

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

CARMEM LÚCIA DE ARROXELAS SILVA

EFEITO DO SURFACTANTE SOLUTOL® HS 15 EM MODELO EXPERIMENTAL
DE EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL MESIAL

Maceió

2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

CARMEM LÚCIA DE ARROXELAS SILVA

EFEITO DO SURFACTANTE SOLUTOL® HS 15 EM MODELO EXPERIMENTAL
DE EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL MESIAL

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em
Ciências da Saúde, linha de pesquisa em Fisiopatologia
de Doenças Humanas e Terapêutica Experimental,
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde – UFAL para
obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

Orientador: Profº Drº Daniel Leite Góes Gitaí

Maceió

2024

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

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

S586e Silva, Carmem Lúcia de Arroxelas.
Efeito do surfactante Solutol® HS 15 em modelo experimental de epilepsia do lobo temporal mesial / Carmem Lúcia de Arroxelas Silva. – 2024.
73 f. : il., grafs., tabs. color.

Orientador: Daniel Leite Góes Gitai.
Tese (doutorado em ciências da saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Maceió, 2024.

Bibliografia: f. 65-70.
Anexos: f. 71-73.

1. Epilepsia. 2. Solutol® HS. 3. Neuroproteção. 4. Anticonvulsivantes. I. Título.

CDU: 616.853:615.213

DECIDATÓRIA

Aos pacientes com Epilepsia do Lobo Temporal e aos seus familiares que vivenciam a realidade de conviver com essa condição de saúde.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que acompanharam de perto os altos e baixos que passei durante todo esse tempo de formação acadêmica, apoiando, ajudando, cuidando de mim e aguentando os meus apanchos, socorrendo-me em momentos de crises de ansiedade. Ao meu irmão, que mesmo