseqüentemente, do potencial de membrana em repouso (BADAWY; HARVEY; MACDONELL, 2009). Quando o suprimento de glicose aos neurônios é prejudicado, logo o papel funcional deles pode ser comprometido. A hipoglicemia e a falha no fornecimento de glicose aos neurônios (especialmente no cérebro em desenvolvimento) podem afetar significativamente a função e o desenvolvimento do cérebro, conseqüentemente, predispor convulsões (VANNUCCI et al., 1994)

As crises induzidas por hipoglicemia são observadas em crianças com uma variedade de doenças metabólicas hereditárias, como doenças de armazenamento de glicogênio e intolerância hereditária à frutose (KLEPPER; VOIT, 2002; BADAWY; HARVEY; MACDONELL, 2009). Em certas condições, como jejum prolongado, que envolve a diminuição de glicose para o cérebro, os níveis plasmáticos dos corpos cetônicos (acetoacetato e D-3-hidroxiacetato) aumentam significativamente e pode ser utilizado pelos neurônios como substratos metabólicos (OWEN et al., 1967). A capacidade do cérebro de aumentar a sua dependência por corpos cetônicos parece ser uma forma de adaptação metabólica cerebral.

2.8.1 Transportadores de Glicose

A glicose atravessa a membrana da célula por um sistema de transporte específico, que inclui dois tipos de transportadores de glicose: 1) os transportadores de glicose por difusão facilitada (GLUTs) que transporta glicose a favor do seu gradiente de concentração e 2) os cotransportadores de Na⁺/glicose (SGLTs, *sodium-glucose cotransporters*) que transportam glicose a favor do gradiente de concentração do Na⁺ (SABINO-SILVA et al., 2010).

2.8.1.1 GLUTs

O GLUT1 é expresso nas membranas basal e luminal de células endoteliais da barreira hematoencefálica (BHE) (POPPE et al., 1997), como também em astrócitos e corpos celulares de neurônios, porém não foi descrito em micróglia. Enquanto que o GLUT3 é expresso em axônios e dendritos de neurônios. Este transportador de glicose é o mais abundante no cérebro, exercendo uma capacidade de transporte cinco vezes maior que a do GLUT1. A sua densidade e distribuição correlacionam-se bem com as exigências locais de glicose cerebral (POPPE et al., 1997; JURCOVICOVA, 2014).

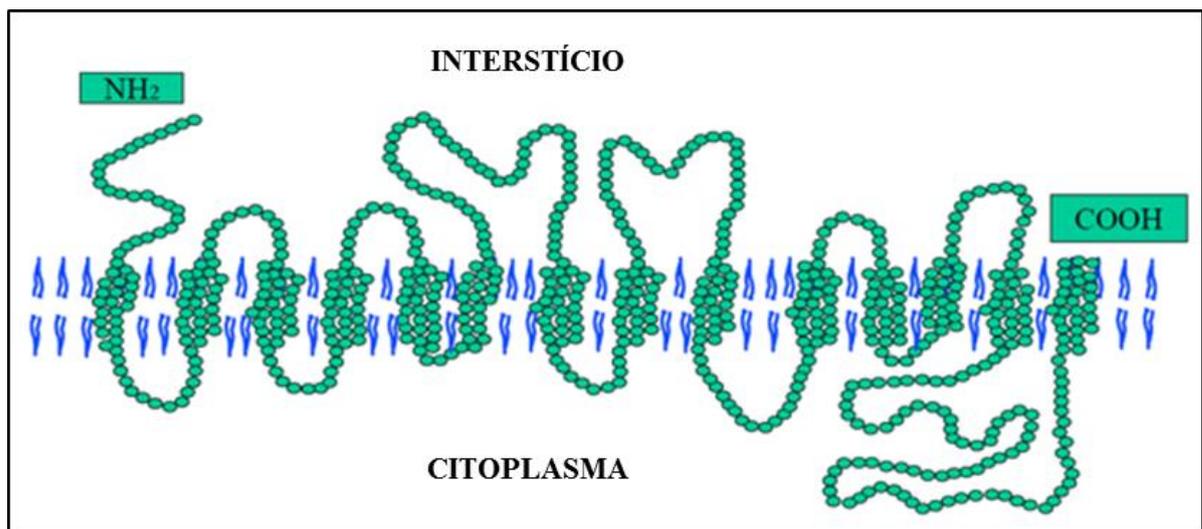
Já foi descrito na literatura outros tipos de GLUTs no cérebro. A proteína GLUT2 está presente em neurônios hipotalâmicos e serve como um sensor de glicose na regulação da ingestão alimentar, além disso, em neurônios do hipocampo, supostamente regula a atividade sináptica e a liberação de neurotransmissores. O GLUT5 foi descrito apenas em micróglia como transportador de hexose e sua regulação ainda é pouco conhecida. O GLUT4 e GLUT8 são transportadores de glicose regulados por insulina e esses transportadores são expressos em corpos celulares de neurônios do córtex e do cerebelo, mas principalmente no hipocampo e na amígdala, onde são mantidas as funções cognitivas do hipocampo (JURCOVICOVA, 2014).

2.8.1.2 SGLTs

Os cotransportadores Na⁺/glicose (SGLTs) são proteínas transmembrânicas que contribuem na homeostase celular ao realizar o transporte ativo secundário de glicose a favor do gradiente eletroquímico dos íons sódio. Essas proteínas foram inicialmente identificadas na membrana borda em escova dos enterócitos e nas células do túbulo proximal dos rins (WRIGHT; LOO; HIRAYAMA, 2011).

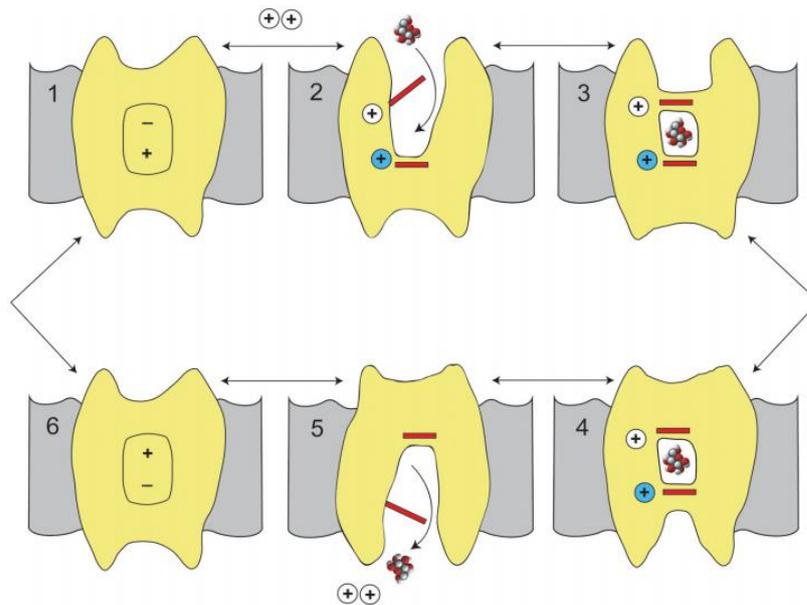
O SGLT1 é codificado pelo gene *SLC5A1*, sendo composto por 14 segmentos transmembranares, cuja a face N-terminal é voltada para o interstício e a face C-terminal ancorada no interior da membrana plasmática, como demonstrado na figura 5 (WRIGHT; TURK, 2004). O SGLT1 é responsável por transportar uma molécula de glicose a favor do influxo de dois íons sódio, juntamente com 264 moléculas de H₂O em cada ciclo (ZEUTHEN, 2000; WRIGHT; LOO; HIRAYAMA, 2011). Os íons sódios ligam-se inicialmente no lado extracelular do SGLT1 (2), promovendo uma mudança conformacional que permite que a glicose acople-se ao sítio de ligação (3). Isto é seguido por uma nova mudança conformacional da proteína (3, 4) que permite a liberação dos íons sódios e da glicose no meio intracelular (5). O ciclo é completado após o transporte (6), permitindo o retorno da conformação proteica inicial (1) (WRIGHT; LOO; HIRAYAMA, 2011). A cinética da proteína SGLT1 pode ser visualizada na figura 6.

FIGURA 5. Estrutura secundária do cotransportador SGLT1



Adaptado de WRIGHT; TURK, 2004.

FIGURA 6. Esquema do transporte de sódio e glicose através do SGLT



WRIGHT; LOO; HIRAYAMA, 2011.

O SGLT1 é principalmente expresso no intestino, mas também está presente nos rins, glândulas salivares, traqueia, músculo esquelético, coração, fígado, testículo, próstata e no cérebro (TAKATA et al., 1992; POPPE et al., 1997; BALEN et al., 2008; WRIGHT; LOO; HIRAYAMA, 2011).

Nos últimos anos, a análise da expressão do SGLT1 no sistema nervoso central tem sido bem acentuada. YU et al. (2013), através de imunofluorescência, mostraram a presença do SGLT1 em neurônios do hipocampo (nas regiões do giro dentado, CA1 e CA3), córtex frontal, parietal, putâmen, núcleo paraventricular do hipotálamo, amígdala e cerebelo (células de Purkinje).

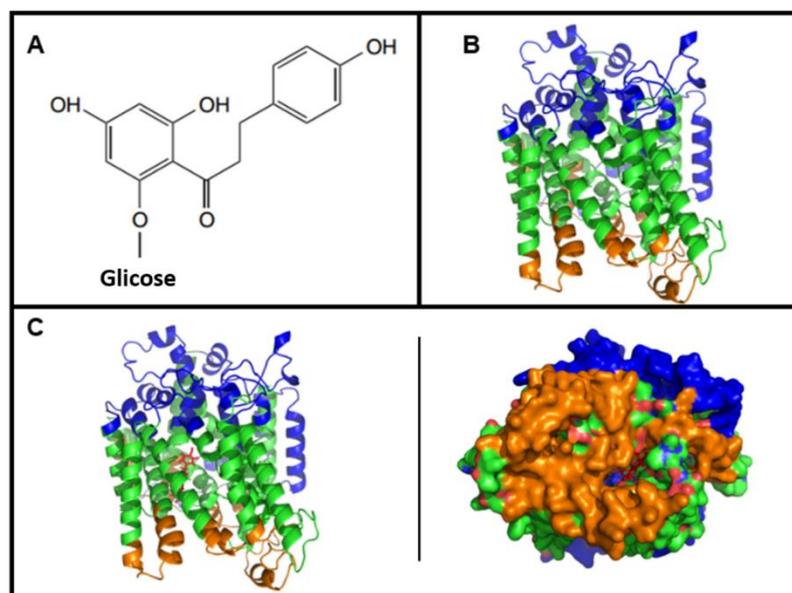
A isoforma SGLT2 é codificada pelo gene *SLC5A2* e realiza o transporte de apenas um íon Na^+ para cada molécula de glicose (ZHAO; KEATING, 2007). O SGLT2 tem sido observado no hipocampo e cerebelo. Os ensaios funcionais com fatias de cérebro de rato sugere que o SGLT2 é responsável por captar 20% do total metil-4-[F-18]fluoro-4-desoxi-D-glucopiranosídeo (Me-4FDG), um substrato de SGLT altamente específico e não transportado por GLUTs (YU et al., 2010).

2.8.1.3 Florizina

A florizina é um produto natural isolado da casca da macieira. Nos últimos 150 anos tem sido utilizada como um produto farmacêutico e uma ferramenta em diversas pesquisas fisiológicas. A florizina faz parte da família dos dihidrocalcones, cuja a sua estrutura química (Figura 7) corresponde a uma molécula de glicose e dois anéis aromáticos ligados por um radical alquila. A ação farmacológica principal da florizina é produzir glicosúria renal e bloquear a absorção intestinal de glicose através da inibição dos cotransportadores de sódio-glicose, localizado no túbulo proximal renal e na mucosa do intestino delgado. Logo, esta substância é capaz de inibir inespecificamente a atividade de SGLTs, sem afetar os transportadores de glicose por difusão facilitada (EHRENKRANZ et al., 2005).

A florizina apresenta duas vezes mais afinidade ao SGLT1 quando comparado ao SGLT2 (PANAYOTOVA-HEIERMANN; LOO; WRIGHT, 1995). Além disso, já foi visto o efeito da florizina em um cérebro pós-isquêmico (YAMAZAKI; HARADA; TOKUYAMA, 2012; HARADA et al., 2013). Estes autores mostraram que a florizina é capaz de suprimir os danos neuronais isquêmicos, o que sugere que a exacerbação do dano neuronal isquêmico é mediado pela família de SGLT cerebral. A figura 7 representa a interação da florizina com SGLT.

FIGURA 7. Estrutura química da florizina e estrutura conformacional do sítio de ligação entre a florizina e o SGLT, *in silico*, em 3D



A. Estrutura química da florizina, adaptado de EHRENKRANZ et al., 2005. **B e C.** Descrição: em vermelho: florizina; em azul, verde e laranja: *loops* extracelulares, transmembranares e citoplasmáticos do SGLT1, respectivamente. Fonte: Ulisses Pádua, Laboratório de Nanobiotecnologia, UFU.

2.8.1.4 SGLT e estresse metabólico

Em condições de normoglicemia e perfusão adequada de oxigênio, o transporte de glicose provavelmente é mediado pelo GLUT3 e a difusão facilitada de glicose pode ser o suficiente para o suprimento de energia dos neurônios. No entanto, a realidade pode ser diferente quando o suprimento de energia é reduzido ou o consumo de energia é aumentado em situações patológicas como isquemia, hipoxemia, hipoglicemia ou crises epiléticas (POPPE et al., 1997). Diante dessas condições o estoque de glicogênio nas células da glia pode se esgotar e a concentração de lactato no interstício pode ser reduzida (POPPE et al., 1997). A concentração de glicose no microambiente de disparo dos neurônios pode diminuir muito, sendo inferior ao valor de K_m do GLUT3.

Durante o período do foco epilético, quando a concentração de glicose no interstício ao redor dos neurônios é inferior ao valor de K_m do GLUT3, ocorre uma maior captação de glicose. Poppe et al. (1997) induziram um foco epilético a partir da administração de penicilina no córtex frontal de rato e identificaram um aumento da captação de glicose via SGLTs, refletindo a alta regulação desta proteína nos neurônios.

O presente trabalho sugere que os SGLTs contribuem na proteção dos neurônios contra a degeneração, o que poderia se tornar essencial para sobrevivência da célula em condições de baixa concentração de glicose, anóxia, isquemia cerebral e acidente vascular cerebral (YU et al., 2013). Apesar desses avanços, os dados presentes na literatura não são suficientes para explicar o papel de SGLTs durante o SE, bem como na epileptogênese.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar o efeito da inibição de cotransportadores de sódio/glicose (SGLTs) no SE, bem como no processo de neurodegeneração durante a epileptogênese em modelo de epilepsia do lobo temporal (ELT).

3.2 Específicos

Utilizando animais na presença ou ausência de SE tratados com salina ou florizina, propomos os seguintes objetivos específicos:

1. Avaliar a quantidade de *wet dog shake* antes e durante o SE;
2. Avaliar a gravidade do SE, a quantidade e a duração das crises, bem como a evolução das crises durante o SE, de acordo com a escala de Racine (1972);
3. Avaliar o padrão de neurodegeneração (processos necróticos pela histoquímica de FJ) em regiões hipocampais 24h e 15 dias após SE;

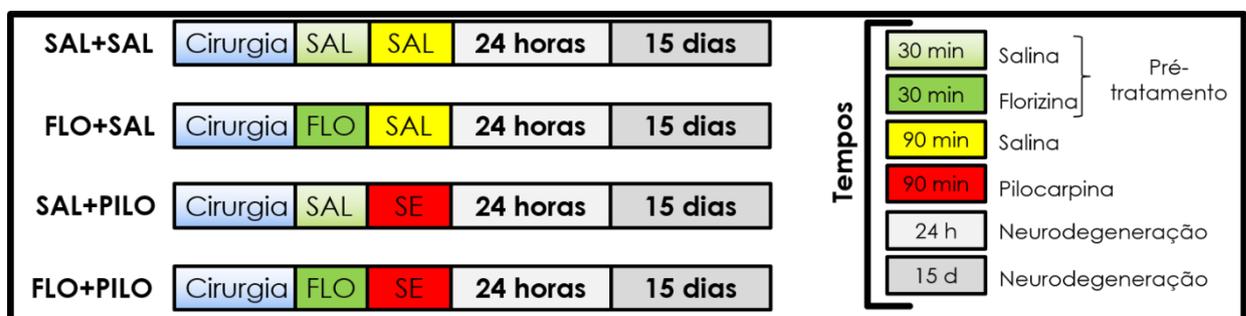
4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

No presente estudo foram utilizados ratos Wistar, entre 60-90 dias de idade [240- 350g (n=63)], obtidos junto ao Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas (UFAL). O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFAL (10/2014; Anexo 1). Os animais foram acondicionados no Biotério do Laboratório de Neurofarmacologia e Fisiologia Integrativa do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (UFAL), nas seguintes condições: a) 12/12 horas de claro/escuro, luzes acesas às 6:00hs; b) temperatura ambiente \pm 23°C; e c) oferta plena de água e ração. Foram utilizados os seguintes grupos experimentais (Figura 8):

- **Salina + Salina (SAL + SAL)**: receberam o pré-tratamento e a administração de salina por meio de microinjeções hipocâmpais (N=6 para neurodegeneração 24h após SE; n=6 para neurodegeneração 15 dias após SE);
- **Florizina + Salina (FLO + SAL)**: receberam o pré-tratamento de florizina e a administração de salina por meio de microinjeções hipocâmpais (N=6 para neurodegeneração 24h após SE; n=6 para neurodegeneração 15 dias após SE);
- **Salina + Pilocarpina (SAL + PILO)**: receberam o pré-tratamento de salina e a administração de pilocarpina por meio de microinjeções hipocâmpais (N=9 para neurodegeneração 24h após SE; n=8 para neurodegeneração 15 dias após SE);
- **Florizina + Pilocarpina (FLO + PILO)**: receberam o pré-tratamento de florizina e a administração de pilocarpina por meio de microinjeções hipocâmpais (N=11 para neurodegeneração 24h após SE; n=11 para neurodegeneração 15 dias após SE).

FIGURA 8. Delineamento experimental



4.2 Cirurgia

Os animais foram anestesiados com tiopental sódico (60 mg/kg, intraperitoneal). Além disso, receberam 0,1 mL/100g de pentabiótico veterinário (Fort Dodge) subcutâneo antes do início da cirurgia e foram tricotomizados na cabeça. Após a fixação no estereotáxico, os animais receberam anestésico local (xilocaína com epinefrina, subcutâneo; Astra). Os animais foram submetidos a cirurgias estereotáxicas para implantação de uma cânula no hilus do giro dentado do hipocampo esquerdo, seguindo coordenadas pré-determinadas (PAXINOS; WATSON, 1996): 6,30 mm antero-posterior (em relação ao bregma); 4,50 mm medio-lateral (em relação ao seio sagital) e - 4,50 mm dorso-ventral (em relação à dura-máter), de acordo com Furtado et al. (2002).

4.3 Microinjeções de Florizina e Pilocarpina

Os animais foram cuidadosamente imobilizados para receber microinjeções de florizina e PILO no hipocampo esquerdo (1 μ L de florizina na concentração de 50 μ g/1 μ L), 30 min antes da administração de PILO no hipocampo (H-PILO). Para isto, utilizou-se uma seringa de 5 μ L (Hamilton – Sigma) acoplada a uma bomba de microinjeção (Harvard Apparatus, 2000) com velocidade de 0,5 μ L/minuto. Logo após, foi microinjetado 1 μ L de PILO (1,2 mg/ μ L). O grupo controle positivo foi injetado apenas com H-PILO. Finalmente, o grupo controle negativo recebeu o mesmo volume de salina (0,9%) intra-hipocampal.

Todos os animais que tiveram SE foram resgatados com diazepam (5 mg/kg; ip), após os 90 minutos de SE terem se estabelecidos. Os animais que não tiveram SE, bem como os grupos controles receberam a injeção de diazepam nas mesmas condições.

4.4 Análise Comportamental

A atividade comportamental dos animais foi registrada por câmera de vídeo (filmadora Digital Full HD Sony DCR-PJ6) em um período de até 3 horas após o início do SE. Durante este período os animais foram alojados em gaiolas de acrílico, o que permite a observação simultânea de até 6 animais.

Foram utilizados índices baseados no comportamento que retratam a gravidade de crises de forma arbitrária, porém crescente (RACINE, 1972). Estes índices foram

paulatinamente adaptados para avaliação de SE (LEITE; GARCIA-CAIRASCO; CAVALHEIRO, 2002; TILELLI et al., 2005).

A análise comportamental foi realizada no momento em que os animais estavam em SE, com o objetivo de estudar as alterações neurofisiológicas da ELTM que justificam as alterações comportamentais. Esta condição se manteve durante um período de 90 minutos, tempo suficiente para observar neurodegeneração (CASTRO et al., 2011). Esses 90 minutos de observação foram divididos em intervalos de 5 minutos, sendo avaliada a crise mais grave em cada quadro de 5 minutos até o término dos 90 minutos, ou seja, foi construída uma tabela com 18 intervalos de 5 minutos. Em um período relativamente pequeno de análise (90 minutos), os animais oscilavam entre um comportamento e outro de acordo com a escala de Racine (1972).

Os animais que oscilaram, por mais de 50% do tempo total de análise, entre os níveis 1-2, 2-3, 3-4, 4-5 e finalmente 5-6, consistiram uma visão geral da distribuição das crises nos grupos estudados. Sendo assim, estes animais foram classificados de acordo com o comportamento que se manteve por mais tempo. Para analisar a gravidade das crises, o nível mais grave de cada janela foi somado e o valor resultante foi dividido pelo número de janelas, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\textit{Gravidade das crises} = \frac{\textit{Soma dos níveis mais graves em cada janela}}{\textit{Quantidade total de janelas}}$$

Além disso, em cada uma das 18 janelas foi feita uma análise minuciosa do tempo e da quantidade dos níveis 2, 3, 4 e 5 da escala de Racine (Tabela 2), com o objetivo de avaliar mais detalhadamente a gravidade das crises. A evolução das crises foi analisada em 9 janelas de 10 minutos e a quantidade total por janela de cada um dos níveis citados foi apresentada.

Tabela 2. Escala de Racine (1972)

Índice	Comportamento (s)
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
6	Várias classes 5 (>3)

4.5 Perfusão, Pós-fixação e congelamento dos cérebros dos animais

Para analisar os perfis de neurodegeneração e neurogênese, respectivamente, após 24 horas ou 15 dias das microinjeções de PILO e florizina, os animais foram perfundidos com 150 mL de tampão fosfato salina (PBS) e, em seguida, 300 mL de paraformaldeído (PFA) 4% em PBS, pH 7,4, para fixar o órgão.

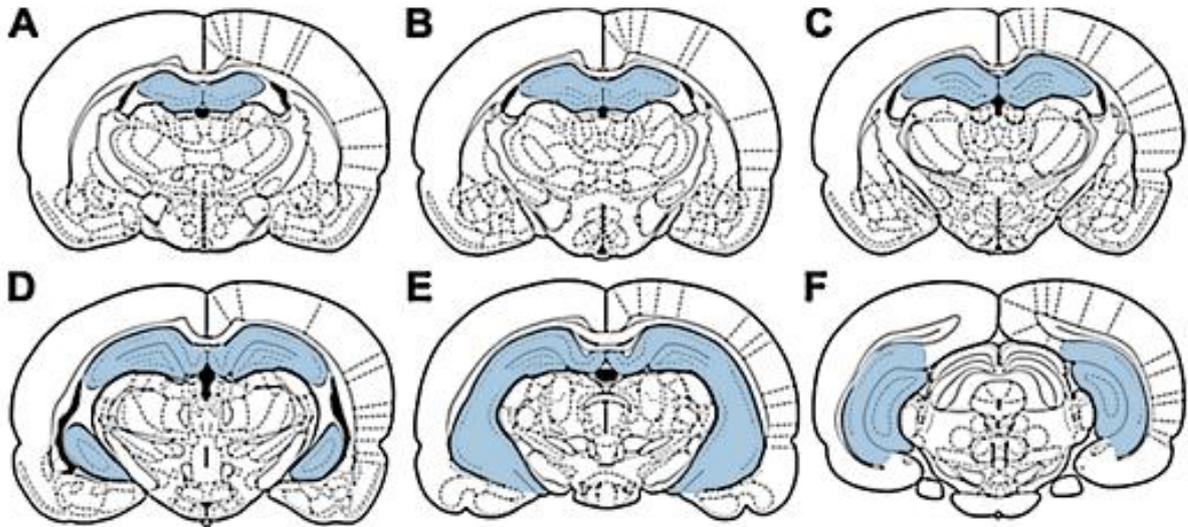
Logo em seguida, os cérebros foram removidos e pós-fixados em PFA 4% durante o intervalo de 2 a 4 horas e, posteriormente, transferidos para solução de sacarose 20% em PBS, para crioproteção. O momento da precipitação dos cérebros na solução de sacarose foi utilizado como critério para decisão do momento do congelamento. Após pelo menos 24 horas, os cérebros foram congelados em -20 °C por 3 horas e, logo em seguida, foram transferidos para -80 °C.

4.6 Cortes dos cérebros

Os cérebros foram cortados em secções de 30 µm em criostato (Leica CM 1850) com temperatura variando entre -18 a -22 °C. Os cortes foram postos em lâminas gelatinizadas (solução para gelatinização: gelatina 0,5% e sulfato de cromo-alumínio 0,05%), cada qual com seis áreas cerebrais espaçadas de 1 mm em 24 jogos consecutivos adjacentes. Todas as placas foram armazenadas em *freezer* a -20 °C.

As secções coronais foram feitas seguindo os níveis apresentados na figura 9, tendo como referência o bregma de acordo com o atlas estereotáxico de Paxinos e Watson (1996). Os seis cortes por nível representam a extensão anteroposterior do hipocampo.

FIGURA 9. Diferentes secções do hipocampo



Extensão anteroposterior do hipocampo (A-F; área em azul) representada como sequência de lâminas do atlas de Paxinos e Watson (1996). Tomado de Castro et al 2012.

4.7 Histologia convencional

As lâminas histológicas com os cortes de cérebros foram coradas com hematoxilina e eosina, a fim de observar se a cânula foi inserida exatamente no hilus do GD. As lâminas histológicas foram analisadas e fotografadas através de um microscópio óptico (Olympus BX41).

4.8 Histoquímica de Fluoro-jade C

Para análise da neurodegeneração, outras lâminas histológicas com os cortes foram submetidas a banhos sucessivos de etanol absoluto durante 3 minutos, etanol 70% por 1 minuto, água destilada (dH₂O) por mais 1 minuto, permanganato de potássio (0,06%) durante 15 minutos com agitação branda, 3 lavagens em dH₂O por 1 minuto, 1 banho com Fluoro-Jade (0,0001%) (preparado e utilizado no mesmo dia) por 30 minutos com agitação branda, 3 lavagens em dH₂O por 1 minuto, secagem das lâminas. Posteriormente, foi utilizado como meio de montagem fluoromonte e ácido acético (3:1), sendo posto em cada lâmina 150 µL dessa solução; em seguida, a lamínula foi posta sobre a lâmina (SCHMUED et al., 1997). Os cortes foram analisados e as imagens capturadas através de um microscópio de fluorescência (Nikon DS RI1).

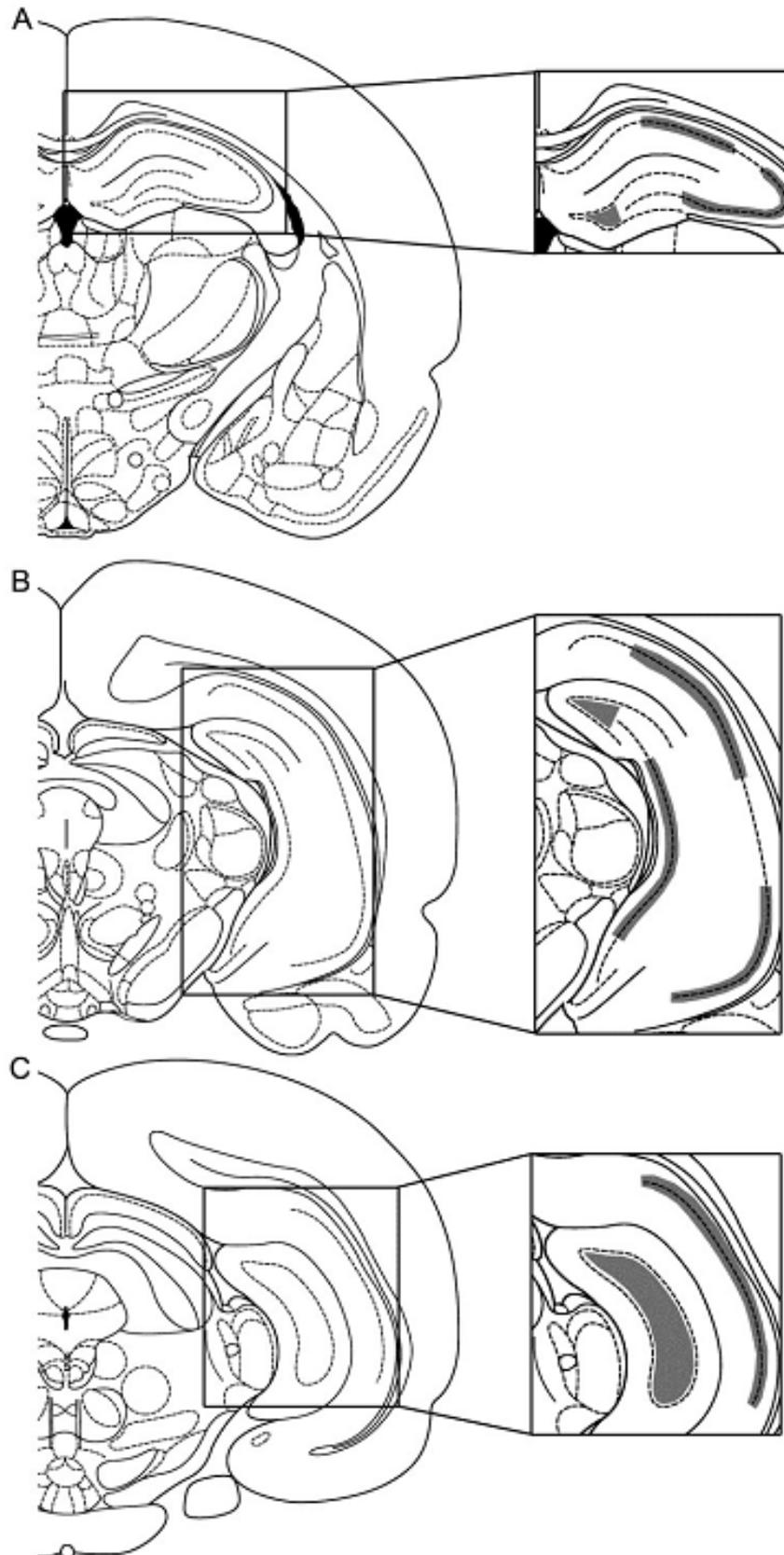
4.9 Contagem de células

Em H-PILO foi determinado o número de células em três regiões hipocâmpais: CA1, CA3 e hilus do GD. Essas regiões foram selecionadas devido à alta sensibilidade ao processo neurodegenerativo. De acordo com Paxinos e Watson 1996, para quantificação da neurodegeneração foram feitas amostras de até 10 áreas em três diferentes coordenadas do hipocampo, desde hipocampo ventral até hipocampo dorsal (AP -2,56mm, AP -3,30mm e AP -6,30mm). Os locais selecionados estão representados na figura 10.

A contagem foi realizada através do programa *Image J* (NIH, freeware), sendo utilizado o *plugin cell counter* que permite contar automática ou manualmente células em um determinado campo. Neste caso específico foi utilizado o método manual de contagem (Figura 11).

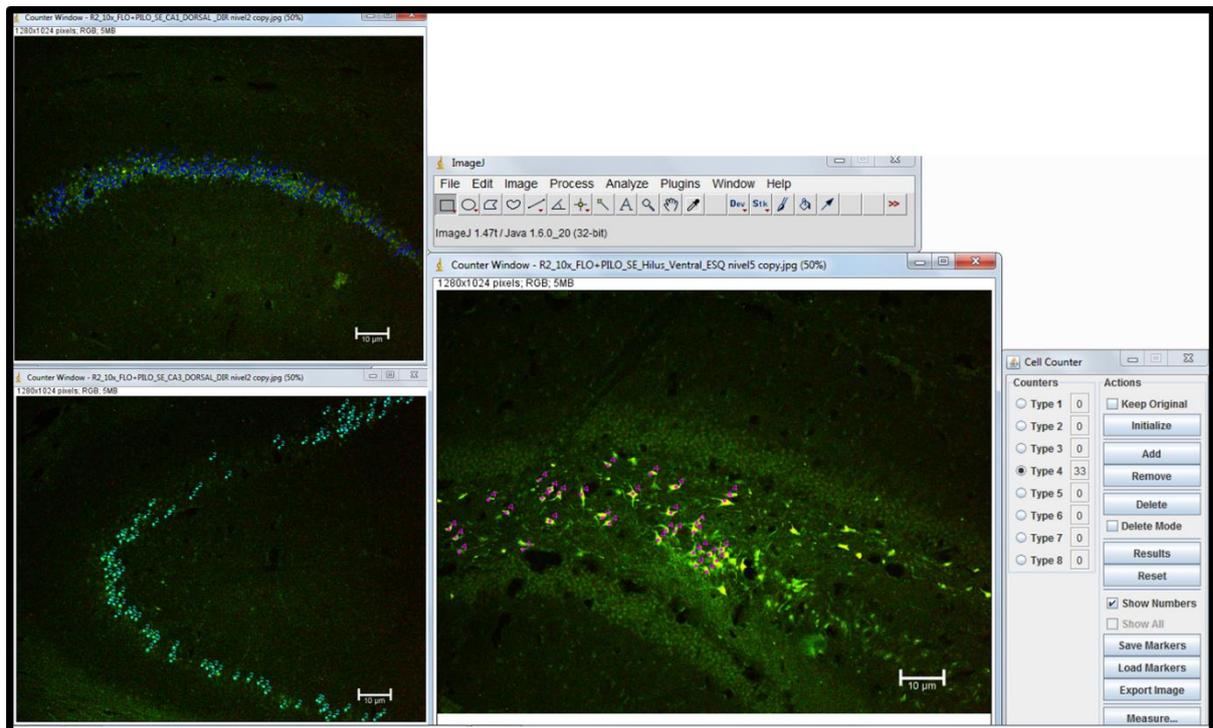
Todas as células foram contadas no hipocampo contralateral porque os animais microinjetados com PILO desenvolvem uma cicatriz ao redor do sítio de microinjeção. Essas cicatrizes são causadas por lesões mecânicas oriundas da introdução da cânula e a ação local da PILO. A gravidade dessas lesões está reduzida nos animais controle, pois ali só foi observada a injúria mecânica provocada pela cânula.

FIGURA 10. Representação de regiões amostrais para contagem de células FJ+



Sequência de imagens ilustrando a metodologia usada para estimar células marcadas com FJ. Os esquemas correspondem a pranchas do atlas estereotático de Paxinos e Watson (1996). Tomado de Castro et al. (2011)

FIGURA 11. Representação da contagem de neurônios FJ+



Regiões CA1 (pontos azuis), CA3 (pontos verdes) e hilus do giro denteado (pontos rosas) do hipocampo através do programa ImageJ.

4.10 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Estes foram comparados por meio de análise de variância (ANOVA) de uma via para dados independentes, utilizando-se o pós-teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls. Em caso de comparação de apenas dois grupos, foi utilizado o *test t* não pareado. Essas análises foram feitas com o auxílio do programa computacional *GraphPad Prism*[®], v. 5,02 (GraphPad, USA). O nível de significância estabelecido foi de 5% (valor descrito de $P < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Análise comportamental

5.1.1 Avaliação geral das crises

Os animais do grupo SAL+SAL e FLO+SAL, que receberam microinjeções de salina (0,9%, 1 μ L) ao invés de PILO e naturalmente não tiveram SE, logo não foi feita análise comportamental.

No grupo SAL+PILO, 18 dos 25 (72%) animais que receberam as microinjeções de PILO tiveram SE e 94% sobreviveram. Dentre os 17 animais sobreviventes que tiveram SE, 12% apresentaram níveis 2-3, 12% níveis 3-4, 47% níveis 4-5, 29% níveis E. Enquanto no grupo FLO+PILO, 23 dos 30 (77%) animais que receberam as microinjeções de pilocarpina tiveram SE e 96% sobreviveram. Dentre os 22 animais sobreviventes que tiveram SE, 14% exibiram níveis 2-3, 4% níveis 3-4, 55% níveis 4-5, 27% níveis 5-6.

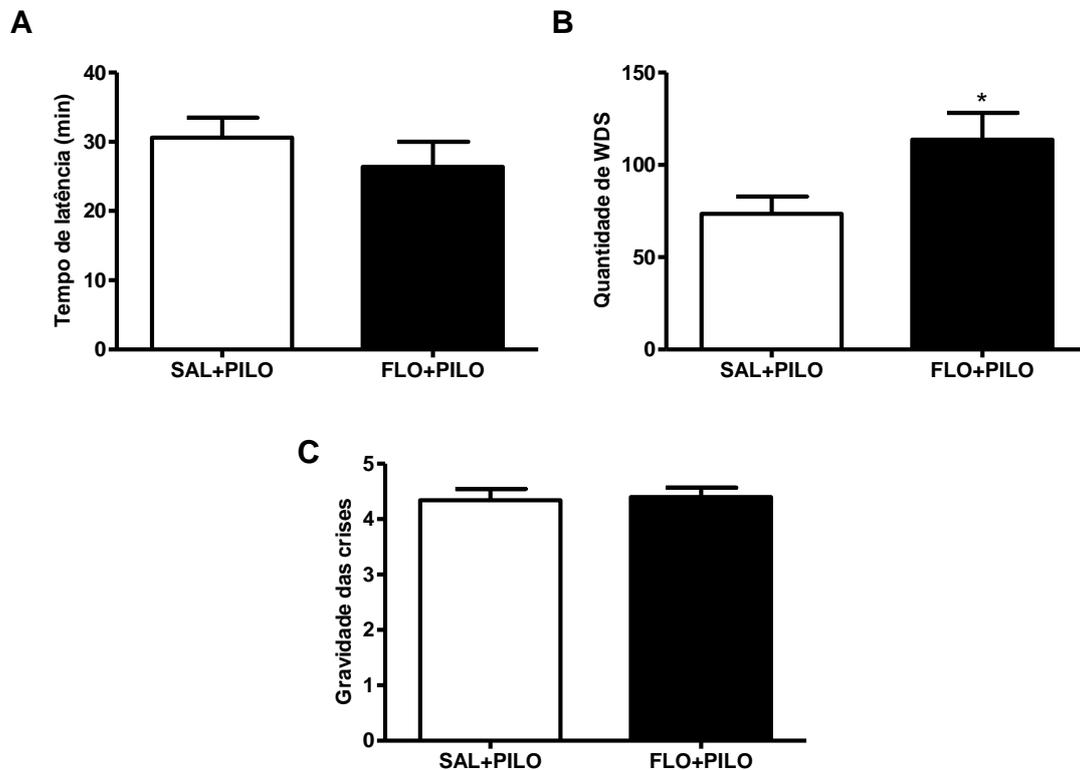
5.1.2 Avaliação do tempo de latência, Wet Dog Shake e gravidade das crises

Após o insulto epileptogênico gerado pela microinjeção de PILO, os animais permaneceram em um intervalo de tempo, chamado de latência, sem apresentar crises límbicas. Em relação ao período de latência, quando comparados os grupos SAL+PILO (30,62 \pm 2,87) e FLO+PILO (26,40 \pm 3,63), nenhuma diferença significativa foi encontrada (Figura 12A).

Durante o período de latência, os animais passam a apresentar WDS. Quando avaliado o WDS durante a latência e o SE (Figura 12B), foi possível constatar que o grupo FLO+PILO (113,7 \pm 14,55) exibiu aumento ($p < 0.05$) na quantidade de WDS quando comparado ao SAL+PILO (73,47 \pm 9,37).

Em que concerne a gravidade das crises, que foi calculada a partir da média das crises mais graves em todos os 18 intervalos de 5 minutos, não ocorreu nenhuma diferença entre os grupos experimentais analisados (Figura 12C).

FIGURA 12. Tempo de latência, quantidade de WDS e gravidade das crises límbicas



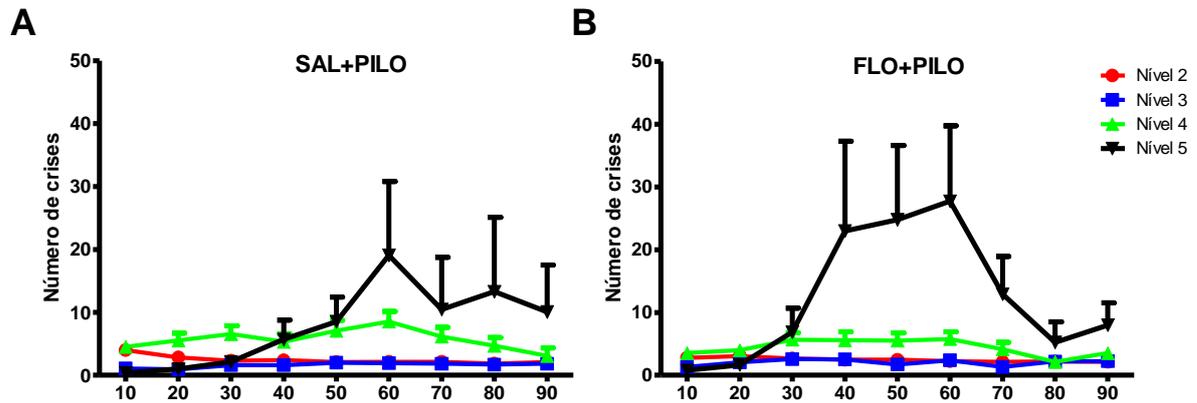
Tempo de latência após a microinjeção de PILO (A). Quantidade de WDS após a microinjeção de pilocarpina, durante a latência e o SE (B). Gravidade das crises límbicas durante o SE (C). SAL+PILO, salina + pilocarpina; FLO+PILO, florizina + pilocarpina. *Teste t*, não-pareado, $p < 0,05$.

5.1.3 Avaliação da evolução das crises

Diante disso, ainda com o propósito de avaliar de forma mais sistemática diferenças quanto a gravidade entre os grupos SAL+PILO e FLO+PILO, foi feita uma análise de prevalência em todas as classes da escala de Racine (1972), os quais foram analisados juntos em cada grupo, a fim de observar a evolução individual das crises. Vale ressaltar que a imobilidade (nível 0) e o automatismo (nível 1) não foram analisados, pelo fato de que o primeiro não predominava durante os 90 minutos de SE e o segundo não garantia uma acuidade visual adequada, a fim de que o mesmo fosse avaliado durante a gravação. Por isso, aprovou-se fazer a análise a partir do nível 2.

Ao analisar todos os níveis da escala de Racine (1972) juntos, foi determinado como as crises límbicas evoluem ao longo do SE (Figura 13A e B).

FIGURA 13. Evolução de todos os níveis ao longo do SE no grupo SAL+PILO e FLO+PILO

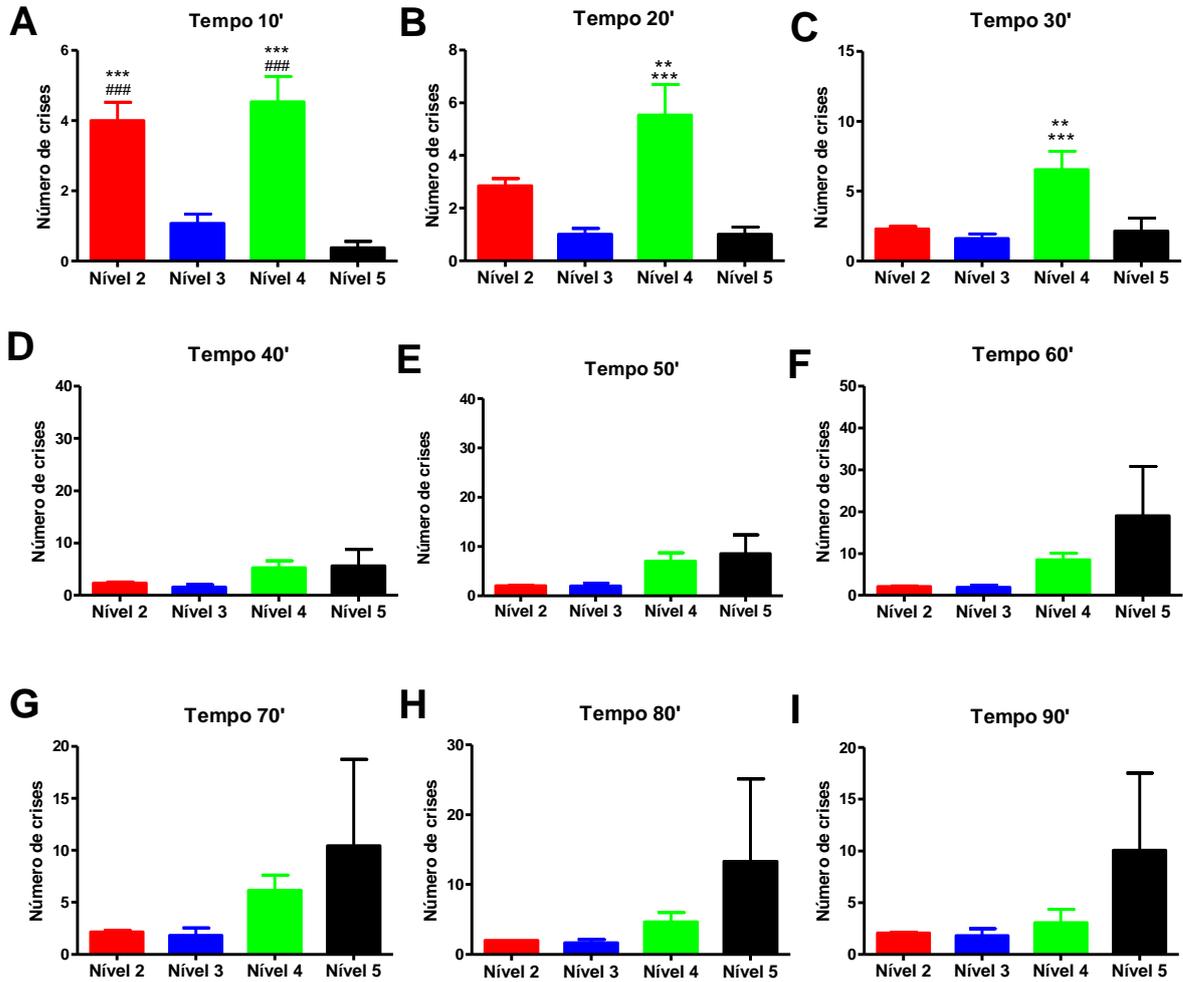


Quantidade de todos os níveis da escala de Racine por janela (10 minutos) do grupo SAL+PILO (A) e FLO+PILO (B). SAL+PILO, salina + pilocarpina; FLO+PILO, florizina + pilocarpina.

Em SAL+PILO (Figura 14), é possível observar que no tempo 10 a quantidade dos níveis 2 e 4 é superior aos níveis 3 e 5. Porém, no tempo 20 e 30, a quantidade do nível 2 diminui, sendo o nível 4 superior a todos os níveis apresentados. Do tempo 40 ao 80, o nível 4 mantém-se acima dos níveis 2 e 3, diminuindo apenas no último tempo (Figura 14E e 14N). Em relação ao nível 5, não teve diferença significativa.

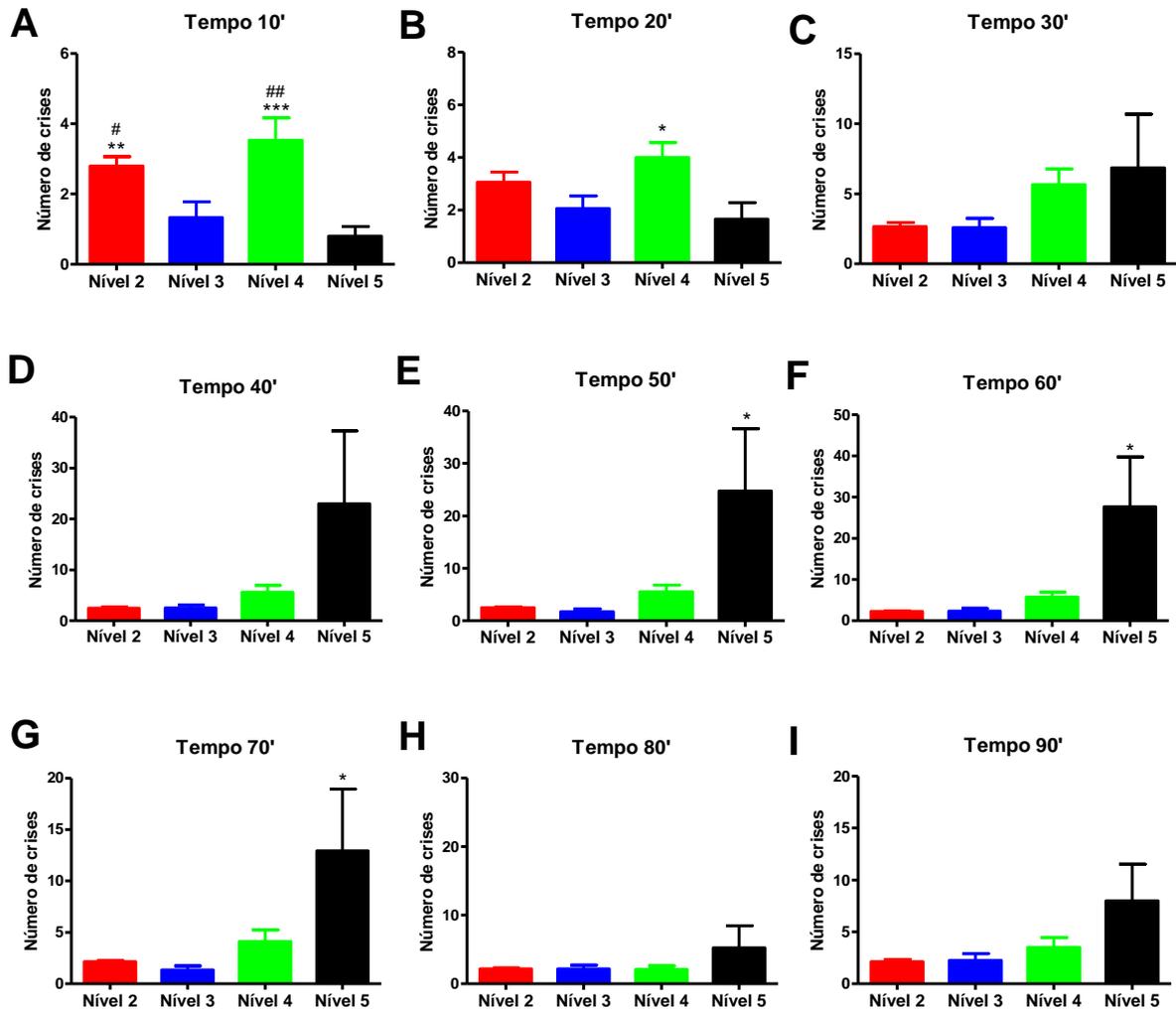
Em FLO+PILO (Figura 15), observa-se no tempo 10 que os níveis 2 e 4 tem uma quantidade maior que os níveis 3 e 5, assim como em SAL+PILO. Posteriormente, no tempo 30, o nível 2 diminui e o nível 4 persiste sendo superior aos níveis 2 e 3 até o tempo 70, diminuindo apenas no tempo 80 (Figura 15F e 15M). Enquanto o nível 4 mantém-se elevado nestes tempos, o nível 5 torna-se significativamente maior que todos os outros níveis, do tempo 50 ao 70. Logo, esses dados podem ser um indicativo de aumento da gravidade das crises neste grupo.

FIGURA 14. Evolução dos níveis da escala de Racine durante o SE em SAL+PILO



Quantidade de todos os níveis da escala de Racine por janela (10 minutos) do grupo SAL+PILO. SAL+PILO, salina + pilocarpina. *Teste t*, não-pareado, $p > 0,05$. ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls, $p < 0,05$. (A) *** e ### comparado aos níveis 3 e 5. (B) e (C) *** e ** comparado aos níveis 2, 3 e 5.

FIGURA 15. Evolução dos níveis da escala de Racine durante o SE em FLO+PILO



Quantidade de todos os níveis da escala de Racine por janela (10 minutos) do grupo FLO+PILO. FLO+PILO, florizina + pilocarpina. *Teste t*, não-pareado, $p > 0,05$. ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls, $p < 0,05$. (A) # e ## comparado ao nível 3, ** e *** ao nível 5. (B) * comparado aos níveis 3 e 5. (E), (F) e (G) * comparado aos níveis 2, 3 e 4.

5.1.4 Avaliação de cada nível das crises

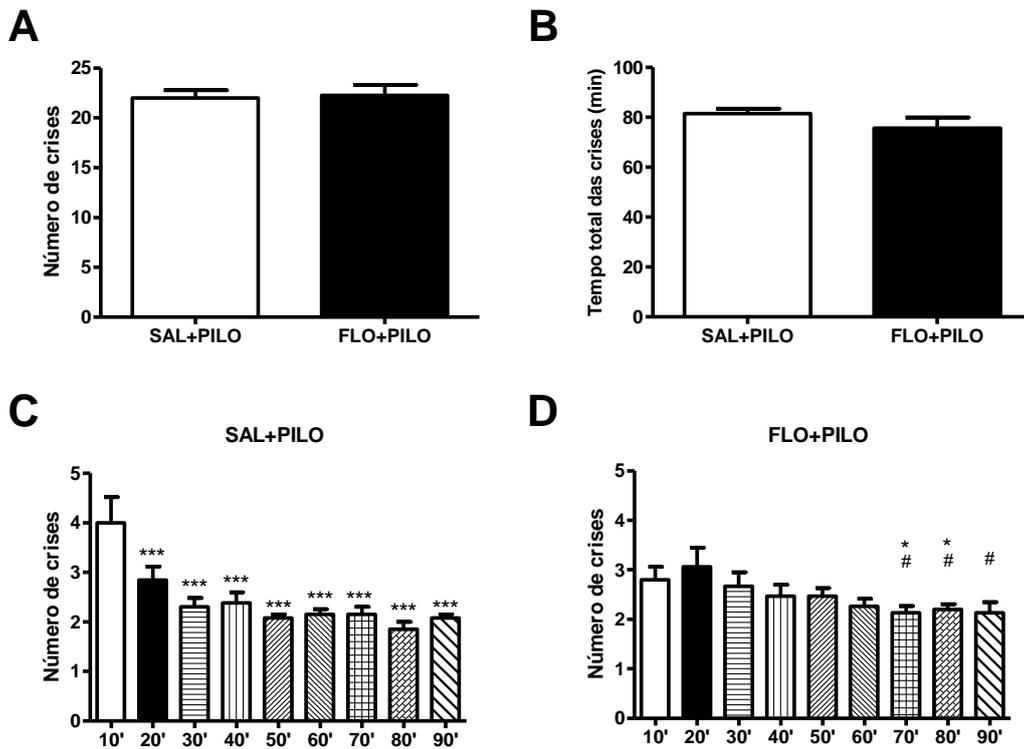
5.1.4.1 Nível 2

No início do SE, a maioria dos animais começa a desenvolver crises límbicas mais brandas, caracterizadas por imobilização (nível 0), automatismo facial (nível 1) e mioclonias de cabeça e pescoço (nível 2). Baseando-se na escala de Racine (1972), foi observado que a quantidade de vezes (SAL+PILO, $22,00 \pm 0,77$; FLO+PILO, $22,27 \pm 1,04$) e o tempo total (SAL+PILO, $81,58 \pm 1,85$; FLO+PILO, $75,63 \pm 4,34$) que os animais permaneceram em nível 2 durante o SE não diferiram significativamente ($p > 0,05$), ao comparar-se os grupos (Figura 16A e B).

Em SAL+PILO (Figura 16C) observa-se que no começo do SE, nos primeiros 10 minutos, o número do nível 2 encontra-se elevado ($4,00 \pm 0,51$), porém essa quantidade passa a diminuir de forma significativa por volta dos 20 minutos ($2,84 \pm 0,27$) persistindo até os 90 minutos ($2,07 \pm 0,07$), uma vez que os animais passam a sustentar este nível ao longo de todas as últimas janelas de tempo. Entretanto, em se tratando de FLO+PILO (Figura 16D) o padrão quantitativo do nível 2 difere-se em alguns pontos ao apresentado em SAL+PILO. Neste grupo, a quantidade do nível 2 começa elevada nos 20 minutos ($3,06 \pm 0,38$), vindo apenas a diminuir significativamente a partir dos 70 minutos ($2,13 \pm 0,13$).

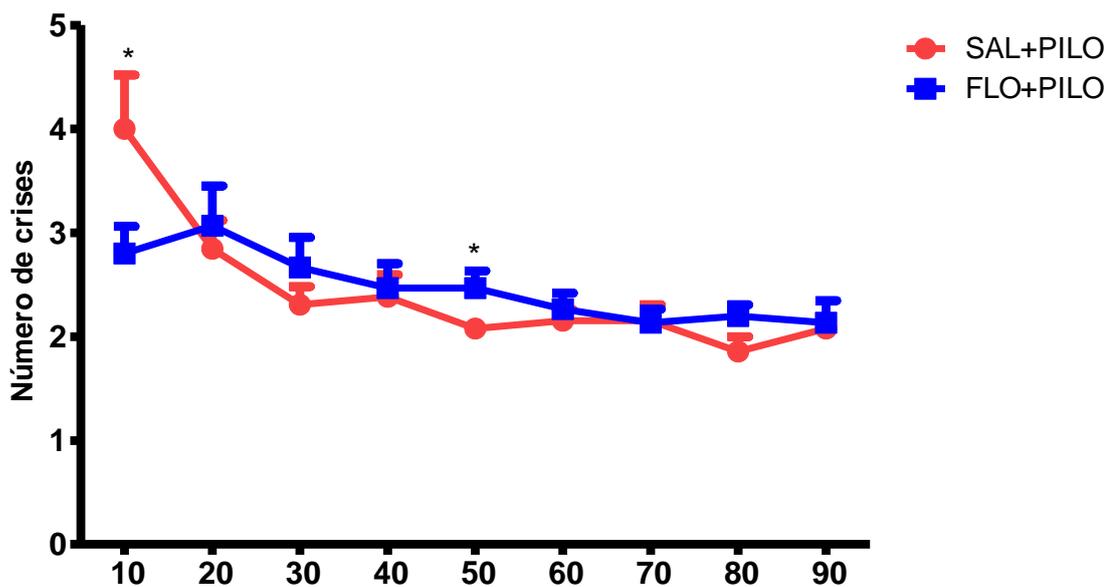
Ao comparar-se os grupos, percebeu-se que no tempo 10 o grupo FLO+PILO ($4,00 \pm 0,51$) apresenta uma quantidade menor de nível 2 que em SAL+PILO ($2,8 \pm 0,26$). Em contrapartida, por volta dos 50 minutos ocorre um aumento significativo do número de nível 2 em FLO+PILO ($2,46 \pm 0,16$) em comparação à SAL+PILO ($2,07 \pm 0,07$) (Figura 17).

FIGURA 16. Quantidade e tempo total de nível 2 durante o SE



(A) Quantidade de nível 2. (B) Tempo total do nível 2. (C) Quantidade de nível 2 por janela no grupo SAL+PILO. (D) Quantidade de nível 2 por janela no grupo FLO+PILO. SAL+PILO, salina + pilocarpina; FLO+PILO, florizina + pilocarpina. ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls, $p < 0,0001$. *** comparado ao tempo 10, $p < 0,05$. # comparado ao tempo 10 e * comparado ao tempo 20.

FIGURA 17. Quantidade de nível 2 por janela durante o SE nos SAL+PILO e FLO+PILO



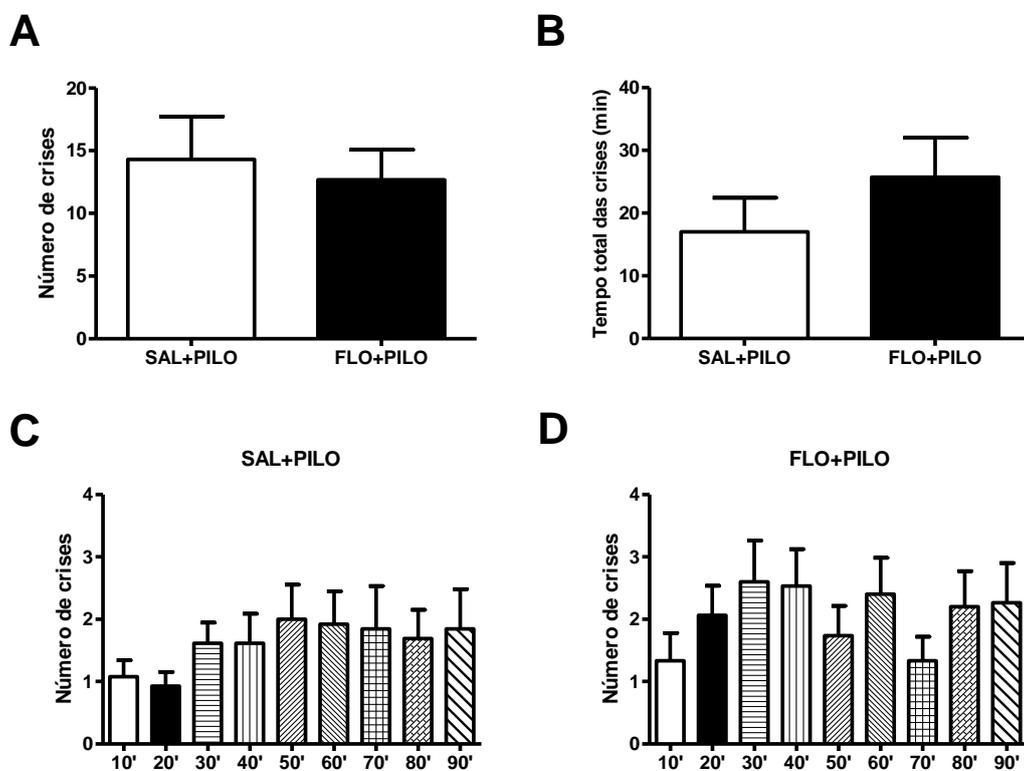
Quantidade de nível 2 por janela dos grupos SAL+PILO (em vermelho) e FLO+PILO (em azul). SAL+PILO, salina + pilocarpina; FLO+PILO, florizina + pilocarpina. *Teste t*, não-pareado, $p < 0,05$. * compara os grupos SAL+PILO e FLO+PILO nos tempos 10 e 50.

5.1.4.2 Nível 3

Ao longo dos 90 minutos de SE, em alguns animais, as crises límbicas se agravam, apresentando clonia de patas anteriores (nível 3), elevação sobre patas posteriores (nível 4) e elevação e queda, uma vez (nível 5) ou várias vezes (nível 6).

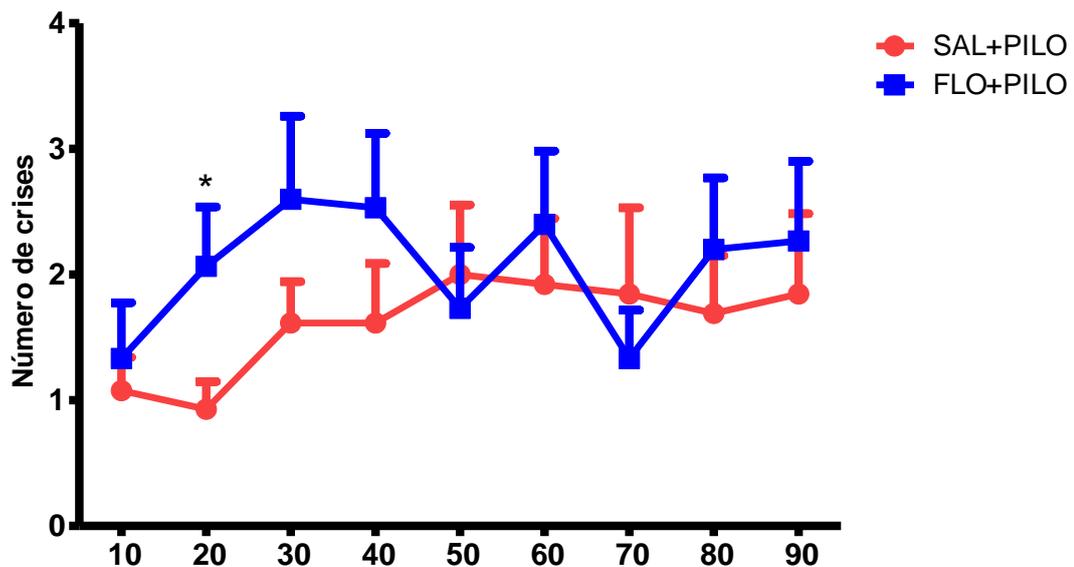
Ao observa-se a quantidade de vezes (SAL+PILO, $14,31 \pm 3,42$; FLO+PILO, $12,67 \pm 2,41$) e o tempo total (SAL+PILO, $17,02 \pm 5,42$; FLO+PILO, $25,73 \pm 6,27$) que os animais estiveram em nível 3 ao longo dos 90 minutos de SE não ocorreu diferença significativa ($p > 0,05$) quando comparado os grupos em questão (Figura 18A e B). De maneira similar, a quantidade de nível 3 a cada 10 minutos do SE não diferiu estatisticamente, quando comparado cada tempo dentro dos grupos SAL+PILO (Figura 18C) e FLO+PILO (Figura 18D). No entanto, percebe-se que no tempo 20 tem uma maior quantidade de nível 3 ($p < 0,05$) em FLO+PILO ($2,07 \pm 0,47$) que em SAL+PILO ($0,93 \pm 0,22$). Neste nível 3, assim como mostrado no nível 2, FLO+PILO tem uma maior prevalência crises nível 3 que SAL+PILO (Figura 19).

FIGURA 18. Quantidade e tempo total de nível 3 durante o SE



(A) Quantidade de nível 3. (B) Tempo total do nível 3. (C) Quantidade de nível 3 por janela no grupo SAL+PILO. (D) Quantidade de nível 3 por janela no grupo FLO+PILO. SAL+PILO, salina + pilocarpina; FLO+PILO, florizina + pilocarpina. ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls, $p > 0,05$.

FIGURA 19. Quantidade de nível 3 por janela durante o SE nos SAL+PILO e FLO+PILO



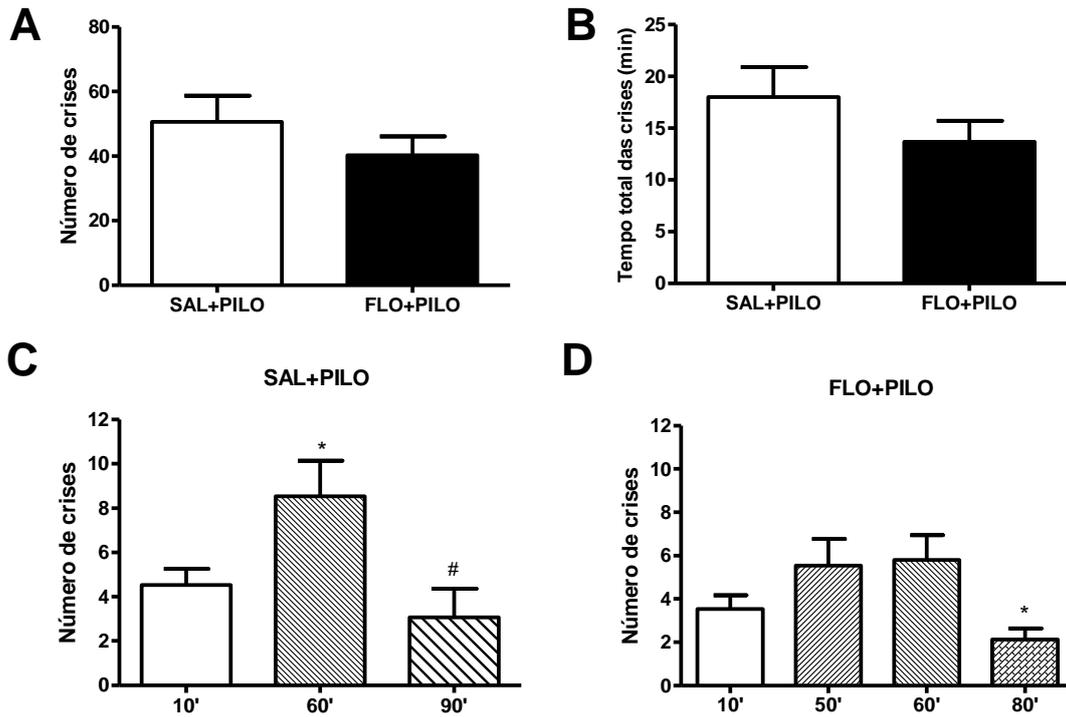
Quantidade de nível 3 por janela dos grupos SAL+PILO (em vermelho) e FLO+PILO (em azul). SAL+PILO, salina + pilocarpina; FLO+PILO, florizina + pilocarpina. *Teste t*, não-pareado, $p < 0,05$. * compara os grupos SAL+PILO e FLO+PILO no tempo 10.

5.1.4.3 Nível 4

Em se tratando da quantidade de vezes (SAL+PILO, $50,62 \pm 8,08$; FLO+PILO, $40,27 \pm 5,85$) e do tempo total (SAL+PILO, $18,02 \pm 2,87$; FLO+PILO, $13,69 \pm 2,03$) que os animais estiveram em nível 4 ao longo dos 90 minutos de SE nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os grupos avaliados (Figura 20A e B).

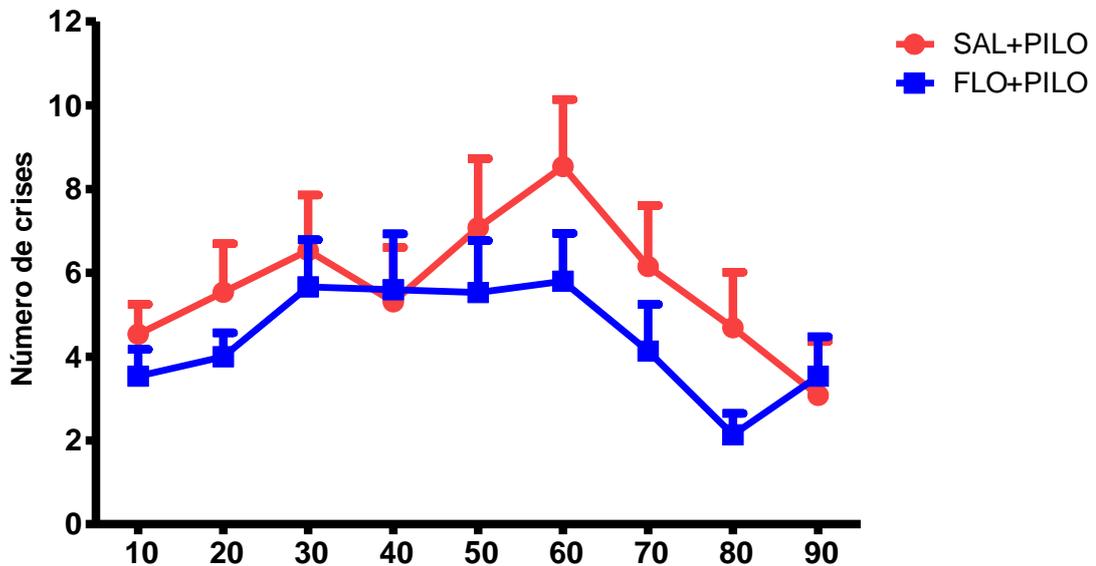
Em SAL+PILO (Figura 20C) foi possível indicar onde o nível 4 apresenta seu pico no tempo 60 ($8,54 \pm 1,60$), sendo significativamente maior que o tempo inicial ($4,54 \pm 0,71$). Porém, quando evolui para o tempo 90 ($3,07 \pm 1,28$) esta quantidade diminui, sendo similar ao tempo 10. Em FLO+PILO (Figura 20D) parte deste padrão se repete. No tempo 80 ($2,13 \pm 0,51$), a quantidade do nível 4 decresce quando comparado ao tempo 50 ($5,53 \pm 1,24$) e 60 ($5,80 \pm 1,15$). Entretanto, não teve diferença significativa ($p > 0,05$) quando foi comparada a quantidade do nível 4 dos grupos SAL+PILO e FLO+PILO em cada tempo (Figura 21).

FIGURA 20. Quantidade e tempo total de nível 4 durante o SE



(A) Quantidade de nível 4. (B) Tempo total do nível 4. (C) Quantidade de nível 4 por janela no grupo SAL+PILO. (D) Quantidade de nível 4 por janela no grupo FLO+PILO. SAL+PILO, salina + pilocarpina; FLO+PILO, florizina + pilocarpina. ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls, $p < 0,05$. (C) * comparado ao tempo 10 e # comparado ao tempo 60. (D) * comparado ao tempo 50 e 60.

FIGURA 21. Quantidade de nível 4 por janela durante o nos SAL+PILO e FLO+PILO



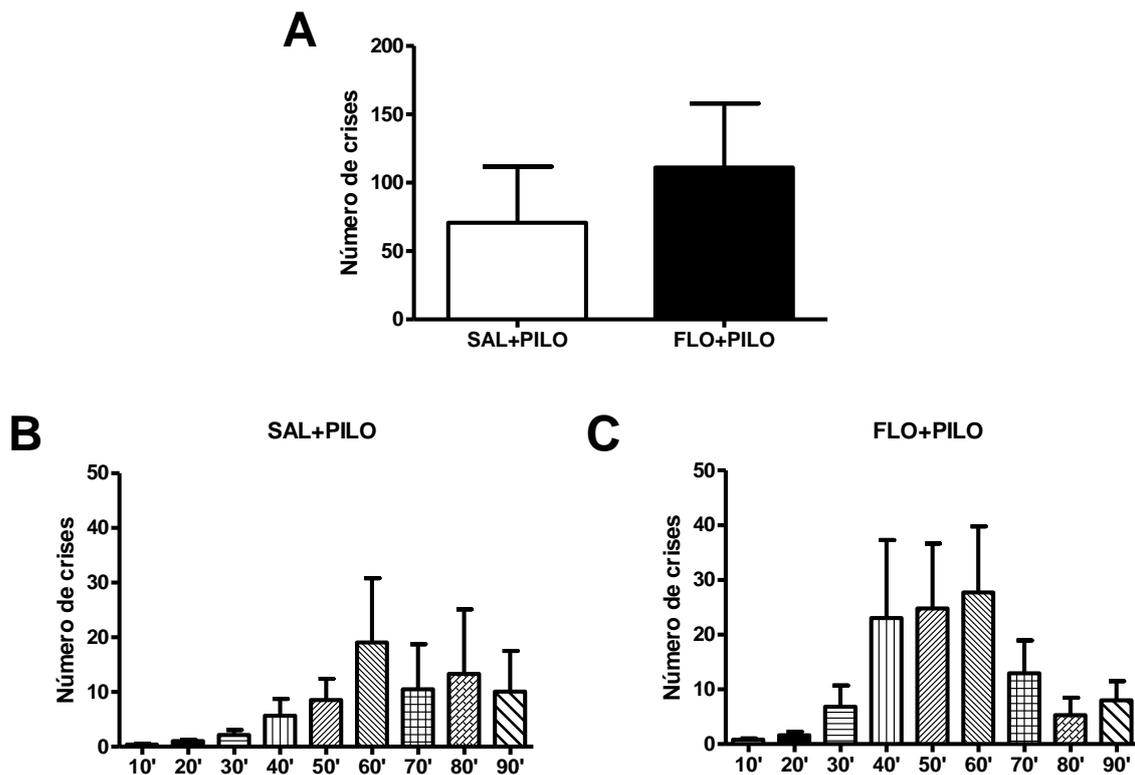
Quantidade de nível 4 por janela dos grupos SAL+PILO (em vermelho) e FLO+PILO (em azul). SAL+PILO, salina + pilocarpina; FLO+PILO, florizina + pilocarpina. *Teste t*, não-pareado, $p > 0,05$.

5.1.4.4 Nível 5

As crises límbicas apresentadas pela escala de Racine (1972), o fato de os animais promoverem elevação sobre patas posteriores seguidos de perda de equilíbrio que culmina em uma (nível 5) ou mais quedas (nível 6) representa o tipo de crise com maior gravidade. Quando observada a quantidade de vezes (SAL+PILO, $70,69 \pm 41,05$; FLO+PILO, $111,10 \pm 46,87$) que os animais apresentaram nível 5 ao longo do SE, percebeu-se que não ocorreu diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$; Figura 22A).

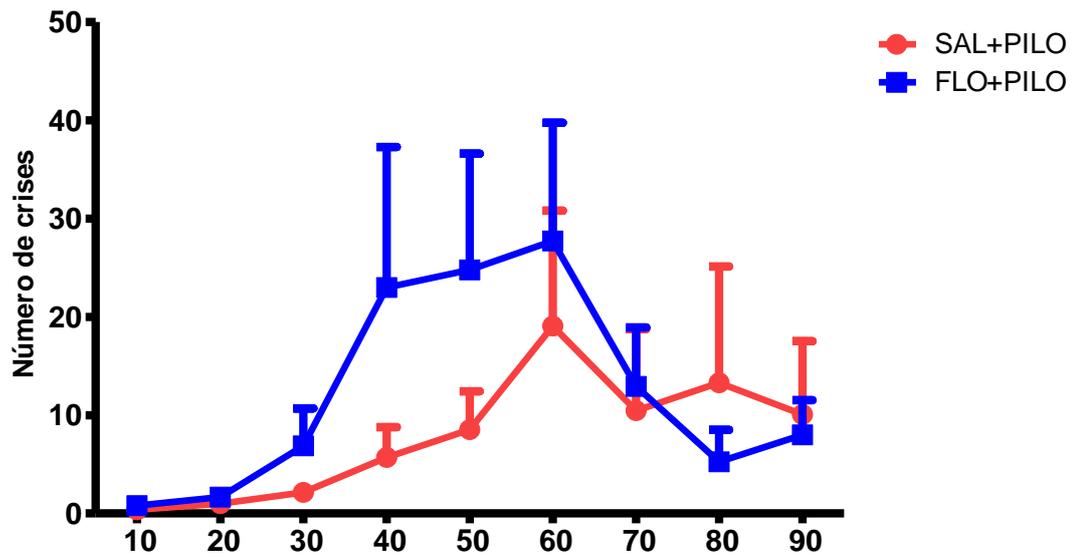
Quando todos os tempos do SE foram avaliados nenhuma diferença foi mostrada no grupo SAL+PILO e FLO+PILO (Figura 22B e C). Da mesma forma, não foi observada diferença significativa quando a quantidade de nível 5 analisada entre ambos os grupos (Figura 23).

FIGURA 22. Quantidade e tempo total de nível 5 durante o SE



(A) Quantidade de nível 5. (B) Quantidade de nível 5 por janela no grupo SAL+PILO. (C) Quantidade de nível 5 por janela no grupo FLO+PILO. SAL+PILO, salina + pilocarpina; FLO+PILO, florizina + pilocarpina. *Teste t*, não-pareado, $p < 0,05$. (B) e (C) * comparado ao tempo 10.

FIGURA 23. Quantidade de nível 5 por janela durante o SE nos SAL+PILO e FLO+PILO

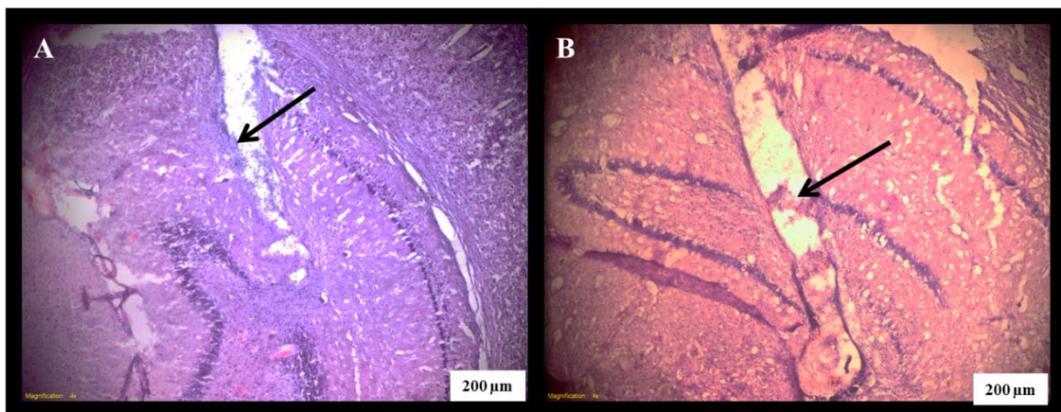


Quantidade de nível 5 por janela dos grupos SAL+PILO (em vermelho) e FLO+PILO (em azul). SAL+PILO, salina + pilocarpina; FLO+PILO, florizina + pilocarpina. *Teste t*, não-pareado, $p > 0,05$.

5.2 Local de implantação da cânula no hipocampo

Com o objetivo de confirmar que a cânula foi implantada no sítio correto, realizou-se a técnica de hematoxilina e eosina, que marcou o tecido hipocampal. Apenas animais confirmados na área correta foram inseridos nas análises. As fotomicrografias indicam a posição correta da cânula nos grupos SAL+PILO (Figura 24A) e FLO+PILO (Figura 24B), a cânula foi inserida corretamente no hilus, garantindo que as substâncias (salina, florizina e pilocarpina) fossem injetadas no hipocampo.

FIGURA 24. Sítio de implantação da cânula no hilus do giro dentado

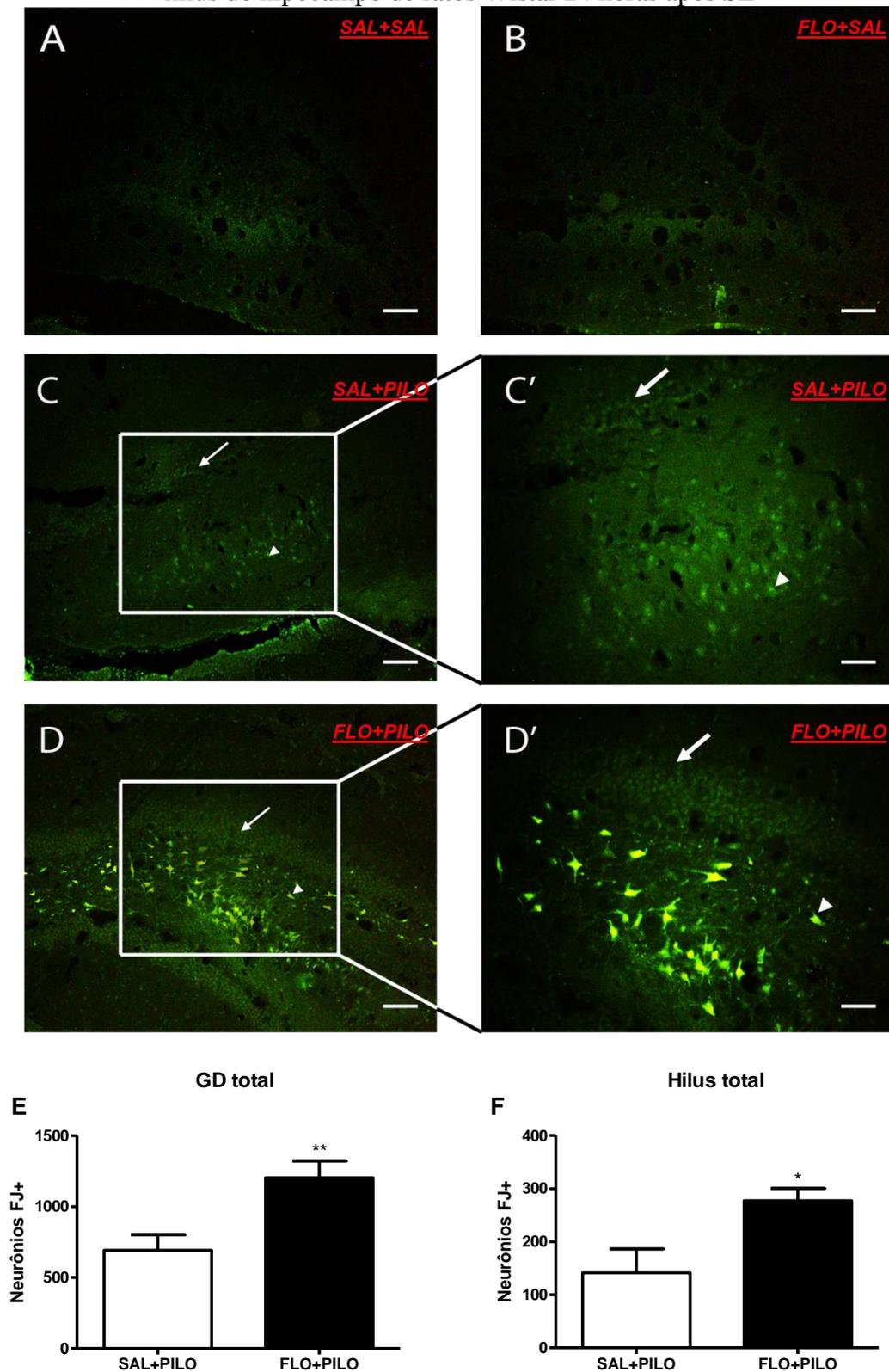


Implantação no hilus do giro dentado do hipocampo esquerdo nos grupos SAL+PILO (A) e FLO+PILO (B). Aumento de 40x.

5.3 Neurodegeneração FJ+ nas regiões giro dentado, hilus, CA3 e CA1 do hipocampo após 24h do SE

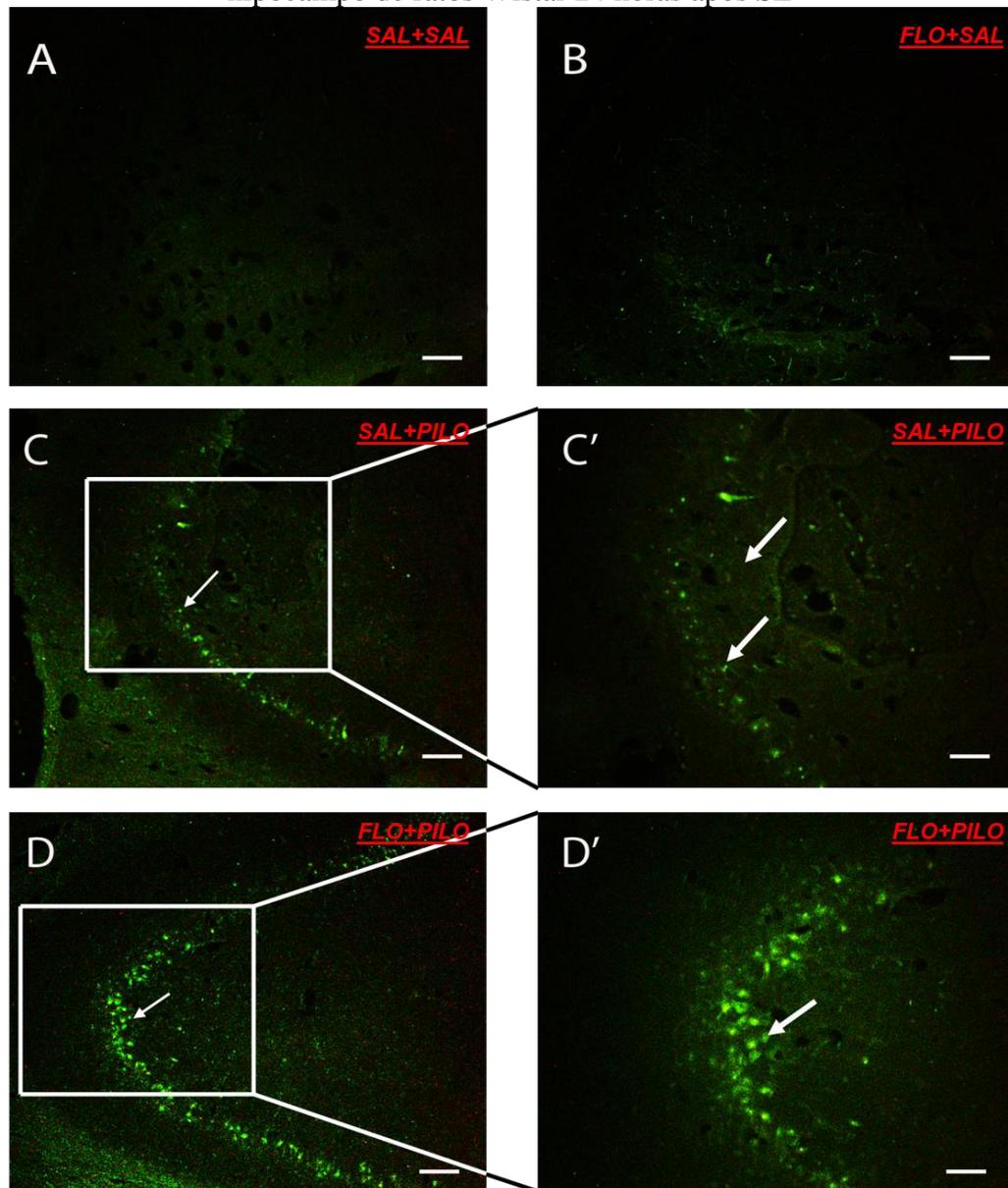
Como já era esperado não teve células FJ+ nos grupos SAL+SAL (Figura 25A, 26A e 27A) e FLO+SAL (Figura 25B, 26B e 27B). Após 24 h do SE, animais de FLO+PILO tiveram maior número significativo de células FJ+ em GD (1205.0 ± 116.9) e *hilus* (277.3 ± 23.2) quando comparado ao GD (693.3 ± 109.0) e *hilus* (141.5 ± 45.1) do grupo SAL+PILO (Figure 25E-F). Na região CA3 de FLO+PILO (338.0 ± 36.8), também teve um aumento de células FJ+ em relação ao grupo SAL+PILO (170.2 ± 61.1) (Figure 26 E). Similarmente, na área CA1 a quantidade de células FJ + foi maior em FLO+PILO (400.2 ± 60.5) que no grupo SAL+PILO (221.0 ± 52.7) (Figure 27E). As figuras (25, 26 e 27 C-D) mostram representações histológicas dos dados.

FIGURA 25. Análise qualitativa e quantitativa da neurodegeneração FJ+ no giro denteado e hilus do hipocampo de ratos Wistar 24 horas após SE

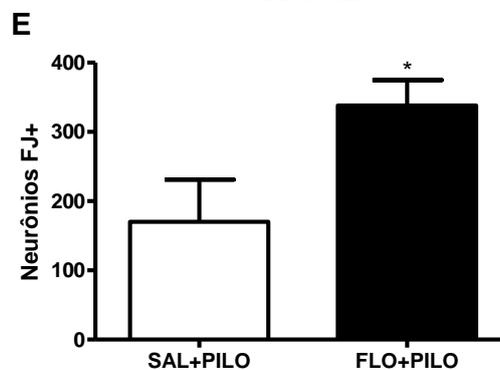


Giro denteado e seu hilus de animais 24 horas do grupo SAL+SAL (A), FLO+SAL (B), SAL+PILO (C) e FLO+PILO (D). Número total de FJ+ no giro denteado (E) e hilus (F). Setas representam o giro denteado e cabeças de seta, o hilus. SAL+SAL, salina + salina; FLO+SAL, florizina + salina; SAL+PILO, salina + pilocarpina; FLO+PILO, florizina + pilocarpina. *Teste t*, não-pareado, $p < 0,05$ e $p < 0,01$. *, ** comparado a SAL+PILO. Aumento de 100 e 200x; Barra de calibração: 100 μm e 50 μm.

FIGURA 26. Análise qualitativa e quantitativa da neurodegeneração FJ+ na região CA3 do hipocampo de ratos Wistar 24 horas após SE

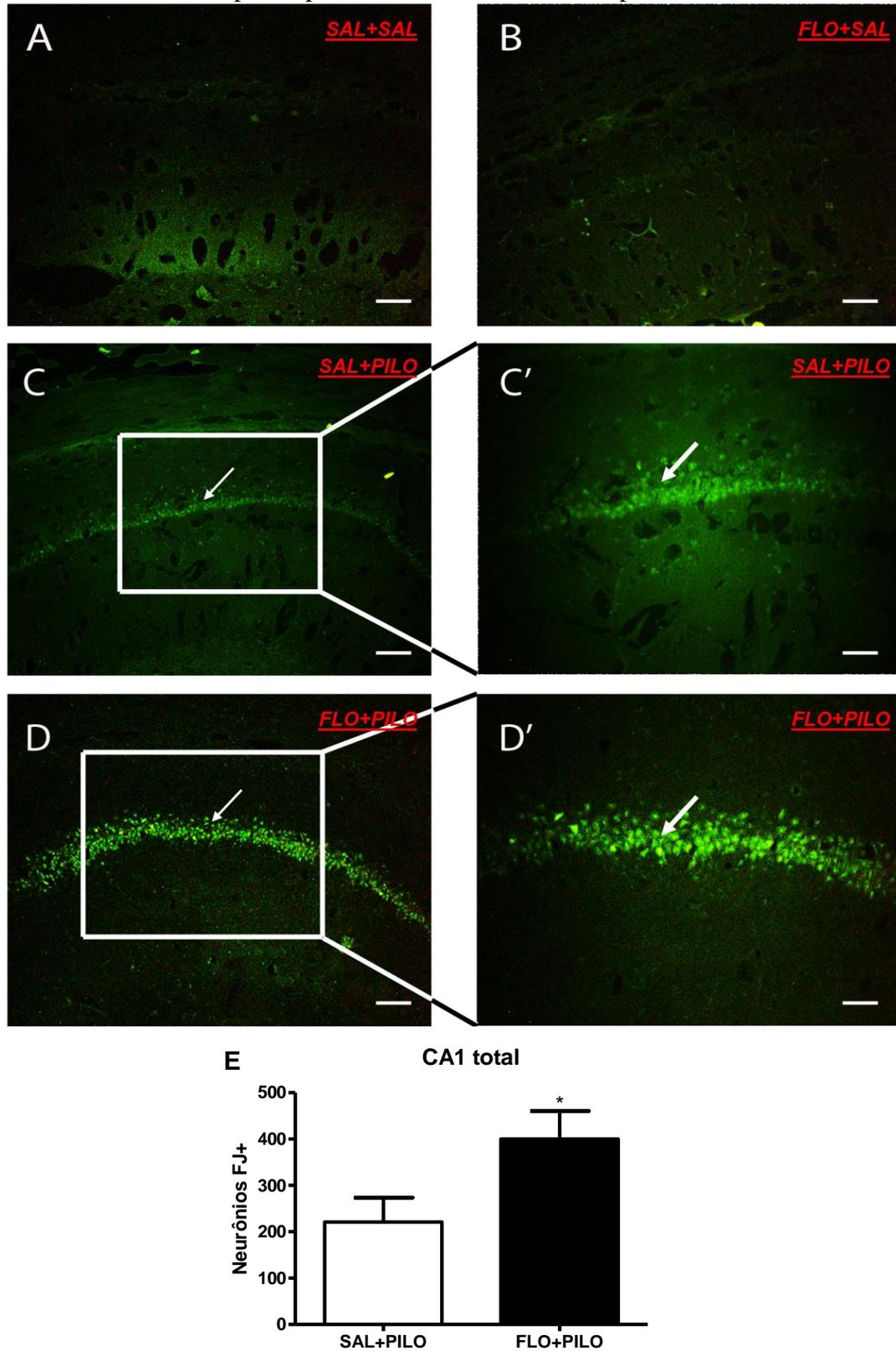


CA3 total



Subárea CA3 de animais 24 horas do grupo SAL+SAL (A), FLO+SAL (B), SAL+PILO (C) e FLO+PILO (D). Número total de FJ+ em CA3 (E). Setas representam a região CA3. SAL+SAL, salina + salina; FLO+SAL, florizina + salina; SAL+PILO, salina + pilocarpina; FLO+PILO, florizina + pilocarpina. *Teste t*, não-pareado, $p < 0,05$. * comparado a SAL+PILO.

FIGURA 27. Análise qualitativa e quantitativa da neurodegeneração FJ+ na região CA1 do hipocampo de ratos Wistar 24 horas após SE



Subárea CA1 de animais 24 horas do grupo SAL+SAL (A), FLO+SAL (B), SAL+PILO (C) e FLO+PILO (D). Número total de FJ+ em CA1 (E). Setas representam a região CA1. SAL+SAL, salina + salina; FLO+SAL, florizina + salina; SAL+PILO, salina + pilocarpina; FLO+PILO, florizina + pilocarpina. *Teste t*, não-pareado, $p < 0,05$. * comparado a SAL+PILO.

5.4 Neurodegeneração FJ+ nas regiões giro dentado, hilus, CA3 e CA1 do hipocampo após 15 dias do SE

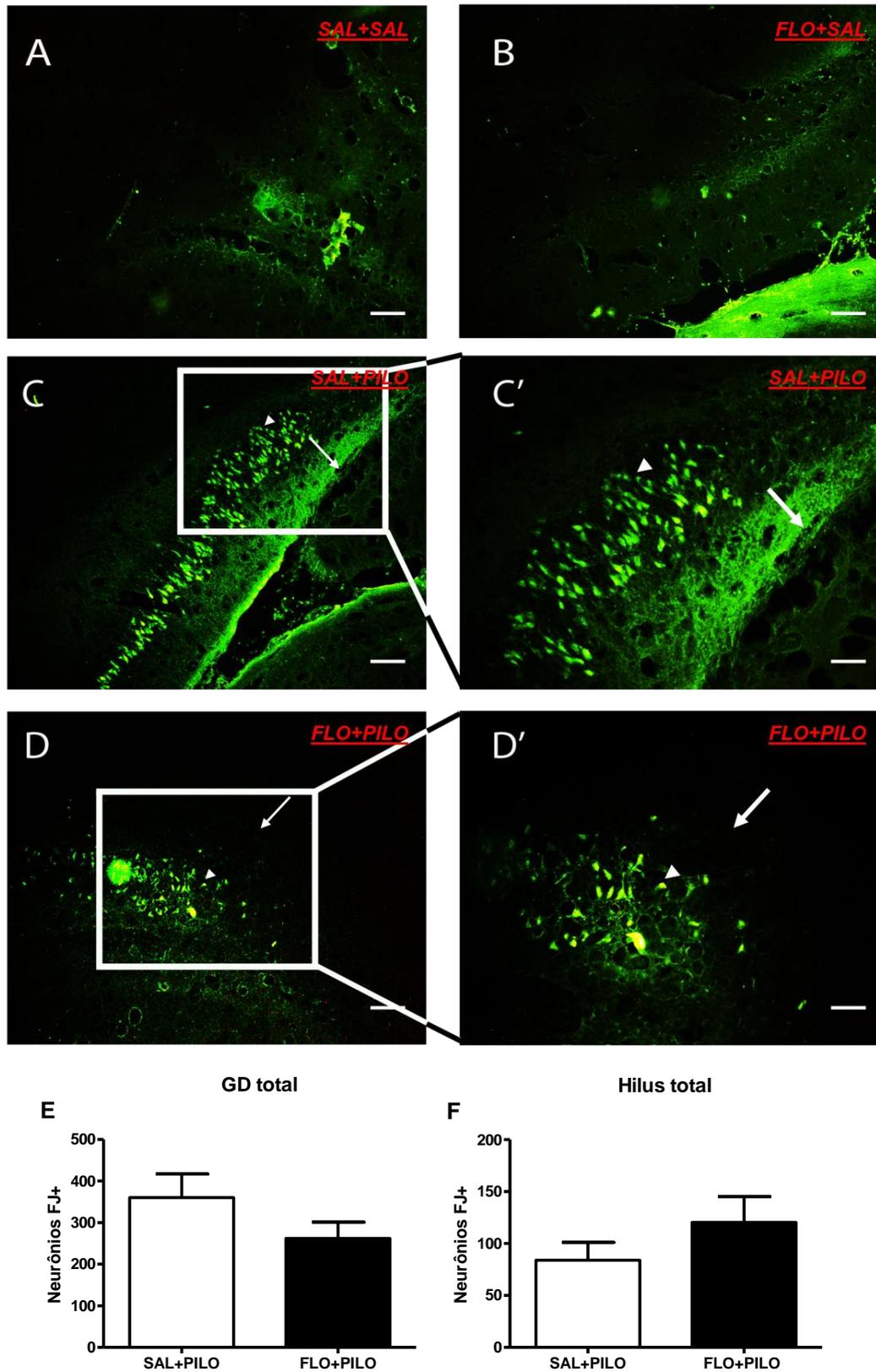
Ao analisar os animais que receberam previamente florizina e que foram perfundidos 15 dias após o SE, foi identificada diminuição no número de neurônios FJ+ na região CA1 ($245,3 \pm 45,9$) quando comparado à mesma região dos que receberam apenas salina ($425,8 \pm 47,5$) (Figura 30). No entanto, nenhuma diferença significativa foi encontrada ao serem comparadas as regiões GD, hilus e CA3 do grupo FLO+PILO (giro dentado, $262,3 \pm 38,9$; hilus, $120,3 \pm 24,9$; CA3, $358,8 \pm 77,9$) em comparação à SAL+PILO (giro dentado, $360,2 \pm 56,7$; hilus, $83,8 \pm 17,3$; CA3, $235,5 \pm 40,1$) (Figuras 28 e 29).

5.5 Cinética de neurodegeneração nas regiões giro dentado, hilus, CA3 e CA1 do hipocampo nos tempos 24 horas e 15 dias após SE

Em relação à cinética da neurodegeneração, SAL+PILO mostra que o número de neurônios FJ+ diminuiu significativamente no GD após 15 dias do insulto ($360,2 \pm 56,7$), quando comparado ao tempo de 24 horas depois do SE ($693,3 \pm 109,0$). Entretanto, na região CA1 ocorreu um aumento de neurônios FJ+ depois de 15 dias ($425,8 \pm 47,5$) em comparação ao tempo inicial ($221,0 \pm 52,7$). Nenhuma diferença estatística significativa foi encontrada no hilus (24h, $141,5 \pm 45,1$; 15d, $83,8 \pm 17,3$) e em CA3 (24h, $170,2 \pm 61,1$; 15d, $235,5 \pm 40,1$) entre os diferentes tempos (Figura 31A).

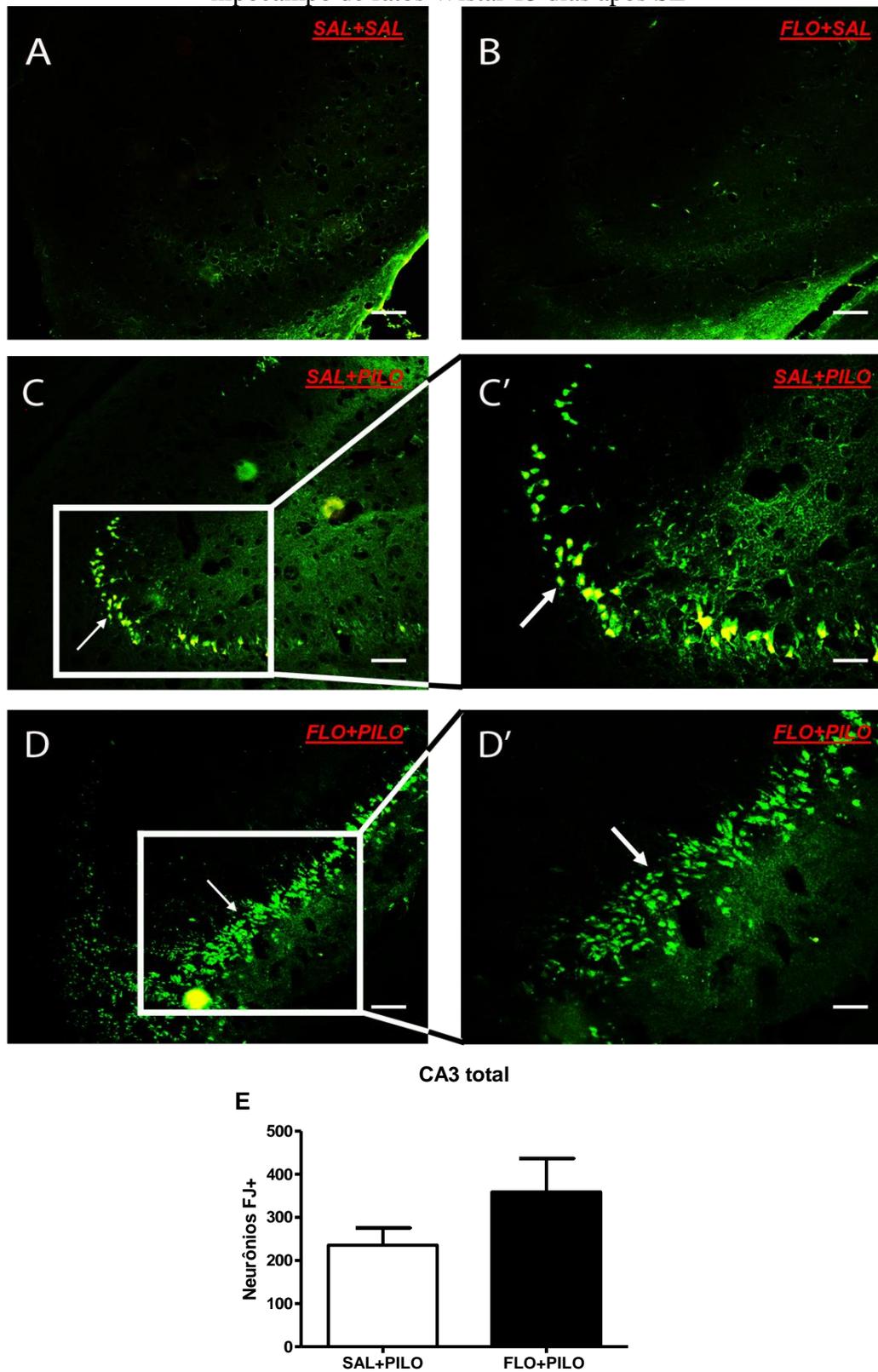
Em FLO+PILO, 15 dias depois do SE mostrou uma diminuição das células em degeneração no giro dentado ($262,3 \pm 38,9$) e no hilus ($120,3 \pm 24,9$) em relação ao tempo de 24 horas posterior ao insulto (giro dentado, $1205,0 \pm 116,9$; hilus, $277,3 \pm 23,2$). As subáreas CA3 (24h, $338,0 \pm 36,8$; 15d, $358,8 \pm 77,9$) e CA1 (24h, $400,2 \pm 60,5$; 15d, $245,3 \pm 45,9$) não apresentaram nenhuma alteração considerável (Figura 31B).

FIGURA 28. Análise qualitativa e quantitativa da neurodegeneração FJ+ na região giro dentado e hilus do hipocampo de ratos Wistar 15 dias após SE



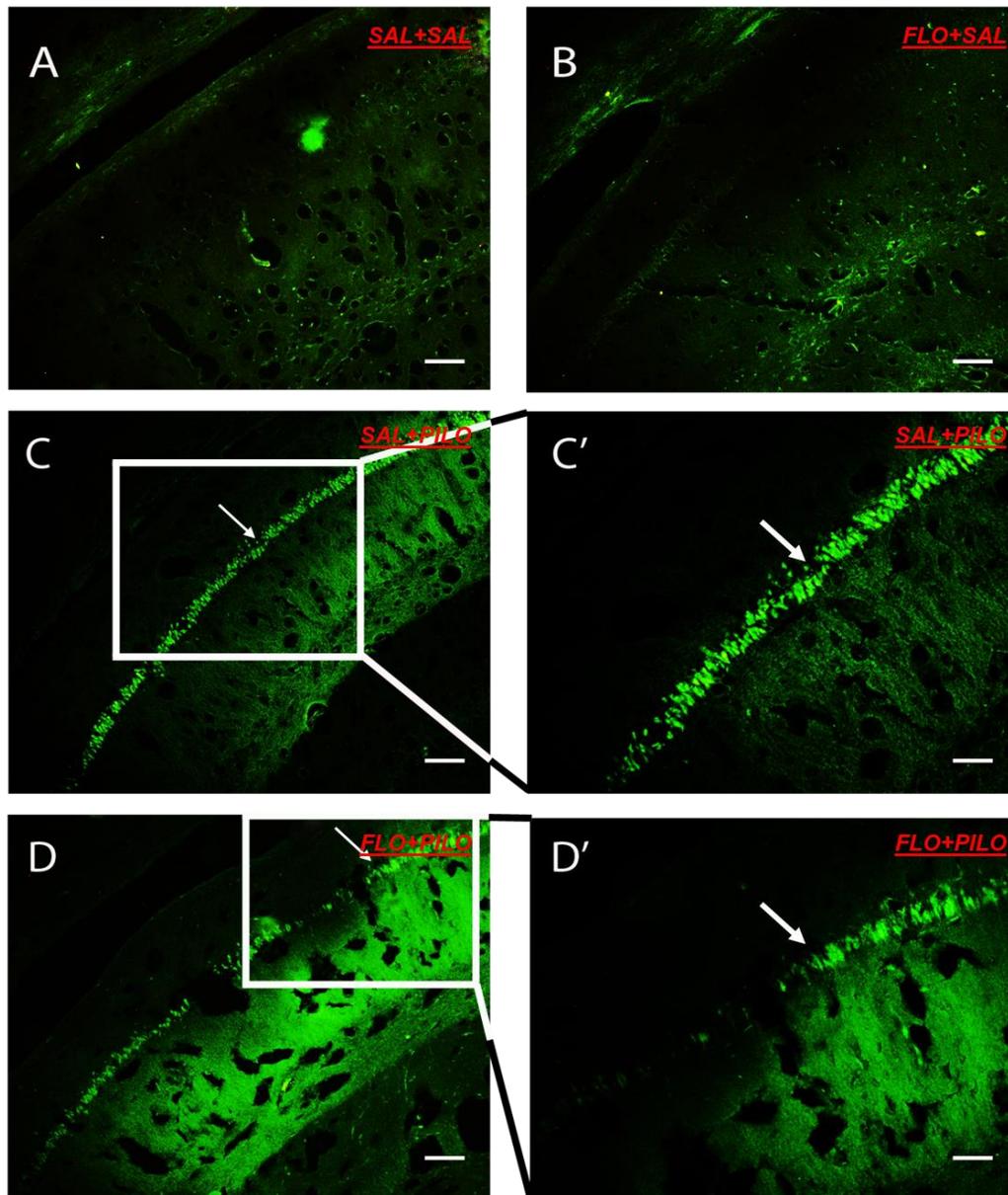
Giro dentado e seu hilus de animais 15 dias do grupo SAL+SAL (A), FLO+SAL (B), SAL+PILO (C) e FLO+PILO (D). Número total de FJ+ no giro dentado (E) e hilus (F). Setas representam o hilus do giro dentado. SAL+SAL, salina + salina; FLO+SAL, florizina + salina; SAL+PILO, salina + pilocarpina; FLO+PILO, florizina + pilocarpina. *Teste t*, não-pareado, $p > 0,05$.

FIGURA 29. Análise qualitativa e quantitativa da neurodegeneração FJ+ na região CA3 do hipocampo de ratos Wistar 15 dias após SE

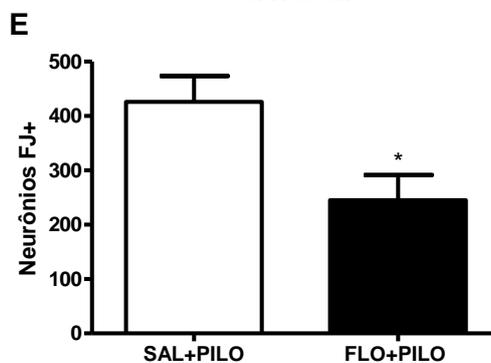


Subárea CA3 de animais 15 dias do grupo SAL+SAL (A), FLO+SAL (B), SAL+PILO (C) e FLO+PILO (D). Número total de FJ+ em CA3 (E). Setas representam a região CA3. SAL+SAL, salina + salina; FLO+SAL, florizina + salina; SAL+PILO, salina + pilocarpina; FLO+PILO, florizina + pilocarpina. *Teste t*, não-pareado, $p > 0,05$.

FIGURA 30. Análise qualitativa e quantitativa da neurodegeneração FJ+ na região CA1 do hipocampo de ratos Wistar 15 dias após SE

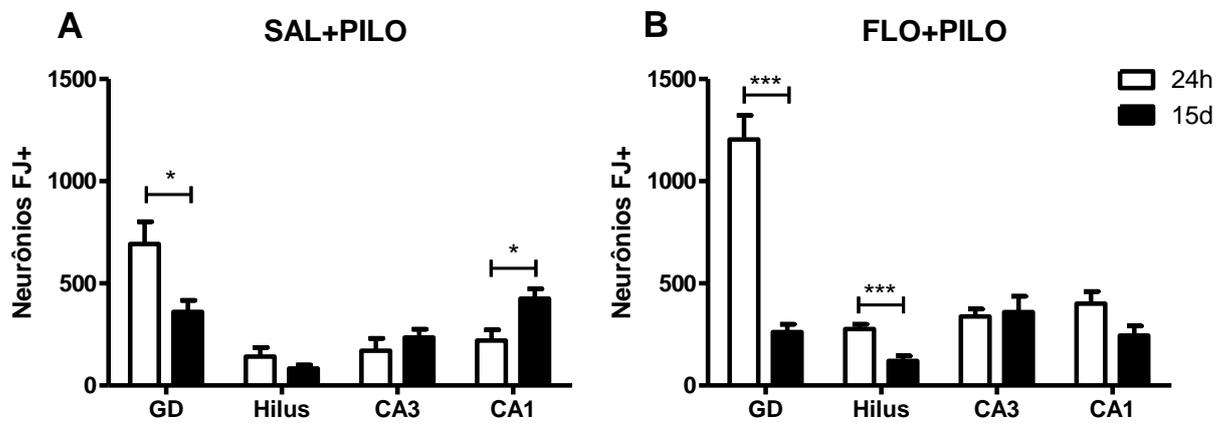


CA1 total



Subárea CA1 de animais 15 dias do grupo SAL+SAL (A), FLO+SAL (B), SAL+PILO (C) e FLO+PILO (D). Número total de FJ+ em CA1 (E). Setas representam a região CA1. SAL+SAL, salina + salina; FLO+SAL, florizina + salina; SAL+PILO, salina + pilocarpina; FLO+PILO, florizina + pilocarpina. *Teste t*, não-pareado, $p < 0,05$. * comparado a SAL+PILO.

FIGURA 31. Análise da cinética da neurodegeneração em SAL+PILO e FLO+PILO



Cinética de neurodegeneração dos tempos 24 horas e 15 dias em SAL+PILO (A) e FLO+PILO (B), nas regiões giro dentado (GD), hilus, CA3 e CA1, respectivamente. SAL+SAL, salina + salina; FLO+SAL, florizina + salina; SAL+PILO, salina + pilocarpina; FLO+PILO, florizina + pilocarpina. *Teste t*, não-pareado, $p < 0,05$. (A) Em GD e CA1, * 24h versus 15d. (B) Em GD e hilus, *** 24h versus 15d.

6 DISCUSSÃO

As crises epilépticas estão relacionadas a um conjunto de alterações comportamentais, eletrofisiológicas, celulares e moleculares (BADAWY; HARVEY; MACDONELL, 2009; O'DELL et al., 2012), incluindo alterações no metabolismo energético neuronal (LOTHMAN; COLLINS, 1981). Previamente, foi demonstrado que SGLTs estão associados ao foco epiléptico (POPPE et al., 1997), sugerindo exercer papel protetor em condições de estresse metabólico (YU et al., 2010; YU et al., 2013). No entanto, ainda não é bem descrita na literatura a participação de SGLTs durante as crises epilépticas, sendo importante a realização de mais estudos quanto a parâmetros relacionados ao processo epileptogênico. Os achados no presente trabalho podem contribuir na compreensão do papel funcional de SGLTs como protetor natural durante a epileptogênese. Neste contexto, os principais achados, pela primeira vez descritos, foram:

1. Após a inibição de SGLTs pela florizina, o número de WDS aumenta entre o período de latência e o SE;
2. O bloqueio de SGLTs aumenta o número de neurônios FJ+ nas regiões giro dentado, hilus, CA3 e CA1 após 24 horas do SE;
3. Após 15 dias do SE, o número de FJ+ na subárea CA1 diminui.

6.1 Quantificação do *wet dog shake* durante a latência e o SE

O presente trabalho mostrou pela primeira vez que o número de WDS foi elevado (Figura 12) após a administração de florizina em animais submetidos ao SE. Além disso, já foi reportado em estudos anteriores que as células granulares do giro dentado são importantes para a expressão do WDS (GRIMES et al., 1988). Um estudo anterior mostrou que a estimulação direta da camada granular do giro dentado é capaz de evocar WDS, sendo a descarga nas células granulares necessárias para a indução deste tipo de comportamento (DAMIANO; CONNOR, 1984). Entretanto, estes neurônios podem desempenhar um papel inibitório no espalhamento das crises no hipocampo ou em outras estruturas límbicas (LEE; HONG, 1990).

Existem duas hipóteses que sugerem os circuitos envolvidos na expressão do WDS e o seu papel potencial nas crises. A primeira hipótese (generalização) sugere que o WDS pode ser um marcador da progressão de crises límbicas em direção à generalização (RONDOUIN et al., 1987). Neste contexto, WDS seria expresso apenas quando a atividade do foco límbico alcançasse o hipocampo. A segunda hipótese (anticonvulsivante) indica que o WDS pode ser

a expressão de processos inibitórios associados a crises límbicas (LE GAL LA SALLE; CAVALHEIRO, 1981).

Uma hipótese que busca explicar o aumento no número do WDS foi mencionada por Rodrigues et al. (2005), como a expressão de uma estratégia central de controle de crises, podendo inferir que possivelmente a inibição do cotransportador SGLTs evoca mecanismo compensatório (aumento do WDS) na tentativa de proteger o organismo contra o agravamento das crises límbicas. Apesar dessas evidências e inferências especulativas, novos estudos devem ser desenvolvidos para elucidar o papel do WDS que certamente possui papel importante na epilepsia.

6.2 Gravidade e evolução das crises ao longo do SE

A partir do trabalho pioneiro de Furtado et al. (2002), mostraram que a administração intra-hipocámpica de PILO é capaz de induzir os animais a desenvolverem SE, CREs, brotamento de fibras musgosas e atividade epileptiforme. Também foi mostrado por Furtado et al. (2011), que após a administração de H-PILO ocorreu inicialmente além do WDS, piloereção, hipersalivação e espasmos restritos na cabeça e na face, sendo o SE caracterizado por ciclos repetidos de mioclonia de cabeça e membros anteriores, elevações e quedas. Este padrão foi seguido por ambos os grupos que tiveram SE.

No presente estudo, foram analisados detalhadamente os padrões comportamentais dos grupos SAL+PILO e FLO+PILO, a fim de observar se a inibição de SGLTs agravaria as crises motoras. Inicialmente, mostramos que a administração de florizina, inibidor inespecífico de SGLTs, não promoveu nenhuma diferença significativa na gravidade das crises, o que corrobora com o estudo desenvolvido por Castro et al 2011.

Além disso, no presente trabalho foi mostrada a evolução das crises ao longo do SE, induzido por H-PILO, utilizando índices conhecidos de gravidade de crises (RACINE, 1972). É sabido que a gravidade das crises aumenta com o tempo (FURTADO et al., 2011), no entanto, poucos trabalhos trazem um suporte detalhado que explique este padrão comportamental. Após a administração de H-PILO, nos animais que apenas receberam salina, observamos nos primeiros tempos do SE uma grande quantidade de nível 2 e 4 (Figura 15A). Ao longo da deflagração do SE o nível 2 diminuiu em número, mantendo-se elevado o nível 4 e inalterado o nível 5 (Figura 15B-M). O nível 4 diminuiu apenas no último tempo (Figura 15N). Este padrão pode ser explicado pelo fato de que inicialmente as crises são mais focais, centralizadas em poucas áreas cerebrais, o que justifica a expressão de comportamentos como

automatismo facial e mioclonia de cabeça e pescoço. Porém, conforme o tempo de SE avança, outras áreas centrais passam a ser recrutadas, passando a desenvolver crises motoras generalizadas. Neste momento, as crises mais brandas, como automatismo e mioclonia de cabeça e pescoço, são somadas às mioclonia de membros superiores, elevações e frequentes quedas. Segundo Lothman e Collins (1981), os primeiros níveis da escala de Racine (1972) ocorreriam como resposta epiléptica restrita ao hipocampo e septo lateral, nos níveis intermediários centros límbicos adicionais passariam a estar ativos a partir de descargas convulsivas, e no último nível centros extralímbicos estariam sendo envolvidos.

A administração de PILO pode seletivamente iniciar uma sequência de desordens convulsivas e alterações eletrográficas nas estruturas límbicas, acompanhado por espalhamento do dano cerebral (TURSKI et al., 1983; TURSKI et al., 1984). Estes autores mostraram que o hipocampo é uma das mais sensíveis áreas, capaz de acumular atividade epileptiforme e apresentar um baixo limiar a crises induzidas por PILO. Segundo Turski et al. (1984), estes dados relacionam-se à hipótese de que existe um mecanismo potente de feedback-positivo dentro de discretas regiões do hipocampo e do septo, supondo que a sua ativação permita o desenvolvimento de mudanças a longo prazo na excitabilidade de subáreas do hipocampo. Além disso, alguns estudos anatômicos enfatizam que existe um alto grau de interconexões entre hipocampo, córtex entorrinal, amígdala e outras partes do sistema límbico, que podem facilitar o rápido espalhamento das crises (WATSON; EDINGER; SIEGEL, 1983; COLLINS, TEARSE; LOTHMAN, 1983).

A geração de crises no hipocampo dorsal com prolongada estimulação elétrica das células granulares do giro dentado em ratos resulta na ativação metabólica bilateralmente da amígdala, córtex piriforme e entorrinal, claustró, tubérculo olfatório, córtex pré-frontal e cingulado, núcleos talâmicos ventral, reuniens e mediodorsal, bem como substância nigra e inominada (WATSON; EDINGER; SIEGEL, 1983). Esta ativação metabólica pode ser entendida como um desenvolvimento progressivo do foco epiléptico secundário (TURSKI et al., 1984).

Durante as crises límbicas, a captação de glicose é aumentada no hipocampo após a administração sistêmica de ácido caínico, o que representa um índice de excitação neuronal. Crises límbicas leves já foram associadas com aumento da utilização de glicose no hipocampo, como também em outras áreas centrais: subículo, córtex entorrinal e piriforme, septo e amígdala. Enquanto as crises mais graves desencadearam mudanças ainda maiores nestas áreas, bem como em outras regiões: substância nigra e partes do tálamo (LOTHMAN; COLLINS, 1981).

Após a inibição de SGLTs, similarmente ao grupo SAL+PILO, os animais que tiveram SE também apresentaram níveis 2 e 4 elevados (Figura 16A), com diminuição do primeiro ao longo do SE e manutenção do segundo (Figura 16D-L) que apenas diminuiu no penúltimo tempo (Figura 16M). Ao contrário de SAL+PILO, o nível 5 teve um número significativamente maior em três tempos de FLO+PILO (Figura 16G, I, K). Além disso, quando analisado individualmente os níveis 2 e 3, estes apresentaram um aumento em sua quantidade em FLO+PILO, nos tempos 50 (Figura 18) e 20 (Figura 20), respectivamente. Pela primeira vez, o conjunto desses dados fornecem pistas um indicativo de que o bloqueio de SGLTs pode promover o aumento da gravidade das crises.

O SGLT1 foi relacionado com foco epilético em apenas um trabalho (POPPE et al., 1997), porém de uma maneira bastante superficial. De acordo com estes autores e outros (YU et al., 2010; YU et al., 2013), a expressão desta proteína na membrana plasmática de neurônios pode desempenhar uma função protetora em casos de déficit metabólico. Como os SGLTs são cotransportadores que podem transportar glicose contra seu gradiente de concentração (WRIGHT; TURK, 2004), os mesmos poderiam ser essenciais para a sobrevivência de neurônios que estão sob baixas concentrações de glicose ou anóxia (YU et al., 2013).

Inicialmente, hipotetizamos que o bloqueio de SGLTs poderia diminuir a gravidade das crises límbicas, bem como a quantidade de neurônios em processo de degeneração, devido a diminuição da entrada de glicose, que geraria menos energia para a deflagração das crises. No entanto, considerando os achados do presente trabalho foi possível perceber que possivelmente a inibição de SGLTs compromete a sobrevivência dos neurônios, uma vez que menos glicose entra na célula e, conseqüentemente, menos ATP é gerado. É sabido que o ATP, provido pela fosforilação oxidativa mitocondrial, é a fonte de energia para exercer as diversas funções celulares, incluindo o funcionamento das bombas de sódio-potássio e de cloreto e manutenção do potencial de repouso da membrana (BADAWY; HARVEY; MACDONELL, 2009; BERG et al., 2010). Logo, o comprometimento do suprimento de glicose para os neurônios afeta significativamente a função cerebral, bem como o desenvolvimento e predisposição a crises (VANNUCCI et al., 1994).

6.3 Neurodegeneração após o SE

Após o SE, um conjunto de alterações ocorre no cérebro, como rearranjo anormal de sinapses, brotamento de fibras musgosas, neurogênese e processo de neurodegeneração, sendo

este último acometido em diversas áreas cerebrais que geralmente foram notificadas com a presença de descargas epileptiformes (MOHAPEL; EKDAHL; LINDVALL, 2004).

Através de uma análise histológica, Turki et al. (1983c) mostraram que após injeção na região CA3 de um agonista muscarínico, betanecol, um padrão de danos cerebrais disseminados foi mediado aparentemente por crises. Estas lesões envolveram diversas regiões cerebrais como córtex entorrinal e piriforme, tubérculo olfatório, núcleo olfatório anterior, subículo, complexo amigdalóide, córtex temporo-parietal e núcleo hipotalâmico. Estes autores sugerem que tais dados podem ser capazes de estabelecer uma relação de causalidade entre a estimulação excessiva de receptores muscarínicos na formação hipocampal e o dano cerebral epiléptico.

Particularmente, o hipocampo apresenta um padrão de degeneração seletiva nos interneurônios presentes no hilus, bem como nas células granulares das regiões CA1 e CA3 (CASTRO et al., 2011; FURTADO et al., 2011). Em concordância com dados da literatura, em nosso estudo, observamos processos de neurodegeneração nas subáreas hilus do giro dentado, CA3 e CA1 (Figura 32). Além desses locais, notou-se que as células granulares do giro dentado também estavam em degeneração (Figura 32). Sabe-se, de acordo com Baimbridge e Miller (1982), áreas como giro dentado apresentam uma grande quantidade de proteínas tamponantes de cálcio, o que garante a essas regiões certa resistência a neurodegeneração. No entanto, a geração de crises mais graves pode levar à morte neuronal nesta região, o que justifica a perda de neurônios nesta região encontrada neste trabalho. Não foi encontrada evidência de perda neuronal em animais injetados com salina, assim como visto anteriormente na literatura (FURTADO et al., 2011), o que pode indicar que a cânula causa apenas danos mecânicos restritos ao sítio de implantação.

O padrão de neurodegeneração após o SE induzido por H-PILO é dependente do tempo e da região. De acordo com Castro et al. (2011), neurônios FJ+ foram observados em todas as janelas de tempo após o SE no hilus do giro dentado, CA1 e CA3, porém o número de células FJ+ diferiu ao longo do tempo. Conforme Poirier et al. (2000), o melhor tempo para detectar neurodegeneração com FJ foi 24 horas após o SE, embora estes autores também encontraram neurodegeneração 15 dias após o insulto inicial. Em adição, já foi detectada morte neuronal 3 meses após SE induzido por PILO e lítio (KUBOVA et al., 2002).

Uma análise da cinética de neurodegeneração foi feita neste estudo, nos tempos 24 horas e 15 dias (Figura 32). Em SAL+PILO, percebemos que a quantidade de neurônios FJ+ diminuiu no giro dentado e aumentou em CA1, mantendo-se inalterado no hilus e em CA3. Castro et al. (2011), também em um modelo H-PILO, analisaram perda neuronal em subáreas

hipocampais nos tempos 12, 24 e 168 horas (7 dias). Estes autores mostraram que no hilus a perda neuronal é diminuída em 168 horas em relação a 12 horas, porém quando analisado 24 e 168 horas não teve nenhuma diferença. Enquanto em CA3, apresentaram um aumento desta perda em 24 horas quando comparado a 12 horas, mas entre os tempos 24 e 168 horas nenhuma diferença foi encontrada. De maneira similar, quando analisamos 24 horas e 15 dias não foi apresentada alteração, tanto no hilus quanto em CA3, o que possivelmente aconteceria se Castro et al. (2011) tivessem analisado este último tempo. Neste mesmo estudo, foi visto um aumento neurônios FJ+ em 168 horas em relação a ambos os tempos 12 e 24 horas. Nossos dados também corroboraram a este resultado, uma vez que 15 dias após o SE o número de FJ+ foi superior a 24 horas. Além disso, no giro dentado notamos uma diminuição da perda neuronal após 15 dias do SE quando comparado a 24 horas, o que pode estar diretamente relacionado às proteínas tamponantes de cálcio.

Sabe-se que o neurotransmissor glutamato é responsável por elevar a concentração intracelular de íons cálcio, por meio da estimulação direta de receptores ionotrópicos – NMDA (*N-methyl-D-aspartate*) e AMPA (*3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate acid*) – ou indireta por canais de cálcio voltagem-dependentes. Em condições normais, a concentração deste íon aumenta momentaneamente para desempenhar uma função comum do neurônio, como na deflagração do potencial de ação, sem causar danos à célula. No entanto, em situações patológicas, a capacidade que os neurônios possuem em controlar a fluxo e a concentração do cálcio é alterada, comprometendo a homeostase deste íon na célula (MATTSON, 2007). A elevação do nível de cálcio citoplasmático proporciona o aumento de cálcio mitocondrial, o que compromete a cadeia respiratória e desencadeia a formação de espécies reativas de oxigênio, podendo danificar diversos componentes celulares, como lipídios, proteínas e DNA (COCK et al., 2002). No caso das crises epiléticas, ocorre inicialmente uma estimulação colinérgica elevada que desencadeia a ativação excessiva do receptor glutamatérgico NMDA, que por sua vez aumenta o influxo de cálcio, o que pode levar a uma cascata de eventos moleculares, incluindo hiperexcitabilidade e excitotoxicidade, o que desencadearia a morte neuronal (MCNAMARA, 1994; SHIH; MCDONOUGH, 1997), principalmente necrose (NIQUET; LIU; WASTERLAIN, 2005).

A morte neuronal é mais evidente após crises límbicas prolongadas – com automatismo fácil, mioclonia de pescoço e membros anteriores, elevação e queda, crises tonico-clônicas – que após crises atípicas ou de baixa gravidade – com automatismo fácil, mioclonia de pescoço e comportamento ambulatório concomitantes (MOHAPEL; EKDAHL; LINDVALL, 2004; TILELLI et al., 2005). Neurônios FJ+ são encontrados principalmente

após crises prolongadas como é observado em SE (SCHMUED et al., 1997). Por este motivo, os nossos animais foram mantidos em SE por 90 minutos, visto que as crises são longas o suficiente para induzir neurodegeneração.

Assim, o presente trabalho estende os achados na literatura mostrando que o bloqueio de SGLTs pela florizina proporciona o aumento da perda neuronal nas regiões do giro dentado (Figura 26E), hilus (Figura 26F), CA3 (Figura 27E) e CA1 (Figura 28E), após 24 horas do insulto inicial. Sabe-se que a proteína SGLT1 é expressa nas células granulares do giro dentado e nas células piramidais das subáreas CA3 e CA1 (YU et al., 2013). Embora estes autores não tenham notificado imunomarcagem desta proteína nos interneurônios do hilus do giro dentado, suas fotomicrografias indicam que o SGLT1 também está presente nesta região. Como este cotransportador se encontra expresso nestas 4 regiões, a elevação da morte neuronal pode estar diretamente ligada a inibição desta proteína. Vale ressaltar, como mencionado anteriormente, que alguns autores indicaram que SGLTs podem ser importantes para a sobrevivência do neurônio em casos patológicos que estejam associados a um déficit metabólico, como ocorre com as crises epiléticas (POPPE et al., 1997; YU et al., 2010; YU et al., 2013).

Além disso, depois dos 15 dias de SE, a morte neuronal foi diminuída apenas na região CA1 (Figura 31E), enquanto as subáreas do giro dentado (Figura 29E), hilus (Figura 29F) e CA3 (Figura 30E) mantiveram-se inalteradas. Quando foi analisada a cinética de neurodegeneração em FLO+PILO, percebeu-se uma diminuição no número de células FJ+ no giro dentado e no hilus, enquanto em CA3 e CA1 não foi notada nenhuma alteração (Figura 32). Este padrão de diminuição pode ser explicado pela desinibição de SGLTs. Possivelmente, após 15 dias a florizina não esteja mais acoplada a este cotransportador, o que poderia justificar os resultados encontrados.

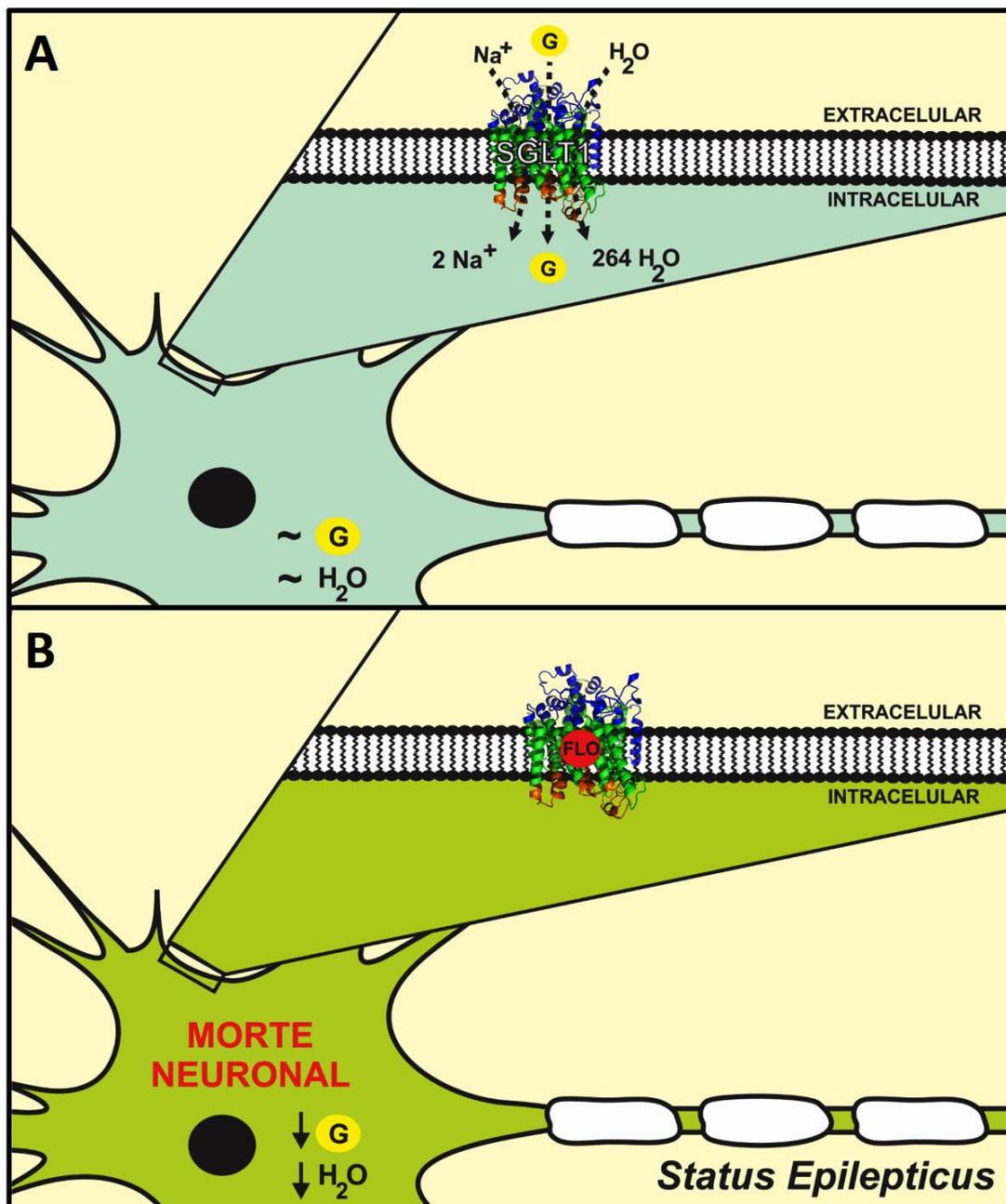
6.4 Associação do comportamento e da neurodegeneração

Os achados comportamentais, envolvendo o aumento do WDS e o indicativo de gravidade das crises, corroboram os resultados encontrados quanto à neurodegeneração. Após o bloqueio de SGLTs com florizina e subsequente indução do SE com H-PILO, inicialmente, há possivelmente uma tentativa do sistema nervoso central de controlar as crises motoras, como sugere RODRIGUES et al. (2005), refletida na elevação do WDS. Embora esta tentativa de controle central tenha acontecido, ainda assim o SE foi deflagrado e crises graves

foram desencadeadas. Conseqüentemente, o aumento da gravidade das crises proporcionou mais danos centrais, visualizados na elevação da morte neuronal após 24h do insulto inicial.

Em resumo, a figura 32 ilustra uma célula em situação basal e outra em processo de neurodegeneração após bloqueio do SGLT1 e SE.

FIGURA 32. Modelo ilustrando o funcionamento do SGLT1 em um neurônio saudável (A) e a sua inibição por florizina durante o SE (B) aumentando processos neurodegenerativos



Fonte: Autor, 2015

7 CONCLUSÃO

O conjunto dos resultados do presente trabalho mostra pela primeira vez que a inibição de SGLT1 e SGLT2 por florizina promove o aumento de alterações comportamentais e histoquímicas em modelo de epilepsia do lobo temporal induzido por pilocarpina. Acredita-se que a elevação do número de WDS é um mecanismo central de controlar as crises, indicando um aumento da gravidade das crises. De fato, a administração intra-hipocampal de florizina foi capaz de agravar as crises límbicas. Isto foi associado com o aumento da morte neuronal em diversas subáreas do hipocampo 24 horas após o SE e com redução da morte neuronal apenas na região de CA1 15 dias depois do SE.

Juntos estes dados suportam a ideia que o SGLT1 exerce papel importante durante o SE, possivelmente garantindo a sobrevivência das células neurais que estão sob estresse metabólico durante as crises. Logo, sugerimos fortemente que os SGLTs participam da modulação de processos epileptogênicos. Acreditamos que este trabalho abre perspectivas para uma nova estratégia terapêutica para diminuição do processo de morte neuronal na epilepsia por meio do aumento da expressão do SGLT1 hipocampal.

REFERÊNCIAS

ADAMI, R; SCESA G; BOTTAI, D. Stem cell transplantation in neurological diseases: improving effectiveness in animal models. **Front Cell Dev Biol.**, v. 2, n. 17, 2014

AMARAL, D.G.; WITTER, M.P. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. **Neuroscience**, v. 3, n. 3, p. 571-91, 1989.

ANDRES-MACH, M. et al. Neurogenesis in the epileptic brain: a brief overview from temporal lobe epilepsy. **Pharmacological Reports**, v. 63, p. 1316-1323, 2011.

BADAWY, R.A.B.; HARVEY, A.S.; MACDONELL, R.A.L. Cortical hyperexcitability and epileptogenesis: Understanding the mechanisms of epilepsy – Part 1. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 16, p. 355–365, 2009.

BAE, E.K. et al. Neuropathologic and Clinical Features of Human Medial Temporal Lobe Epilepsy. **J Clin Neurol.**, v. 6, p. 73-80, 2010.

BAIMBRIDGE, K.G.; MILLER, J. J. Immunohistochemical localization of calcium-binding protein in the cerebellum, hippocampal formation and olfactory bulb of the rat. **Brain Res.**, v. 245, p. 223 – 229, 1982.

BALEN, D. et al. Revised immunolocalization of the Na⁺-D-glucose cotransporter SGLT1 in rat organs with an improved antibody. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 295, p. C475–C489, 2008.

BAULAC, M.; PITKANEN, A. Research priorities in epilepsy for the next decade – a representative view of the european scientific community. **Epilepsia**, v. 50, p. 571–578, 2009.

BERG, A.T. et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005–2009. **Epilepsia**, n. 51(4), p. 676–685, 2010.

BERNARD, C. et al. Interneurons are not so dormant in temporal lobe epilepsy: a critical reappraisal of the dormant basket cell hypothesis. **Epilepsy Res.**, v. 32, p. 93-103, 1998.

BRENNER, C.; MERRIT, H.H. Effects of certain derivatives on electrical activity of the cortex. **Arch Neurol Psychiatr**, v. 48, p. 382-395, 1942.

CARDENAS-RODRIGUEZ, N. et al. Role of oxidative stress in refractory epilepsy: evidence in patients and experimental models. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 1, p. 1455–1476, 2013.

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

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 pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. **Epilepsia**, v. 32, p. 778–82, 1991.
- CAVALHEIRO, E.A. The pilocarpine model of epilepsy. **Ital J Neuro Sci**, n. 16, p. 33–37, 1995.
- CAVAZOS, J. E.; JONES, S. M.; CROSS, D. J. Sprouting and synaptic reorganization in the subiculum and CA1 region of the hippocampus in acute and chronic models of partial-onset epilepsy. **Neuroscience**, n. 126, p. 677–88, 2004.
- COCK, H. R. et al. Mitochondrial dysfunction associated with neuronal death following status epilepticus in rat. **Epilepsy Res.**, v. 48, p. 157-168, 2002.
- COLLINS, R. C.; TEARSE, R. G.; LOTHMAN, E. W. Functional anatomy of limbic seizures: focal discharges from medial entorhinal cortex in rat. **Brain Research**, v. 280, p. 25-40, 1983.
- COVOLAN, L.; MELLO, L.E. Assessment of the progressive nature of cell damage in the pilocarpine model of epilepsy. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, p. 915-924, 2006.
- CROISSET, G; DE WIED, D. ACTH: a structure-activity study on pilocarpine-induced epilepsy. **Eur J Pharmacol**, n. 229, p. 211–6, 1992.
- CURIA, G. et al. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. **J Neurosci Methods.**, n. 172, p. 143–157, 2008.
- DAGCI, T. et al. The effect of octreotide on kainate-induced wet dog shakes and seizure activity in male and female rats. **Int J Neurosci**, v. 112, p. 829–39, 2002.
- DAMIANO, B. P.; CONNOR, J. D. Hippocampal mediation of shaking behavior induced by electrical stimulation of the perforant path in the rat. **Brain Res.**, v.308, p. 383-386, 1984.
- EHRENKRANZ, J.R. et al. Phlorizin: a review. **Diabetes Metab Res Rev.**, v. 21, p. 31–38, 2005.
- 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**, n. 46, p. 470–472, 2005.
- FISHER, R.S. et al. A practical clinical definition of epilepsy. **Epilepsia**, n. 55(4), p. 475–482, 2014.
- FREUND, T.F.; BUZSAKI, G. Interneurons of the hippocampus. **Hippocampus**, v. 6, p. 347-470, 1996.
- FURTADO, M.A. et al. Behavioral, morphologic, and electroencephalographic evaluation of seizures induced by intrahippocampal microinjection of pilocarpine. **Epilepsia**, v. 43 Suppl 5, p. 37-39, 2002.

FURTADO, M.A. et al. Study of spontaneous recurrent seizures and morphological alterations after status epilepticus induced by intrahippocampal injection of pilocarpine. **Epilepsy & Behavior**, v. 20, p. 257–266, 2011.

GARDINER, M. Genetics of idiopathic generalized epilepsies. **Epilepsia**, v. 46(Suppl 9), p. 15–20, 2005.

GRAAF, R. A. et al. Regional glucose metabolism glutamatergic neurotransmission rat in vivo,” **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 34, p. 12700–12705, 2004.

GRIMES, L. et al. Dentate granule cells are essential for kainic acid-induced wet dog shakes but not for seizures. **J Neurosci**, v. 8, p. 256–64, 1988.

HAMILTON, S.E. et al. Disruption of the m1 receptor gene ablates muscarinic receptor-dependent M current regulation and seizure activity in mice. **Proc Natl Acad Sci USA**, n. 94, p. 13311–6, 1997.

HARADA, S. et al. Neuroprotective effect through the cerebral sodium –glucose transporter on the development of ischemic damage in global ischemia. **Brain Research**, v. 1541, p. 61–68, 2013.

JURCOVICOVA, J. Glucose transport in brain - effect of inflammation. **Endocr Regul.**, v. 48, n. 1, p. 35–48, 2014

KANDRATAVICIUS, L. et al. Animal models of epilepsy: use and limitation. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, n. 10, p. 1693–1705, 2014.

KLEPPER, J.; VOIT, T. Facilitated glucose transporter protein type 1 (GLUT1) deficiency syndrome: impaired glucose transport into brain– a review. **Eur J Pediatr**, n. 161, p. 295–304, 2002.

KUBOVÁ, H. et al. Dynamic changes of status epilepticus-induced neuronal degeneration in the mediodorsal nucleus of the thalamus during postnatal development of the rat. **Epilepsia**, v. 43, s. 5, p. 54 – 60, 2002

LE GAL LA SALLE, G.; CAVALHEIRO, E.A. Stimulation of septal and amygdaloid nuclei: EEG and behavioral responses during early development of kindling with special reference to wet dog shakes. **Exp Neurol**, n. 74, p. 717–27, 1981.

LEE, P. H. K.; HONG, J. S. Ventral hippocampal dentate granule cell lesions enhance motor seizures but reduce wet dog shakes induced by mu-opioid receptor agonist. **Neuroscience**, v. 35, p. 71–7, 1990.

LEITE, J.P.; BORTOLOTTI, Z.A.; CAVALHEIRO, E.A. Spontaneous recurrent seizures in rats: an experimental model of partial epilepsy. **Neurosci. Biobehav.Rev.**, v. 14, p. 511–517, 1990.

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

LIANG, L. P.; HO, Y. S.; PATEL, M. Mitochondrial superoxide production in kainate-induced hippocampal damage. **Neuroscience**, v. 101, n.3, p. 563–570, 2000.

LIEFFERINGE, J.V. et al. Are vesicular neurotransmitter transporters potential treatment targets for temporal lobe epilepsy? **Front Cell Neurosci.**, v.7:139, 2013.

LOTHMAN, E. W.; COLLINS R. C. Kainic acid induced limbic seizures: metabolic, behavioral, electroencephalographic and neuropathological correlates. **Brain Res.**, v. 218, p. 299-318, 1981.

LOTHMAN, E.W., BERTRAM, E.H., III & STRINGER, J.L. Functional anatomy of hippocampal seizures. **Prog. Neurobiol.**, v. 37, p. 1-82, 1991.

MANOLESCU, A.R. et al. Facilitated hexose transporters: new perspectives on form and function. **Physiology (Bethesda)**, v.22:234-40, 2007.

MAO, L.; FRANKE, J. Hormesis in aging and neurodegeneration—a prodigy awaiting dissection. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 7, p. 13109–13128, 2013.

MATTSON, M. P. Calcium and neurodegeneration. **Aging Cell**, v. 6, p. 337-350, 2007.

MCNAMARA, J. O. Cellular and molecular basis of epilepsy. **J. Neurosci.**, v. 14, p. 3413–3425, 1994.

MEIDENBAUER, J.J.; ROBERTS, M.F. Reduced glucose utilization underlies seizure protection with dietary therapy in epileptic EL mice. **Epilepsy Behav.** n. 39, p. 48–54, 2014.

MILLAN, H.M.; CHAPMAN, A.G.; MELDRUM, B.S. Extracellular amino acid levels in hippocampus during pilocarpine-induced seizures. **Epilepsy Res**, n. 14, p. 139–48, 1993.

MOHAPEL, P.; EKDAHL, C.T.; LINDVALL, O. Status epilepticus severity influences the long-term outcome of neurogenesis in the adult dentate gyrus. **Neurobiology of Disease**, v. 15, p. 196–205, 2004.

NIQUET, J.; LIU, H.; WASTERLAIN, C. G. Programmed neuronal necrosis and status epilepticus. **Epilepsia**, v. 46, suppl. 5, p. 43–8, 2005.

O'DELL, C.M.; et al. Understanding the basic mechanisms underlying seizures in mesial temporal lobe epilepsy and possible therapeutic targets: a review. **J.Neurosci. Res.**, v. 90; p. 913–924, 2012.

OWEN, O.E. et al. Brain metabolism during fasting. **J Clin Invest**, n. 46, p. 1589–95, 1967.

PANAYOTOVA-HEIERMANN, M.; LOO, D.D.; WRIGHT, E.M. Kinetics of steady-state currents and charge movements associated with the rat Na⁺/glucose cotransporter. **Journal of Biological Chemistry**. v. 270, n. 45, p. 99-105, 1995.

PATEL, A. B. et al. Glutamatergic neurotransmission and neuronal glucose oxidation are coupled during intense neuronal activation. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 24, n. 9, p. 972–985, 2004.

PATEL, M. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress: cause and consequence of epileptic seizures. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, n. 12, p. 1951–1962, 2004.

PAXINOS G., WATSON C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinate, Compact Third Edition. New York: **Academic Press**, 1996.

PIERSON, M.; LIEBMANN, S.L. Noise exposure-induced audiogenic seizure susceptibility in Sprague-Dawley rats. **Epilepsy Res.**, v. 13, n. 1, p. 35-42, 1992.

PITKANEN, A.; LUKASIUK, K. Molecular and cellular basis of epileptogenesis in symptomatic epilepsy. **Epilepsy Behav**, n. 14 Suppl 1, p. 16–25, 2009.

POIRIER, J.L.; CAPEK, R.; DE, K.Y. Differential progression of Dark Neuron and Fluoro-Jade labelling in the rat hippocampus following pilocarpine-induced status epilepticus. **Neuroscience**, v. 97, p. 59–68, 2000.

POPPE, R. et al. Expression of the Na⁺-D-Glucose Cotransporter SGLT1 in Neurons. **J. Neurochem.**, n. 69, p. 84-94, 1997.

PUTTACHARY, S. et al. Seizure-Induced Oxidative Stress in Temporal Lobe Epilepsy. **BioMed Research International**, v.2015, p. 1-20, 2015.

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

RAJMOHAN, V.; MOHANDAS, E. The limbic system. **Indian J Psychiatry**. v.49, n. 2, p. 132–139, 2007

RAO, M.S. et al. Hippocampal neurodegeneration, spontaneous seizures, and mossy fiber sprouting in the F344 rat model of temporal lobe epilepsy. **Journal of Neuroscience Research**, v.83, n.6, p. 1088–1105, 2006.

RODRIGUES, M.C.A. et al. Correlation between shaking behaviors and seizure severity in five animal models of convulsive seizures. **Epilepsy & Behavior**, n. 6, p. 328–336, 2005.

RONDOUIN, G; LERNERNATOLI, M; HASHIZUME, A. Wet dog shakes in limbic versus generalized seizures. **Exp Neurol**, n. 95, 500–5, 1987.

SABINO-SILVA, R., et al. The Na(+)/glucose cotransporters: from genes to therapy. **Braz J Med Biol Res.**, v. 43(11), p.1019-26, 2010

SANDER, J.W. The epidemiology of epilepsy revisited. **Curr Opin Neurol**, n. 16, p. 165-170, 2003.

SCHMUED, L.C. et al. Fluoro-Jade: a novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration. **Brain Res**, n. 751, p. 37-46, 1997.

SELIG, D.K.; MALENKA, R.C. Extracellular field potential recording in brain slices. **AxoBits**, n. 20, p. 7-10, 1997.

SHARMA, A.K.; et al. Mesial temporal lobe epilepsy: pathogenesis, induced rodent models and lesions. **Toxicol Pathol**, v. 35, p. 984–999, 2007.

SHIH, T. M.; MCDONOUGH, JR. J. H. Neurochemical mechanisms in soma n-induced seizures. **J Appl Toxicol**, v. 17, p. 255 – 64, 1997.

SIESJÖ, B.K. Brain energy metabolism and catecholaminergic activity in hypoxia, hypercapnia and ischemia. **J Neural Transm Suppl.** (14), p.17-22, 1978.

SILVER, J.; MILLER, J.H. Regeneration beyond the glial scar. *Nat. Rev. Neurosci*, v. 5, n. 2, 146-156, 2004.

SLOVITER, R.S. Status Epilepticus-induced Neuronal Injury and Network Reorganization. **Epilepsia**, n. 4^o (Suppl.1), p. S34-S39, 1999.

SOKOLOFF, L. Relationships among local functional activity, energy metabolism, and blood flow in the central nervous system. **Fed Proc**, v. 40, p. 2311–6, 1981.

SPIERS, H.J. Hippocampal Formation. In: V.S. Ramachandran (ed.) **The Encyclopedia of Human Behavior**, v. 2, p. 297-304, 2012.

TAKATA, K. et al. Immunohistochemical localization of Na-dependent glucose transporter in rat jejunum. **Cell Tissue Res**, n. 267, p. 3–9, 1992.

THOM, M. Hippocampal sclerosis in epilepsy: a neuropathology review. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 40, p. 420–543, 2014.

TILELLI, C. Q. et al. Different types of status epilepticus lead to different levels of brain damage in rats. **Epilepsy Behav**, v. 7, p. 401 – 10, 2005.

TSACOPOULOS, M.; MAGISTRETTI, P.J. Metabolic coupling between glia and neurons. **J. Neuro. Sci.**, n. 16, p. 877-885, 1996.

TURSKI, W. A. et. al. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioral, electroencephalographic and neuropathological study. **Behav Brain Res**, n. 9, p. 315–35, 1983.

TURSKI, W.A. et al. Seizures Produced by Pilocarpine in Mice: A Behavioral, Electroencephalographic and Morphological Analysis. **Brain Res.**, n. 321, p. 237–253, 1984.

VANNUCCI, S.J. et al. Glucose transport in developing rat brain: glucose transporter proteins, rate constants and cerebral glucose utilization. **Mol Cell Biochem**, v. 140, p. 177–84, 1994.

WATSON, R. E.; EDINGER, H. M.; SIEGEL, A. A [14C]2-deoxyglucose analysis of the functional neural pathways of the limbic forebrain in the rat. III. The hippocampal formation. **Brain Res. Rev.**, v. 5, p. 133-176, 1983.

WRIGHT, E.M.; TURK, E. The sodium/glucose cotransport family SLC5. **Pflügers Arch**, n. 447, p. 510–518, 2004.

WRIGHT, E.M; LOO, D.D.F.; HIRAYAMA, B.A. Biology of Human Sodium Glucose Transporters. **Physiol Rev**, v. 91, p. 733–794, 2011.

YAMAZAKI, Y.; HARADA, S.; TOKUYAMA, S. Post-ischemic hyperglycemia exacerbates the development of cerebral ischemic neuronal damage through the cerebral sodium-glucose transporter. **Brain Research**, v. 1489, p. 113-120, 2012.

YU, A.S. et al. Functional expression of SGLTs in rat brain. **Am J Physiol Cell Physiol**, n. 299, p. C1277–C1284, 2010.

YU, A.S. et al. Regional distribution of SGLT activity in rat brain in vivo. **Am J Physiol Cell Physiol**, n. 304, p. C240–C247, 2013.

ZHAO, F.Q; KEATING, A.F. Functional properties and genomics of glucose transporters. **Curr Genomics**. v. 8, p.113-128, 2007.

ZEUTHEN, T. Molecular water pumps. **Rev Physiol Biochem Pharmacol**. v.141, p. 97-151, 2000.

ANEXOS

Anexo 1. Comitê de Ética em Experimentação Animal

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

PARECER CONSUBSTANCIADO

PROJETO N° 010/2014

TÍTULO: Análise funcional do cotransportador de sódio/glicose 1 (SGLT1) na plasticidade cerebral após *status epilepticus* induzido por microinjeção hipocampal de pilocarpina.

RESPONSÁVEL / PESQUISADOR: Olagide Wagner de Castro

OBJETIVO: Quantificar e analisar o papel funcional do cotransportador de sódio/glicose 1 (SGLT1) em processos neuroplásticos como: neurodegeneração e neurogênese após SE em modelo de epilepsia do lobo temporal (ELT)

JUSTIFICATIVA (APROVAÇÃO, PENDÊNCIA, NEGAÇÃO):

A pesquisa proposta é de relevada importância científica apresentando justificativas plausíveis para a utilização de animais. O projeto resubmetido atendeu a todas as solicitações do parecer consubstanciado.

SITUAÇÃO: APROVADO

PERÍODO DE VIGÊNCIA: 17-09-2014 a 17-09-2016

DADOS DO ANIMAL:

ESPÉCIE	LINHAGEM	QUANTIDADE
Rato heterogênico	<i>Wistar</i>	92

Maceió, 19 de setembro de 2014,



Prof. Dr. Silvana Ayres Martins
Coordenadora da CEUA/UFAL

Prof. Dra. Silvana Ayres Martins
Coordenadora da Comissão de
Ética no uso de Animais
SIAPE 1120060

Anexo 2. Artigo submetido para publicação na revista *Epilepsy & Behavior*

1 **Inhibition of SGLT following *Status Epilepticus* induced by**
2 **intrahippocampal pilocarpine affects neurodegeneration process in**
3 **hippocampus**

4 Melo IS¹, Santos YMO¹, Costa MA¹, Pacheco ALD¹, Silva NKGT¹, Duzzioni M¹, Gitaí
5 DLG¹, Tilelli, CQ³, Sabino-Silva R^{1,2,*}, Castro OW^{1,*}.

6

7 ¹Institute of Biological Sciences and Health, Federal University of Alagoas (UFAL), Maceio,
8 AL, Brazil.

9 ²Department of Physiology, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of
10 Uberlandia (UFU), Uberlândia, MG, Brazil.

11 ³Campus Centro-Oeste Dona Lindu, Federal University of São João del Rei (UFSJ),
12 Divinópolis, MG, Brazil.

13

14 *Author's correspondence:

15 Olagide Wagner de Castro & Robinson Sabino-Silva

16 Institute of Biological Sciences and Health, Federal University of Alagoas (UFAL),

17 Av. Lourival de Melo Mota, km 14, Campus A. C. Simões, Cidade Universitária, Maceió/AL,

18 CEP 57072-970

19 Phone: +55 82 3214 1002

20 e-mail: olagidewww@gmail.com & robinsonsabino@gmail.com

21

22 ABSTRACT

23 Temporal Lobe Epilepsy (TLE) is characterized by spontaneous recurrent seizures, starting
24 from secondary functional disorders due to several insults, including self-sustaining
25 continuous seizures identified as *Status Epilepticus* (SE). Although hypoglycemia has been
26 associated with SE, the effect of inhibition of the Na⁺/glucose cotransporters (SGLT) on
27 hippocampus during SE was unknown. Here we evaluated the functional role of SGLT in the
28 pattern of limbic seizures and neurodegeneration process after PILO-induced SE. Vehicle
29 (VEH, 1μL) or phlorizin, a specific SGLT inhibitor (PZN, 1μL, 50μg/μL), were administered
30 in the hippocampus of rats 30 minutes before PILO-induced SE (VEH+PILO or PZN+PILO,
31 respectively). The limbic seizures were classified using the Racine's scale and the amount of
32 Wet Dog Shakes (WDS) was quantified before and during SE. Neurodegeneration process
33 was evaluated by Fluoro-Jade (FJ) and FJ positive neurons (FJ+) were counted 24 h and 15
34 days after SE. PZN-treated rats showed higher (p<0.05) number of WDS when compared to
35 VEH+PILO. The seizure severity was not significant between PZN+PILO and VEH+PILO
36 groups. However, the pattern of limbic seizures significantly changed in PZN+PILO. Indeed
37 the class 5 seizures repeated itself more times (p<0.05) than the other classes in PZN group at
38 50 min after SE induction. PZN+PILO animals had a higher (p<0.05) number of FJ+ in the
39 dentate gyrus (DG), hilus, CA3 and CA1 of hippocampus when compared with VEH+PILO.
40 PZN+PILO animals had a decreased number (p<0.05) of FJ+ in CA1 compared to
41 VEH+PILO 15 days after SE induction. Taken together, our data suggest that SGLT
42 inhibition with PZN increased the severity of limbic seizures SE and increased
43 neurodegeneration in hippocampus 24h after SE, suggesting that SGLT1 and SGLT2 could
44 participate in the modulation of earlier stage of epileptogenic processes.

45 **KEYWORDS:** SGLT1, SGLT2, Phlorizin, Hippocampus, Neurodegeneration, *Status*
46 *Epilepticus*

47

48 **1. INTRODUCTION**

49 Temporal Lobe Epilepsy (TLE) is the most common type of epilepsy, which is
50 characterized by a chronic neuronal hyperexcitability and hypersynchrony state that is
51 manifested through recurrent and complex partial seizures, which origin in mesial temporal
52 lobe [1,2]. Generally, in TLE the epileptogenic process is initiated by a cerebral insult, which
53 may be a trauma, infection, stroke, febrile seizures or *Status Epilepticus* (SE) [2]. After
54 epileptogenic insult, a cascade of cellular events is initiated, and neurobiological,
55 morphological, biochemical and electrophysiological changes occur. Such events happen
56 during the latency period, ranging from 5-10 years in humans and days-weeks in animal
57 models [1,3]. These changes are neuroplastic arrangements in brain that are supposed to give
58 basis to epileptogenesis.

59 The processes mentioned above can lead to the alteration of a working neuronal
60 network into a hyperexcitable network, converting a normal brain into an "epileptic brain"
61 that is able to generate spontaneous recurrent seizures (SRS) [4]. Among the morphological
62 alterations typically seen during epileptogenesis are described neurodegeneration,
63 neurogenesis, mossy fiber sprouting, dendritic remodeling, gliosis, invasion of inflammatory
64 cells, angiogenesis and changes in extracellular matrix, gene expression reorganization and
65 acquired channelopathies have also been observed [1,3–6].

66 Systemic (S-PILO) or intrahippocampal administration of pilocarpine (H-PILO) in
67 rodents leads to a repeated pattern of SE, which may last for many hours [7–12]. Afterwards,
68 SE results in a variable latent period that precedes a chronic stage that is characterized by
69 occurrence of SRS. It has been reported that after H-PILO animals presented facial
70 movements, hypersalivation, motor seizures, as well as wet dog shake (WDS), that has
71 associated to expression of a central strategy of seizure control [13,14]. The motor seizures

72 include head and neck myoclonus, forelimb myoclonus, rearing and falling, as traditionally
73 described for several rodent epilepsy models [15].

74 Neuropathological changes, such as neuronal loss in hippocampal subfields, are also
75 observed [7,9–11]. Neurodegeneration pattern after SE induced by H-PILO is region and time
76 dependent. For example, fluorojade positive (FJ+) neurons, that are considered to be in a
77 degeneration process, were observed in several time-windows after SE, when hippocampus
78 was evaluated, including in the hilus of the dentate gyrus, CA1 and CA3 areas [9].
79 Additionally, the pattern of presentation of such marker among the different hippocampal
80 areas changed over time [9]. Poirier et al. (2000) showed that the best time to detect
81 neurodegeneration with FJ was 24 h after SE, although these authors also found
82 neurodegeneration after 15 days of the initial insult.

83 SGLTs are transporters belonging to the *SLC5A* gene family, which harness the
84 gradient of sodium ions across the plasma membrane to drive glucose and galactose into cells
85 [17,18]. The most studied members are SGLT1 and SGLT2, which are involved in glucose
86 transport in specialized regions of the brain [19,20]. Besides the two Na⁺ ions plus the one
87 glucose molecule, the SGLT1 protein is also able to transport about 264 H₂O molecules [21].
88 Since the pioneering studies, it has been established that SGLT1 is expressed in many brain
89 areas, include the CA1, CA3 and dentate gyrus subfields of the hippocampus [19,20,22].
90 SGLT2 protein has been observed in hippocampus and cerebellum. The functional assays in
91 rat brain slices suggest that SGLT2 accounts for 20% of the total methyl-4-[F-18] fluoro-4-
92 deoxy-D-glucopyranoside (Me-4FDG), a highly specific SGLT substrate [20]. The epileptic
93 focus induced by applying penicillin in the frontal cortex promotes increase in brain uptake of
94 [¹⁴C] AMG, an isotope-labeled SGLT substrate [22]. The administration of 2-deoxy-d-glucose
95 (2-DG), a glucose analog that is not metabolized by glycolysis, producing dramatic protection
96 against hippocampal damage [23]. Additionally was demonstrated that reduced glucose

97 utilization can lead to seizures protection with long-term calorie restriction, however the
98 action mechanisms remains unclear [24]. Both SGLT1 and SGLT2 are specifically inhibited
99 by phlorizin (PZN) [21], however, the effects of dual SGLT inhibitors in rat brain under
100 epileptic conditions are unknown.

101 The purpose of this study was to investigate the effects of hippocampal SGLT
102 inhibition, reducing the glucose utilization in epileptogenesis. In order to achieve this aim we
103 quantified the number of WDS before and during SE induced by H-PILO, in the presence of
104 PZN. Furthermore, we evaluated severity and evolution of seizures during SE. Finally, we
105 analyzed the pattern of neurodegeneration in hippocampal regions at 24 h and 15 days after
106 SE in the H-PILO model, in order to verify the regional distribution of the neurodegeneration
107 process.

108

109 **2 Material and methods**

110 *2.1 Animals*

111 Experiments were conducted in Wistar male rats (*Rattus norvegicus* [n= 63, 240-340g,
112 2-3 months]) from the main breeding stock of the Federal University of Alagoas. They were
113 maintained on a 12h/12h light/dark cycle at $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$, with lights on at 07:00 AM and lights
114 off at 07:00 PM. Animals were individually housed in plastic cages with food and water *ad*
115 *libitum*. All experiments were designed to minimize animal suffering and to limit the number
116 of animals used. All experimental procedures were conducted in strict accordance with the
117 guidelines set by Animal Research: Reporting of *In Vivo* Experiments (ARRIVE) and were
118 approved by the Ethical Committee of the Federal University of Alagoas (Permit Number:
119 010/2014). All the animals were submitted to anesthesia/euthanasia procedures under sodium
120 thiopental, and all efforts were made to minimize animal suffering.

121 The rats were divided into 4 experimental groups: VEH+VEH (n=12), PZN+VEH
122 (n=12), VEH+PILO (n=17) and PZN+PILO (n=22). The animals were euthanized at 24h or
123 15 days after SE.

124 The research staff monitored rats at least 2 times per day for signs of illness or
125 impairment by observing the general body condition, respiration rate, dehydration, posture,
126 immobility, social interaction and response to manipulation. For the animals submitted to SE,
127 monitoring the health was carried out for 2 hours/day until the complete post-ictal recovery
128 (about 2 days after SE; note that H-PILO model allows rapid recovery and a higher rate of
129 survival [9]). During this period, the animals were treated with electrolyte and nutrient
130 replacement (i.p. injection of saline 0.9%; and by feeding animals with pasty food). No
131 animals presented clinical/behavior signal of pain or unexpected distress, used as humane
132 endpoint criteria for euthanasia.

133 *2.2 Surgical procedure*

134 Animals were anesthetized with thiopental sodium (40 mg/kg, i.p [Cristália®]) and
135 received 0.1 mL/100g veterinary pentabiotic (Fort Dodge®, subcutaneous) before the surgery.
136 After fixing on stereotaxic, animals received local anesthetic (lidocaine with epinephrine,
137 subcutaneous [Astra®]). Cannula was implanted stereotaxically in the hilus of the dentate
138 gyrus (DG) according to following coordinates: - 6.30 mm anterior-posterior (AP, reference:
139 bregma); 4.50 mm medial-lateral (ML, reference: sagittal sinus); - 4,50 mm dorso-ventral
140 (DV, reference: dura mater) [7,9,25].

141 The confirmation of the cannula placement into the DG was verified visually at the
142 end of the experiments by hematoxylin and eosin (H&E). Only animals with the cannula
143 exactly into the hilus of DG were considered in the analysis.

144

145 *2.3 Intrahippocampal microinjections*

146

147 Animals were gently immobilized to microinject drugs. Each animal received 1 μ L of
148 PZN (50 μ g/1 μ L) or vehicle (VEH; saline 0.9%) in the left hilus of the dentate gyrus (DG) 30
149 minutes before administration of 1 μ L pilocarpine (PILO; 1.2mg/ μ L) to evoke limbic seizures
150 (VEH+PILO or PZN+PILO) or administration of 1 μ L vehicle (VEH+VEH or VEH+PZN).
151 We used a 5 μ L syringe (Hamilton Company, Reno, NV, USA) connected to a microinjection
152 pump (Harvard Apparatus PHD 2000, Holliston, MA, USA) at a speed of 0.5 μ l/min. All
153 animals that develop SE were rescued with diazepam (5 mg/kg; i.p.) after 90 minutes of SE
154 onset.

155

156 *2.4 Behavioral analysis*

157

158 Animals behavioral activity was recorded by video camera (Full HD Digital
159 Camcorder Sony DCR-PJ6) for a period of 90 minutes after the beginning of SE. Behavioral
160 analysis was done according to Racine's scale (1972) [26]. This analysis was performed
161 during SE, in order to study the neurophysiological changes in temporal lobe epilepsy that
162 justify the behavioral changes. This condition was maintained for a period of 90 minutes,
163 enough time to observe neurodegeneration [9]. The 90 minutes observation time was split into
164 18 windows of 5 minutes and the most severe seizure that happened with more frequency was
165 used to represent the window. The number of WDS was quantified before and during SE. To
166 examine the severity of seizures, the representative scale of each window were summed and
167 the result was divided by 18, the total amount of windows.

168

169

170

171 *2.5 Tissue sampling*

172

173 Animals were injected with an overdose of sodium thiopental at 24 hours or 15 days
174 after SE induction, and were transcardially perfused with 0.1 M phosphate-buffered saline pH
175 7.4 (PBS) and 4% paraformaldehyde solution in PBS. Afterwards, the brains were removed,
176 cryoprotected with sucrose 20%, frozen at -20 °C for 3 hours and stored at -80°C. Sections
177 were then cut (30 µm thickness) using a cryostat (Leica CM 1850) at a temperature ranging
178 from -18 to -22°C and were processed for FJ-C staining.

179

180 *2.6 FJ-C staining procedure*

181

182 Sections were subjected to successive washes of 100% ethanol for 3 minutes, 70%
183 ethanol for 1 minute, distilled water for 1 minute. Afterwards, slides were transferred to a
184 solution of 0.06% potassium permanganate for 15 minutes on a rotating platform. Slides were
185 rinsed three times for 1 minute in distilled water and were then transferred to the FJ staining
186 solution (0.0001%) for 30 minutes. After, slides were rinsed three times for 1 minute [27].
187 Finally, slides were coverslipped by *fluoromount* (EMS). The sections were examined and
188 images captured using a fluorescence microscope (Nikon DS RI1).

189

190 *2.7 Cell counting*

191

192 Fluoro-Jade positive cells were counted by using the ImageJ software (Wayne
193 Rasband; Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD,
194 USA). For the quantification of neurodegenerating cells we sampled in three different

195 coordinates of the hippocampus: CA1, CA3 and hilus of dentate gyrus, (AP -2.56 mm; AP
196 -3.30 mm and AP -6.30 mm [Paxinos 1996]), as showed by Castro et al. (2011).These
197 regions were selected because of the high sensitivity to the neurodegenerative process. All
198 cells were counted on the contralateral hippocampus because animals that received
199 microinjection of PILO developed a scar around the microinjection site.

200

201 *2.8 Statistical analysis*

202 All values are presented as mean \pm SEM. To analyze some behavioral patterns and the
203 FJ + cells we performed the unpaired t test. In addition, to determine the evolution of seizures,
204 we compared the classes of Racine's scale by one-way analysis of variance (ANOVA),
205 followed by Student-Newman-Keuls posttest (GraphPad Prism version 5.00 for Windows,
206 GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The significance level was 5% (described as P
207 <0.05).

208 **3. RESULTS**

209 *3.1 Development of SE Rate*

210

211 In VEH+PILO group, 18 of 25 (72%) animals that received microinjections of PILO
212 developed SE and one died due to severity of seizures; in PZN+PILO group, 23 of 30 (77%)
213 animals developed SE and one died also due to severity of seizures.

214 Animals that received VEH microinjections instead of pilocarpine (VEH+VEH or
215 PZN+VEH) did not develop SE, so behavioral analysis was not performed.

216

217

218

219

220 *3.2 Evaluation of latency time and Wet Dog Shake*

221

222 Immediately after microinjection of pilocarpine, animals remained without presenting
223 limbic seizures for a small interval. Regarding this latency to seizure onset (Fig. 1A), there
224 was no significant difference ($p>0.05$) between VEH+PILO group (30.6 ± 2.9 min) and
225 PZN+PILO (26.4 ± 3.6 min). WDS were considered present when the animals developed
226 intense shake of head and body. PZN+PILO animals (113.7 ± 14.5) developed a higher
227 ($p<0.05$) amount of WDS when compared to VEH+PILO (73.5 ± 9.4) as showed in Fig. 1B.
228 The VEH+VEH and PZN+VEH did not present WDS.

229

230 *3.3 Classification and temporal pattern of limbic seizures*

231

232 In VEH+PILO group, among the 17 surviving animals that developed SE, 12%
233 presented classes 2-3, 12% classes 3-4, 47% classes 4-5 and 29% classes 5-6, while in
234 PZN+PILO, among the 22 surviving animals that developed SE, 14% exhibited classes 2-3,
235 4% classes 3-4, 55% classes 4-5, 27% classes 5-6.

236 We analyzed the pattern of limbic seizures in both groups, PZN+PILO and
237 VEH+PILO, during 90 min after SE induction (Fig. 2A and 2B). In VEH+PILO, at 10 min
238 after the beginning of SE, the amount of classes 2 and 4 seizures was higher than the classes 3
239 and 5 ($p<0.05$). However, at 20 and 30 min of SE, the amount of class 2 seizures decreased,
240 and class 4 was higher than all the other classes ($p<0.05$). In contrast, no difference was
241 observed in class 5 seizures in times 50, 60 and 70 min of SE in comparison to other classes at
242 the same time intervals (Fig. 2 A).

243 Similarly, in PZN+PILO, after 10 min of SE classes 2 and 4 seizures had a higher
 244 amount than the classes 3 and 5 ($p<0.05$). Subsequently, after 30 min of SE, the number of
 245 class 2 seizures decreased and class 4 remained higher ($p<0.05$) than classes 2 and 3 (Fig.
 246 2B). Furthermore, class 5 seizures repeated themselves more times ($p<0.05$) than the other
 247 classes in PZN group at 50, 60 and 70 min after SE induction (Fig. 2B).

248 Qualitatively, analyzing Fig. 2, it is possible to observe that VEH+PILO group
 249 presented a slow progression on seizure severity along the 90 minutes of SE, while there is a
 250 peak on seizure severity 40-60 min after PILO injection in the PZN+PILO group.
 251 Nonetheless, at 90 min post PILO injection, the proportion of seizures grades 2, 3, 4 and 5 is
 252 quite similar in both groups.

253

254 *3.4 Neurodegeneration: FJ+ neurons in dentate gyrus, hilus, CA3 and CA1 regions of*
 255 *hippocampus after 24h and 15 days of SE*

256

257 As expected, there were no FJ+ cells in VEH+VEH in dentate gyrus, hilus, CA3 and
 258 CA1 regions of hippocampus (Figs. 3A, 4A, 5A, and 6A). The PZN administration in the left
 259 hilus of the dentate gyrus (PZN+VEH) also did not promote presence of FJ+ cells in all areas
 260 analyzed (Figs. 3B, 4B, 5B and 6B).

261 After 24 hours of SE, PZN+PILO animals had a higher number of FJ+ in DG
 262 (1205.0 ± 116.9) and hilus (277.3 ± 23.2) when compared of DG (693.3 ± 109.0) and hilus
 263 (141.5 ± 45.1) of VEH+PILO group (Figs. 3E-F). In CA3 region of PZN+PILO (338.0 ± 36.8),
 264 there was also an increase of FJ+ cells in relation to VEH+PILO (170.2 ± 61.1) group (Fig. 4
 265 E). Similarly, in CA1 area the number of FJ + cells was higher in PZN+PILO (400.2 ± 60.5)
 266 than VEH+PILO (221.0 ± 52.7) group (Fig. 5E). The figures (3C-D', 4C-D' and 5C-D')
 267 indicate histological representation of the data showed on the corresponding charts.

268 On the other hand, 15 days after SE, PZN+PILO animals had a decreased number
269 ($p < 0.05$) of FJ+ in CA1 (245.3 ± 45.9) compared to the same region of VEH+PILO
270 (425.8 ± 47.5) group (Figure 6E). However, no significant difference was found in dentate
271 gyrus and hilus of hippocampus (Supplementary data 1) and in CA3 region of hippocampus
272 (Supplementary data 2) when both groups were compared.

273

274 *3.5 Temporal profile of neurodegeneration in dentate gyrus, hilus, CA3 and CA1 regions of*
275 *hippocampus after 24h and 15 days of SE*

276

277 Regarding the kinetics of neurodegeneration, in VEH+PILO group the number of FJ+
278 significantly decreased in dentate gyrus after 15 days of insult (360.2 ± 56.7) when compared
279 to 24h after SE (693.3 ± 109.0). However, in CA1 region there was an increase FJ+ neurons
280 after 15 days (425.8 ± 47.5) compared to the initial time (221.0 ± 52.7). No significant
281 difference was found in the hilus (24h, 141.5 ± 45.1 ; 15d, 83.8 ± 17.3) and CA3 (24h,
282 170.2 ± 61.1 ; 15d, 235.5 ± 40.1) region between the different times (Fig. 7A).

283 In PZN+PILO, 15 days after SE there was a decrease in FJ+ cells in dentate gyrus
284 (262.3 ± 38.9) and hilus (120.3 ± 24.9) compared to the time 24h post-insult (dentate gyrus,
285 1205.0 ± 116.9 ; hilus, 277.3 ± 23.2). The CA3 (24h, 338.0 ± 36.8 ; 15d, 358.8 ± 77.9) and CA1
286 (24h, 400.2 ± 60.5 ; 15d, 245.3 ± 45.9) subfields did not show any considerable change (Fig.
287 7B).

288

289 **4. DISCUSSION**

290 Epileptic seizures are related to a set of behavioral, electrophysiological, cellular and
291 molecular changes [3,4], including changes in neuronal energy metabolism [28]. Previously, it
292 has shown that glucose uptake increases during the epileptic focus, suggesting a protective

293 role via SGLT in metabolic stress conditions [19,20,22]. The functional participation of
294 SGLT during epileptic seizure and basal conditions are unknown. Here, for the first time, we
295 investigated the impact of SGLT inhibition on epileptogenic process. In this study, we
296 evaluated both seizure behaviors and neurodegeneration changes arising from the PZN pre-
297 treatment in the PILO-model of TLE.

298 In general, we analyzed the behavioral patterns of epileptic and PZN-treated epileptic
299 rats, in order to observe whether hippocampal SGLT inhibition would cause any alteration in
300 motor seizures during SE. It is known that severity of seizures increases with time [8], but few
301 studies bring a solid and detailed support to explain this behavioral pattern during the SE.
302 After H-PILO administration, animals that did not receive PZN presented predominantly
303 classes 2 and 4 seizures at 10 min of SE. During SE, the number of class 2 seizures decreased,
304 maintaining a high class 4 and unchanged class 5. This pattern of seizures can be explained by
305 the fact that initially the seizures are focal, centralized in a few brain areas, which justifies
306 behavior expressions such as facial automatism and head and neck myoclonus. However, as
307 the SE progresses, other central areas are recruited, which is seen as the development of
308 generalized motor seizures. At this point, the mild seizure expressions, such as automatism
309 and head and neck myoclonus, are spiked with forelimbs myoclonus, rearing and frequent
310 fallings. According to Lothman and Collins (1981), the first classes of Racine's scale (1972)
311 occur as restricted epileptic expression of hippocampus and lateral septum activation, then in
312 the intermediate classes other limbic centers would be recruited, and at the last level
313 extralimbic centers would also be involved.

314 On the other hand, after SGLT inhibition, similarly to vehicle-treated rats, animals that
315 developed SE also presented high number of classes 2 and 4 seizures. Class 2 decreased and
316 class 4 remained elevated along the SE in PZN compared to classes 3 and 5 (Fig. 2B). Instead

317 of VEH+PILO, class 5 was significantly prominent at 50, 60 and 70 min after SE onset in
318 PZN+PILO (Fig. 2 B), indicating increase of seizure severity in this specific time point.

319 In addition, our results showed for the first time that WDS number was increased
320 following intrahippocampal administration of PZN in animals that were submitted to SE by
321 H-PILO. This motor pattern has been studied in different models of epilepsy in rats, like
322 kindling [29–32], kainic acid and pilocarpine [14,28,33]. Numerous WDS have been
323 approached in literature as a behavior associated with limbic seizures in focal epilepsy
324 induced by kindling stimulation or local injections of kainic acid or pilocarpine, which
325 gradually disappear during generalization. WDS can act as an indicator of progression
326 towards the generalized limbic seizures [32], however, it is noteworthy that WDS expression
327 and seizures do not depend on a path in common, so they can be propagated through distinct
328 pathways [33,34]. In a intrahippocampal pilocarpine administration, Rodrigues et al. (2005)
329 showed that the presence of WDS can be explained by anticonvulsant hypothesis. They report
330 that animals that developed SE showed a large number of WDS initially which declined
331 sharply after SE onset. In our study, hippocampal PZN, an SGLT inhibitor, increased the
332 number of WDS, what may be explained as a compensatory mechanism due to increased
333 seizure severity [14].

334 SGLT1 has been related to epileptic focus [22]. The increased expression of SGLT1
335 and SGLT2 proteins in plasma membrane of neurons may play a protective function when the
336 energy supply is reduced (as during ischemia and hypoglycemia) or the energy consumption
337 increased during epilepsy [19,20]. Thus, SGLTs could be essential for the survival of neurons
338 that are under low glucose concentrations or anoxia [19]. Possibly, SGLT inhibition shown in
339 this study is able to compromise the neuronal survival, since less glucose enters in the cell and
340 consequently less ATP is generated. ATP, provided by mitochondrial oxidative
341 phosphorylation, is the source of energy to exert various cell functions, including the

342 operation of sodium-potassium and chloride pumps and maintaining the resting membrane
343 potential [4,35]. Therefore, the commitment of glucose supply to neurons significantly affects
344 brain function as well as the development and susceptibility to seizures [36], possibly
345 increasing neuronal susceptibility to activation of cell death molecular cascades.

346 We showed in this study that SGLT1 and SGLT2 inhibition by PZN provides
347 increased FJ+ neurons in the dentate gyrus (Fig. 3E), hilus (Fig. 3F), CA3 (Fig. 4E) and CA1
348 (Fig. 5 E) regions, after 24 hours of SE. SGLT1 protein is expressed in the dentate gyrus
349 granule cells and pyramidal cells of CA1 and CA3 subfields [19]. Although these authors
350 have not mentioned immunostaining of this protein in hilar interneurons, their
351 photomicrographs indicated that SGLT1 is also present in hilus of dentate gyrus. As SGLT1
352 is expressed in these four regions, increased number of FJ+ in PZN-treated rats can be directly
353 associated with neuronal death caused by the association between inhibition of SGLT
354 function and SE. The early vulnerability of hippocampus to show FJ+ cells in temporal lobe
355 epilepsy under SGLT inhibition, coupled with the high SGLT1 densities in these neuronal
356 bodies and terminals [20] is a strongly indicative of the critical role of SGLT1 in maintaining
357 neuronal survival during SE. Interestingly, the hippocampal inhibition of SGLT in basal
358 conditions does not promote neuronal death evidenced by FJ+ cells.

359 Furthermore, after 15 days of SE, neuronal death was only decreased in the CA1
360 region (Fig. 6E) when comparing PZN+PILO with VEH+PILO groups, while the other
361 subareas remained unchanged (supplementary data). This fact may be due to poor neuronal
362 survival that would reflect as low number of neurons to continue to die at 15 days after SE, or
363 to the earlier presence of SRS (data not evaluated) in animals subjected to PZN injection.
364 Either possibilities must be considered, but the reason for reduced neuronal death under
365 hippocampal SGLT inhibition in "epileptic brain" is yet unknown and needs to be further

366 investigated. As highly specific SGLT1 and SGLT2 tracers become available, the
367 investigation of mechanisms underlying SGLT role in epileptogenesis will be improved.

368 When the kinetics of neurodegeneration in PZN-treated epileptic rats was analyzed, a
369 decrease in the number of FJ+ dentate gyrus and hilus cells after 15 days of SE was observed
370 when compared to 24h interval, while in CA1 and CA3 no changes were present (Fig. 7B).
371 Neurodegeneration pattern after SE induced by H-PILO is region and time dependent.
372 According to Castro et al. (2011), FJ+ neurons were observed in all time points after SE in the
373 hilus of the dentate gyrus, CA1 and CA3, but the number of FJ + cells differed over time.
374 According to Poirier et al. (2000), the best time to detect neurodegeneration with FJ technique
375 is 24 h after SE, although these authors also found neurodegeneration after 15 days of initial
376 insult. In addition, neuronal death has detected up to 3 months after pilocarpine and lithium
377 induced SE [37]. Kinetic analysis of neurodegeneration was performed in this study, 24 h and
378 15 days after SE in groups VEH+PILO and PZN+PILO (Fig. 7), encountering, as before
379 Castro et al. (2011), a region and time dependency to neuronal death provoked by SE
380 evidenced by the FJ technique. Those authors analyzed neuronal loss in hippocampal
381 subfields at 12, 24 and 168 h (7 days), also in an H-PILO model, showing that neuronal loss
382 in the hilus was reduced at 168 h compared to 12 hours, but was not different of the 24 h
383 group. On the other hand, neuronal death in CA3 at 24 h was elevated when compared to 12 h
384 post-SE, however there is no difference between 24 h and 168 h. Such data is in agreement
385 with our findings, since the maintenance in the number of FJ+ neurons is observed in 15 days
386 when compared to 24 h group, in CA3 area. In the same study, authors show that FJ+ neurons
387 increased in later points when compared to acute (12 and 24 h) time in CA1 subarea, which
388 was also corroborated by us, since 15 days after SE the number of FJ+ was higher than at 24 h
389 [38,39].

390 Epilepsy is frequently observed in patients with diabetes mellitus [40]. The present
 391 results can be considered an alert to the potential risk of neurological damage using SGLTs
 392 inhibitors to improve glycemic control, especially in patients with diabetes and epilepsy. The
 393 requirement for new antidiabetic agents brought the dual SGLT2 and SGLT1 inhibitors, such
 394 as canagliflozin and LX4211, to clinical use before some aspects of their collateral effects still
 395 unknown [41]. However, the association of dual SGLT2 and SGLT1 inhibitors with neuronal
 396 death in hippocampus has never been considered.

397 **5. Conclusion**

398 In summary, we showed for the first time that inhibition of SGLT in hippocampus
 399 increase the severity of limbic seizures and WDS during SE. Furthermore, inhibition of
 400 hippocampal SGLT function also increases neurodegeneration in dentate gyrus, hilus, CA3
 401 and CA1 regions of hippocampus after 24h. However, we found that this inhibition promotes
 402 decreased neurodegeneration in CA1 region 15 days after SE. These data support that SGLT
 403 play an important role during the SE, possibly ensuring the survival of neural cells during
 404 earlier stage of epileptogenic processes.

405 **6. Acknowledgements**

406 We thank Dr. Norberto Garcia Cairasco for material support. This study was supported by
 407 FAPEAL, CNPq and CAPES. Melo IS is a CNPq-Brazil MSc fellow.

408

409 **REFERENCES**

- 410 1. Sharma AK, Reams RY, Jordan WH, Miller M a, Thacker HL, Snyder PW. Mesial
 411 temporal lobe epilepsy: pathogenesis, induced rodent models and lesions. *Toxicol*
 412 *Pathol.* 2007;35: 984–999. doi:10.1080/01926230701748305
- 413 2. Van Liefferinge J, Massie A, Portelli J, Di Giovanni G, Smolders I. Are vesicular
 414 neurotransmitter transporters potential treatment targets for temporal lobe epilepsy?
 415 *Front Cell Neurosci.* 2013;7: 139. doi:10.3389/fncel.2013.00139
- 416 3. O’Dell CM, Das A, Wallace G, Ray SK, Banik NL. Understanding the basic
 417 mechanisms underlying seizures in mesial temporal lobe epilepsy and possible
 418 therapeutic targets: A review. *J Neurosci Res.* 2012;90: 913–924.
 419 doi:10.1002/jnr.22829

- 420 4. Badawy R a B, Harvey AS, Macdonell R a L. *Journal of Clinical Neuroscience*. J Clin
421 Neurosci. Elsevier Ltd; 2009;16: 355–365. doi:10.1016/j.jocn.2008.08.026
- 422 5. Pitkänen A, Lukasiuk K. Molecular and cellular basis of epileptogenesis in
423 symptomatic epilepsy. *Epilepsy Behav*. Elsevier Inc.; 2009;14: 16–25.
424 doi:10.1016/j.yebeh.2008.09.023
- 425 6. Romcy-Pereira RN, Gitaí DLG, Gitaí LLG, Leite JP, Garcia-Cairasco N, Paçó-Larson
426 ML. Genes e epilepsia II: expressão gênica diferencial. *Rev Assoc Med Bras*. 2008;54:
427 461–466. doi:10.1590/S0104-42302008000500022
- 428 7. De Furtado M a., Braga GK, Oliveira J a C, Del Vecchio F, Garcia-Cairasco N.
429 Behavioral, morphologic, and electroencephalographic evaluation of seizures induced
430 by intrahippocampal microinjection of pilocarpine. *Epilepsia*. 2002;43: 37–39.
431 doi:10.1046/j.1528-1157.2002.043s2037.x
- 432 8. Furtado M a., Castro OW, Del Vecchio F, de Oliveira J a C, Garcia-Cairasco N. Study
433 of spontaneous recurrent seizures and morphological alterations after status epilepticus
434 induced by intrahippocampal injection of pilocarpine. *Epilepsy Behav*. Elsevier Inc.;
435 2011;20: 257–266. doi:10.1016/j.yebeh.2010.11.024
- 436 9. Castro OW, Furtado M a., Tilelli CQ, Fernandes a., Pajolla GP, Garcia-Cairasco N.
437 Comparative neuroanatomical and temporal characterization of FluoroJade-positive
438 neurodegeneration after status epilepticus induced by systemic and intrahippocampal
439 pilocarpine in Wistar rats. *Brain Res*. Elsevier B.V.; 2011;1374: 43–55.
440 doi:10.1016/j.brainres.2010.12.012
- 441 10. Leite JP, Garcia-Cairasco N, Cavalheiro E a. New insights from the use of pilocarpine
442 and kainate models. *Epilepsy Res*. 2002;50: 93–103. doi:10.1016/S0920-
443 1211(02)00072-4
- 444 11. Leite JP, Bortolotto Z a., Cavalheiro E a. Spontaneous recurrent seizures in rats: An
445 experimental model of partial epilepsy. *Neurosci Biobehav Rev*. 1990;14: 511–517.
446 doi:10.1016/S0149-7634(05)80076-4
- 447 12. Turski W a, Cavalheiro E a, Turski L, Kleinrok Z. Intrahippocampal bethanechol in
448 rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological correlates. *Behav*
449 *Brain Res*. 1983;7: 361–370. doi:10.1016/0166-4328(83)90026-8
- 450 13. Turski W a, Cavalheiro E a, Schwarz M, Czuczwar SJ, Kleinrok Z, Turski L. Limbic
451 seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and
452 neuropathological study. *Behav Brain Res*. 1983;9: 315–335. doi:10.1016/0166-
453 4328(83)90136-5
- 454 14. Rodrigues MCA, Rossetti F, Foresti ML, Arisi GM, Furtado MA, Dal-Cól MLC, et al.
455 Correlation between shaking behaviors and seizure severity in five animal models of
456 convulsive seizures. *Epilepsy Behav*. 2005;6: 328–336.
457 doi:10.1016/j.yebeh.2005.02.005
- 458 15. Pinel JP, Rovner LI. Experimental epileptogenesis: kindling-induced epilepsy in rats.
459 *Exp Neurol*. 1978;58: 190–202. Available:
460 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/618743>
- 461 16. Poirier JL, Čapek R, De Koninck Y. Differential progression of Dark Neuron and
462 Fluoro-Jade labelling in the rat hippocampus following pilocarpine-induced status
463 epilepticus. *Neuroscience*. 2000;97: 59–68. doi:10.1016/S0306-4522(00)00026-9
- 464 17. Wright EM, Loo DDF, Hirayama B a. Biology of human sodium glucose transporters.

- 465 Physiol Rev. 2011;91: 733–794. doi:10.1152/physrev.00055.2009
- 466 18. Scafoglio C, Hirayama B a., Kepe V, Liu J, Ghezzi C, Satyamurthy N, et al. Functional
467 expression of sodium-glucose transporters in cancer. Proc Natl Acad Sci. 2015;112:
468 E4111–E4119. doi:10.1073/pnas.1511698112
- 469 19. Yu AS, Hirayama B a, Timbol G, Liu J, Diez-Sampedro A, Kepe V, et al. Regional
470 distribution of SGLT activity in rat brain in vivo. Am J Physiol Cell Physiol. 2013;304:
471 C240–7. doi:10.1152/ajpcell.00317.2012
- 472 20. Yu AS, Hirayama B a, Timbol G, Liu J, Basarah E, Kepe V, et al. Functional
473 expression of SGLTs in rat brain. Am J Physiol Cell Physiol. 2010;299: C1277–C1284.
474 doi:10.1152/ajpcell.00296.2010
- 475 21. Sabino-Silva R, Mori RC, David-Silva a., Okamoto MM, Freitas HS, MacHado UF.
476 The Na⁺/glucose cotransporters: From genes to therapy. Brazilian J Med Biol Res.
477 2010;43: 1019–1026. doi:10.1590/S0100-879X2010007500115
- 478 22. Poppe R, Karbach U, Gambaryan S, Wiesinger H, Lutzenburg M, Kraemer M, et al.
479 Expression of the Na⁺-D-glucose cotransporter SGLT1 in neurons. J Neurochem.
480 1997;69: 84–94.
- 481 23. Gasior M, Rogawski MA, Hartman AL. Neuroprotective and disease-modifying effects
482 of the ketogenic diet. Behav Pharmacol. 2006;17: 431–9. Available:
483 [http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2367001&tool=pmcentrez](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2367001&tool=pmcentrez&rendertype=abstract)
484 &rendertype=abstract
- 485 24. Meidenbauer JJ, Roberts MF. Reduced glucose utilization underlies seizure protection
486 with dietary therapy in epileptic EL mice. Epilepsy Behav. 2014;39: 48–54.
487 doi:10.1016/j.yebeh.2014.08.007
- 488 25. George Paxinos and Charles Watson, editor. The rat brain in stereotaxic coordinates.
489 6TH ed. 1996.
- 490 26. Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure.
491 Electroencephalogr Clin Neurophysiol. 1972;32: 281–94.
- 492 27. Schmued LC, Albertson C, Slikker W. Fluoro-Jade: A novel fluorochrome for the
493 sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration. Brain Res.
494 1997;751: 37–46. doi:10.1016/S0006-8993(96)01387-X
- 495 28. Lothman EW, Collins RC. Kainic acid induced limbic seizures: metabolic, behavioral,
496 electroencephalographic and neuropathological correlates. Brain Res. 1981;218: 299–
497 318. doi:10.1016/0006-8993(81)91308-1
- 498 29. Le Gal La Salle G, Cavalheiro E a. Stimulation of septal and amygdaloid nuclei: EEG
499 and behavioral responses during early development of kindling with special reference
500 to wet dog shakes. Exp Neurol. 1981;74: 717–727. doi:10.1016/0014-4886(81)90246-6
- 501 30. Cordeiro JG, Capurro A, Aertsen A, Cordeiro KK, Araújo JC, Schulze-Bonhage A.
502 Improvement in hippocampal kindling analysis through computational processing data.
503 Arq Neuropsiquiatr. 2009;67: 677–683. doi:10.1590/S0004-282X2009000400019
- 504 31. Epps SA, Tabb KD, Lin SJ, Kahn AB, Javors M a, Boss-Williams K a, et al. Seizure
505 Susceptibility and Epileptogenesis in a Rat Model of Epilepsy and Depression Co-
506 Morbidity. Neuropsychopharmacology. Nature Publishing Group; 2012;37: 2756–
507 2763. doi:10.1038/npp.2012.141
- 508 32. Rondouin G, Lerner-Natoli M, Hashizume a. Wet dog shakes in limbic versus
509 generalized seizures. Exp Neurol. 1987;95: 500–505. doi:10.1016/0014-

- 510 4886(87)90156-7
- 511 33. Grimes L, McGinty J, McLain P, Mitchell C, Tilson H, Hong J. Dentate granule cells
512 are essential for kainic acid-induced wet dog shakes but not for seizures. *J Neurosci.*
513 1988;8: 256–264.
- 514 34. Lee PH, Hong JS. Ventral hippocampal dentate granule cell lesions enhance motor
515 seizures but reduce wet dog shakes induced by mu opioid receptor agonist.
516 *Neuroscience.* 1990;35: 71–77. doi:10.1016/0306-4522(90)90121-J
- 517 35. Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, Van Emde Boas W, et al.
518 Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report
519 of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia.*
520 2010;51: 676–685. doi:10.1111/j.1528-1167.2010.02522.x
- 521 36. Vannucci SJ, Seaman LB, Brucklacher RM, Vannucci RC. Glucose transport in
522 developing rat brain: Glucose transporter proteins, rate constants and cerebral glucose
523 utilization. *Mol Cell Biochem.* 1994;140: 177–184. doi:10.1007/BF00926756
- 524 37. Kubová H, Druga R, Haugvicová R, Suchomelová L, Pitkanen a. Dynamic changes of
525 status epilepticus-induced neuronal degeneration in the mediodorsal nucleus of the
526 thalamus during postnatal development of the rat. *Epilepsia.* 2002;43: 54–60.
527 doi:10.1046/j.1528-1157.43.s.5.36.x
- 528 38. Seress L, Gulyás AI, Freund TF. Parvalbumin- and calbindin D28k-immunoreactive
529 neurons in the hippocampal formation of the macaque monkey. *J Comp Neurol.*
530 1991;313: 162–77. doi:10.1002/cne.903130112
- 531 39. Sloviter RS. Calcium-binding protein (calbindin-D28k) and parvalbumin
532 immunocytochemistry: localization in the rat hippocampus with specific reference to
533 the selective vulnerability of hippocampal neurons to seizure activity. *J Comp Neurol.*
534 1989;280: 183–96. doi:10.1002/cne.902800203
- 535 40. Yun C, Xuefeng W. Association between seizures and diabetes mellitus: a
536 comprehensive review of literature. *Curr Diabetes Rev.* 2013;9: 350–4. Available:
537 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23590576>
- 538 41. Machado UF, Corrêa-Giannella ML. Sodium-glucose transporter 2 inhibitors in type 2
539 diabetes mellitus: navigating between Scylla and Charybdis. *Expert Opin Emerg*
540 *Drugs.* 2014;19: 5–9. doi:10.1517/14728214.2014.875530

541

542 **FIGURE LEGENDS**543 **Fig. 1.** Latency time before the SE (A) and number of WDS during latency and the SE (B).

544 Unpaired t test, *p<0.05.

545

546 **Fig. 2.** Evolution at all classes along the SE in VEH+PILO (A) and PZN+PILO (B). Number

547 at all classes of Racine's scale for window (10 min) in VEH+PILO and PZN+PILO. ANOVA,

548 post-hoc of Student-Newman-Keuls, p<0.05. (A-B) # compared to classes 3 and 5, *

549 compared to classes 2, 3 and 5, & compared to classes 2, 3 and 4.

550

551 **Fig. 3.** Qualitative and quantitative analysis of FJ+ neuron in dentate gyrus and hilus of
 552 hippocampus after 24h of SE. Dentate gyrus and hilus in VEH+VEH (A), PZN+VEH (B),
 553 VEH+PILO (C) and PZN+PILO (D). Total number of FJ+ in dentate gyrus (E) and hilus (F).
 554 Arrows represent the dentate gyrus and arrow heads, the hilus. (A-D) Magnification, x100;
 555 scale bar, 100 μ m. (C'-D') Magnification, x200; scale bar, 50 μ m. Unpaired t test, $p < 0.05$ and
 556 $p < 0.01$. *, ** compared to VEH+PILO.

557

558 **Fig. 4.** Qualitative and quantitative analysis of FJ+ neuron in CA3 region of hippocampus
 559 after 24h of SE. CA3 region in VEH+VEH (A), PZN+VEH (B), VEH+PILO (C) and
 560 PZN+PILO (D). Total number of FJ+ in CA3 (E). Arrows represent the CA3 region. (A-D)
 561 Magnification, x100; scale bar, 100 μ m. (C'-D') Magnification, x200; scale bar, 50 μ m.
 562 Unpaired t test, $p < 0.05$. * compared to VEH+PILO.

563

564 **Fig. 5.** Qualitative and quantitative analysis of FJ+ neuron in CA1 region of hippocampus
 565 after 24h of SE. CA1 region in VEH+VEH (A), PZN+VEH (B), VEH+PILO (C) and
 566 PZN+PILO (D). Total number of FJ+ in CA1 (E). Arrows represent the CA1 region. (A-D)
 567 Magnification, x100; scale bar, 100 μ m. (C'-D') Magnification, x200; scale bar, 50 μ m.
 568 Unpaired t test, $p < 0.05$. * compared to VEH+PILO.

569

570 **Fig. 6.** Qualitative and quantitative analysis of FJ+ neuron in CA1 region of hippocampus
 571 after 15 days of SE. CA1 region in VEH+VEH (A), PZN+VEH (B), VEH+PILO (C) and
 572 PZN+PILO (D). Total number of FJ+ in CA1 (E). Arrows represent the CA1 region. (A-D)
 573 Magnification, x100; scale bar, 100 μ m. (C'-D') Magnification, x200; scale bar, 50 μ m.
 574 Unpaired t test, $p < 0.05$. * compared to VEH+PILO.

575

576 **Fig. 7.** Analysis of neurodegeneration kinetics in VEH+PILO (A) and PZN+PILO (B).
 577 Kinetics of neurodegeneration after 24 h and 15 days in dentate gyrus (DG), hilus, CA3 and
 578 CA1, respectively. Unpaired t test, $p < 0.05$. (A) In DG and CA1, * 24h versus 15d. (B) In DG
 579 and hilus, *** 24h versus 15d.

580

581 **SUPPLEMENTARY FIGURE 1.** Qualitative and quantitative analysis of FJ+ neuron in
 582 dentate gyrus and hilus of hippocampus after 15 days of SE. Dentate gyrus and hilus in
 583 VEH+VEH (A), PZN+VEH (B), VEH+PILO (C) and PZN+PILO (D). Total number of FJ+
 584 in dentate gyrus (E) and hilus (F). Arrows represent the dentate gyrus and arrow heads, the

585 hilus. (A-D) Magnification, x100; scale bar, 100 μ m. (C'-D') Magnification, x200; scale bar,
586 50 μ m. Unpaired t test, $p < 0.05$..

587

588 **SUPPLEMENTARY FIGURE 2.** Qualitative and quantitative analysis of FJ+ neuron in
589 CA3 region of hippocampus after 15 days of SE. CA1 region in VEH+VEH (A), PZN+VEH
590 (B), VEH+PILO (C) and PZN+PILO (D). Total number of FJ+ in CA1 (E). Arrows represent
591 the CA3 region. (A-D) Magnification, x100; scale bar, 100 μ m. (C'-D') Magnification, x200;
592 scale bar, 50 μ m. Unpaired t test, $p < 0.05$.

593

594

Fig. 1
[Click here to download high resolution image](#)

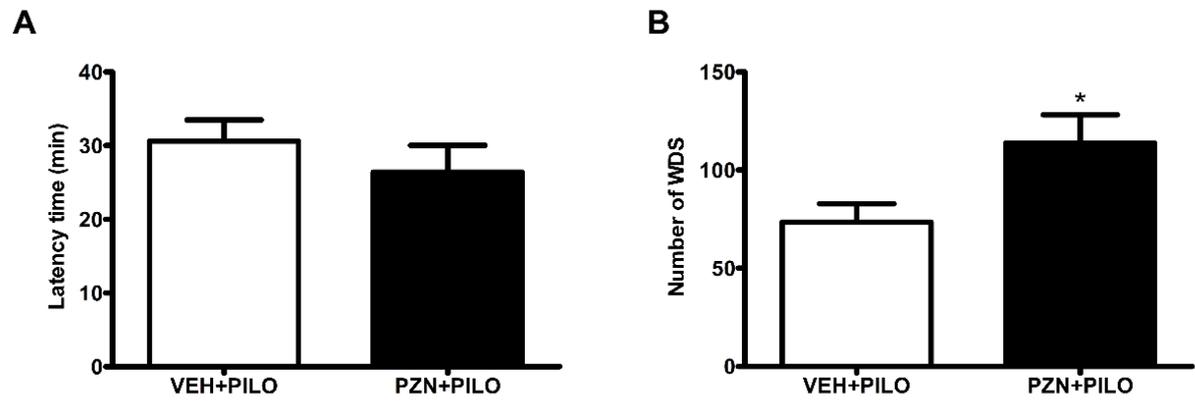


Fig. 2
[Click here to download high resolution image](#)

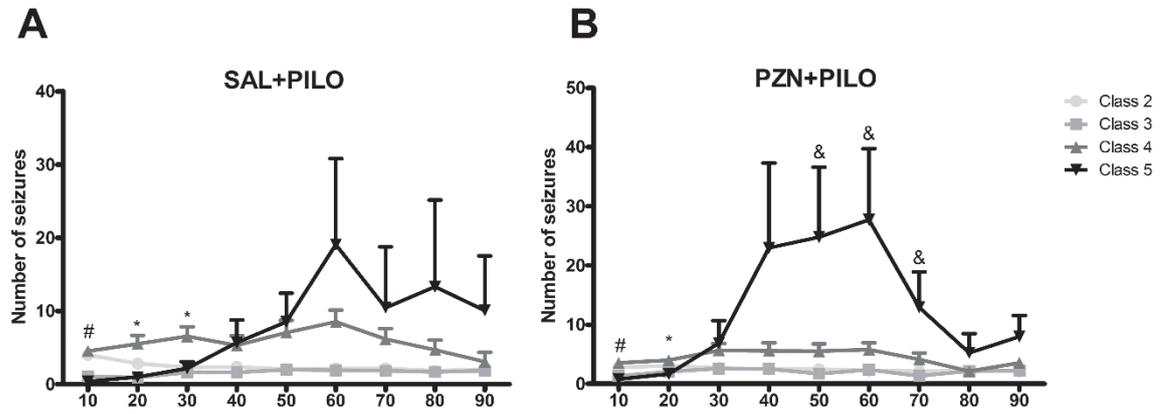


Fig. 3
[Click here to download high resolution image](#)

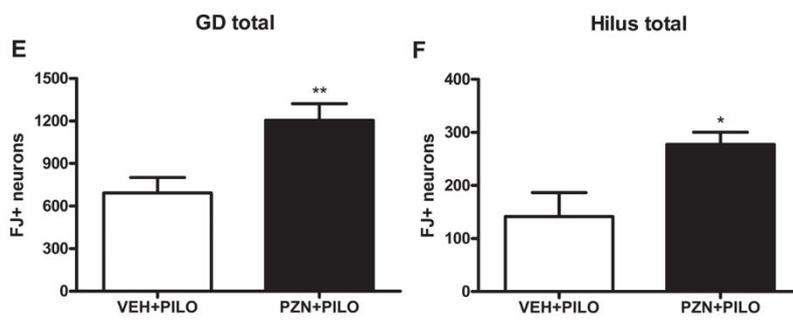
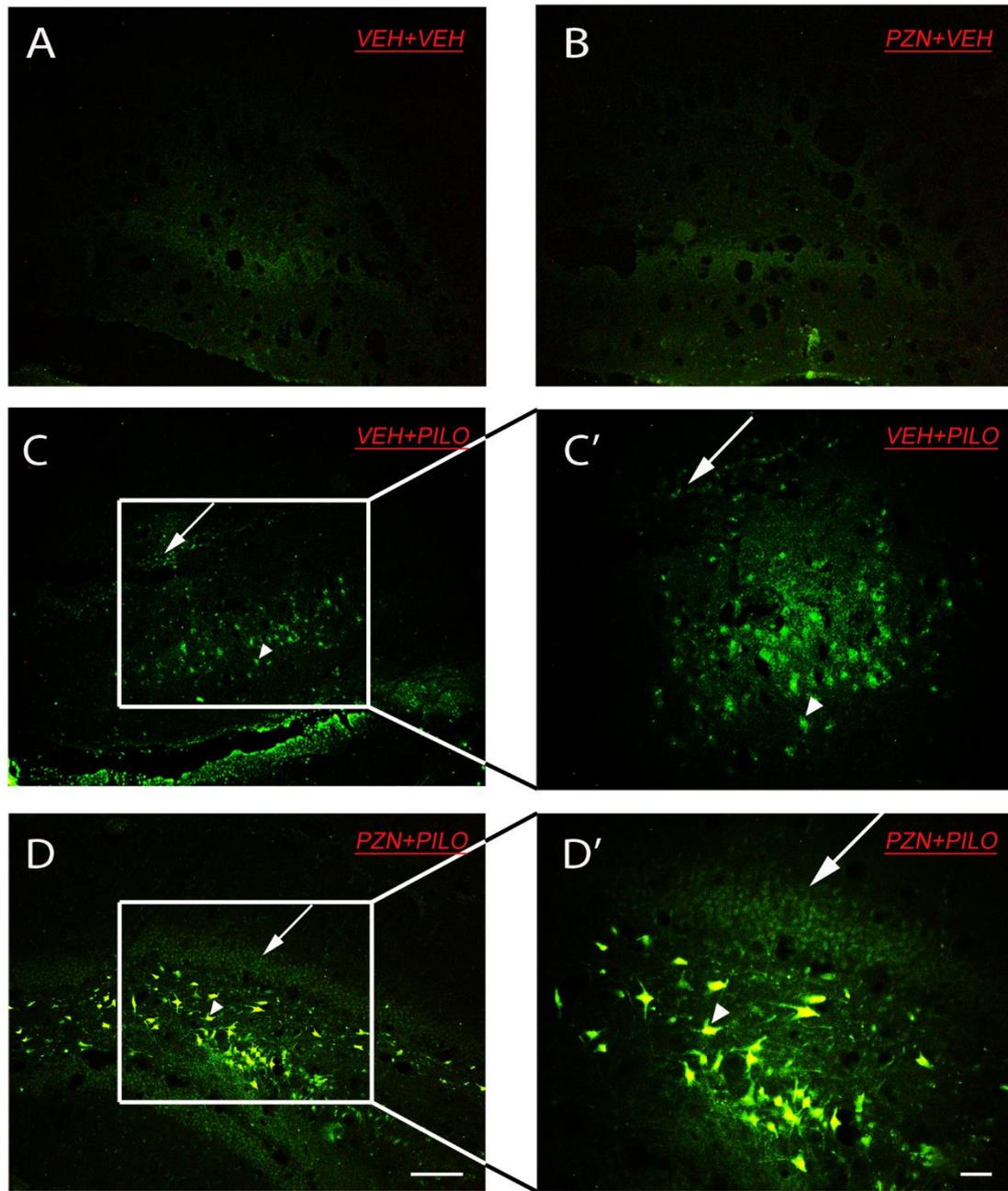


Fig. 4
[Click here to download high resolution image](#)

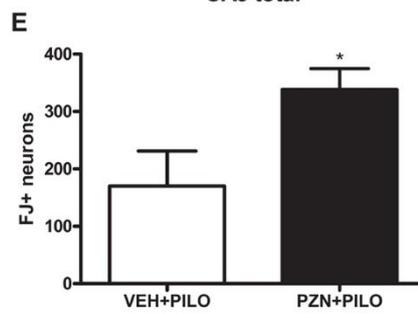
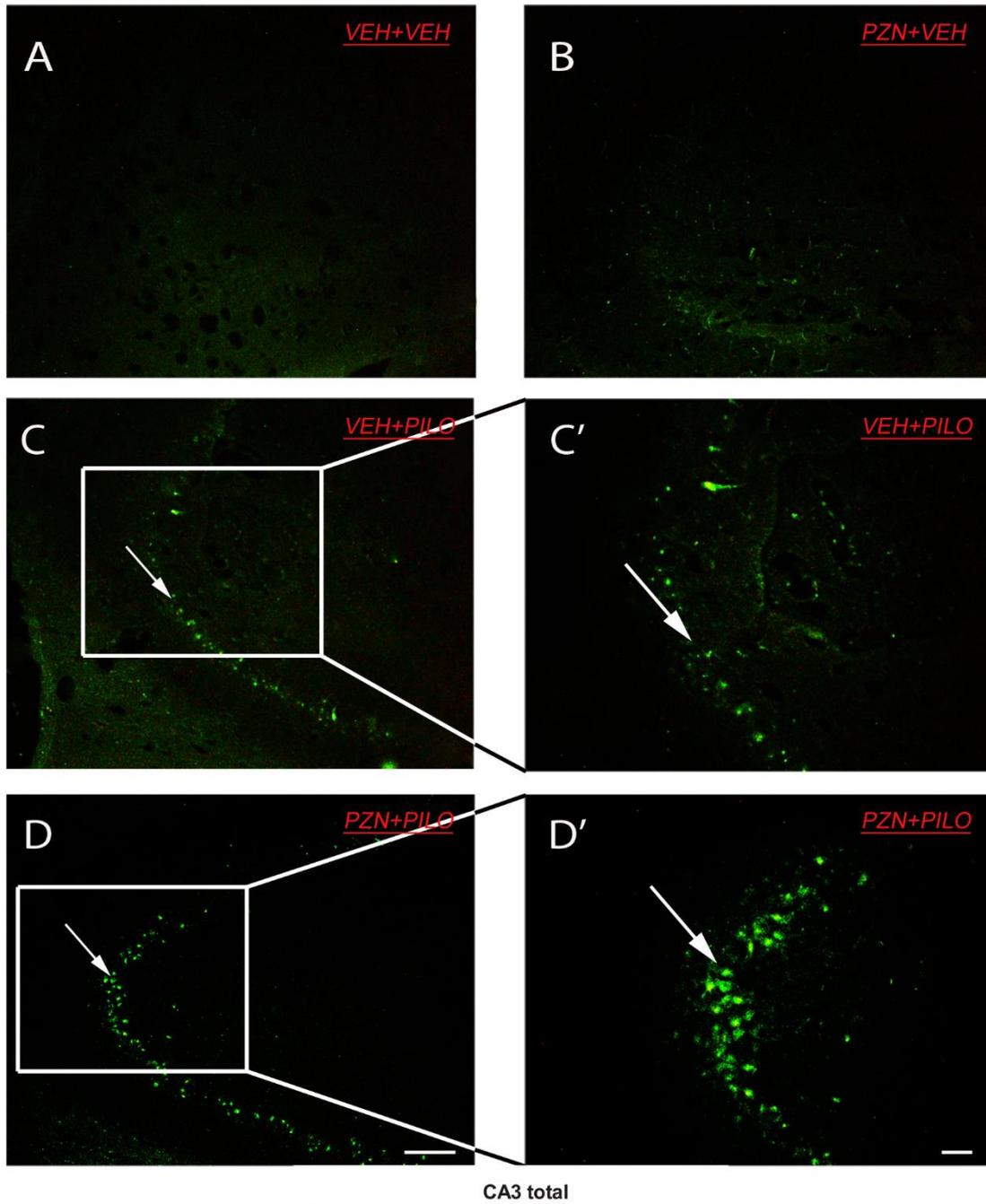


Fig. 5
[Click here to download high resolution image](#)

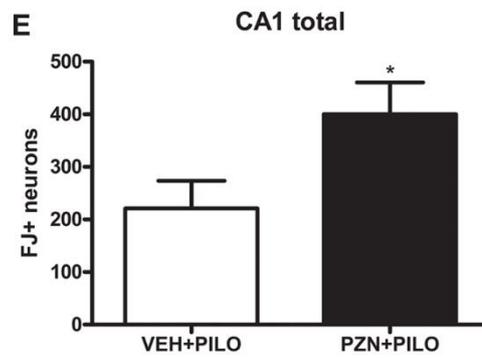
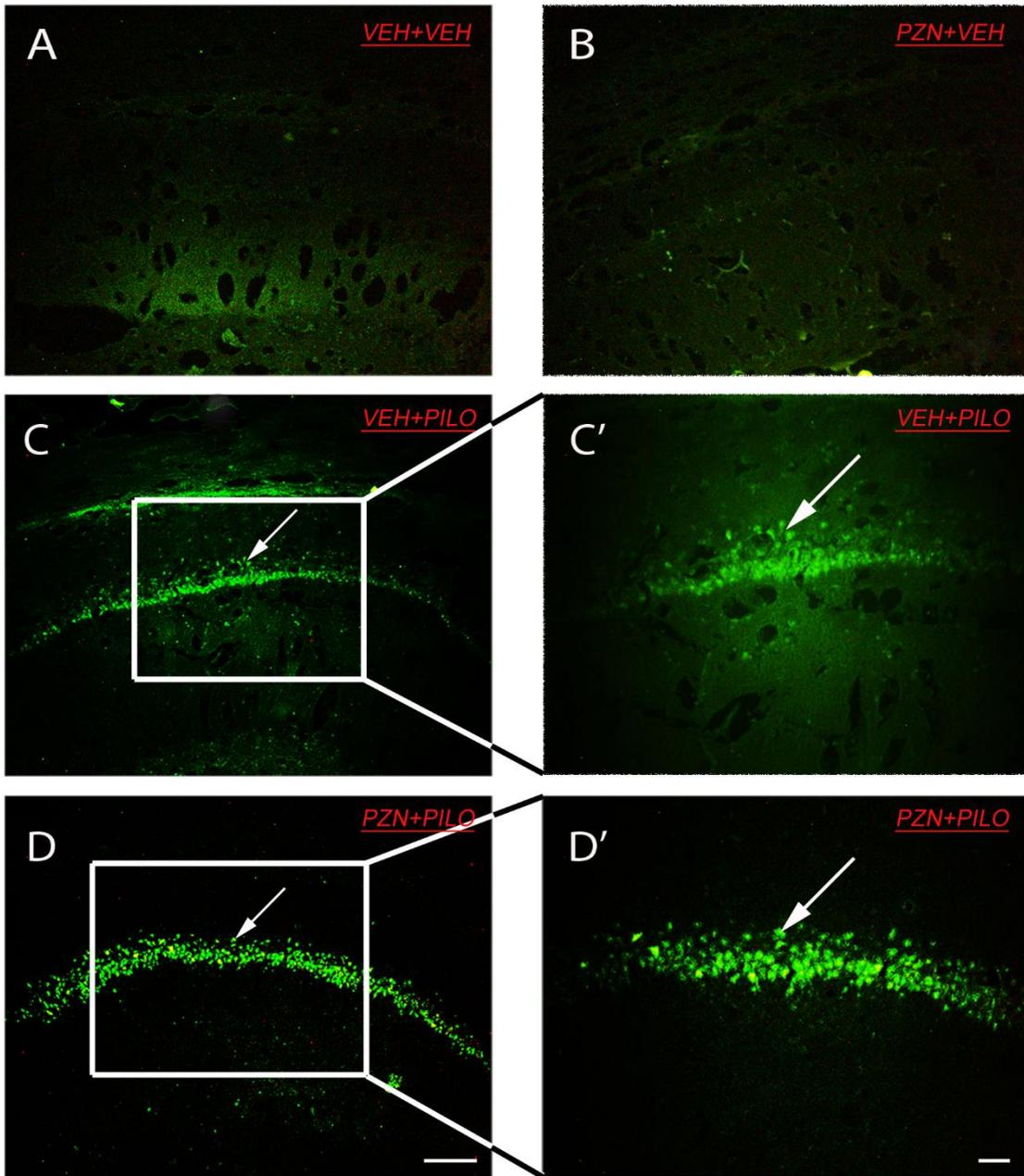


Fig. 6
[Click here to download high resolution image](#)

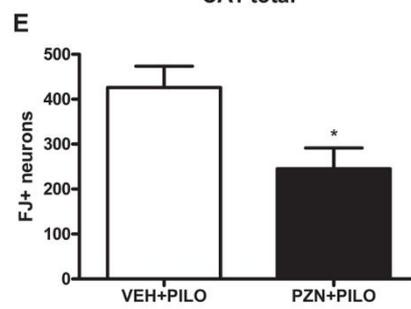
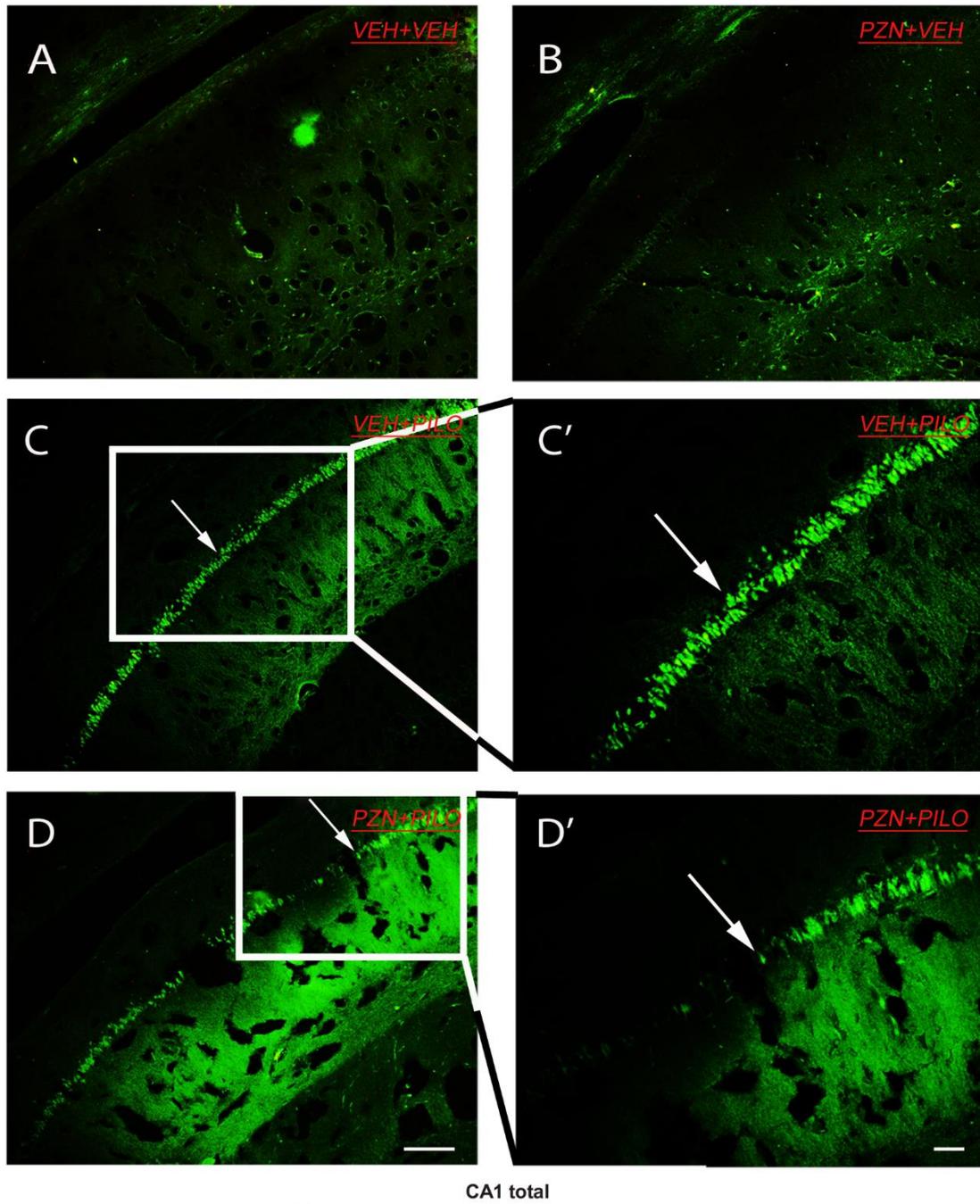


Fig. 7
[Click here to download high resolution image](#)

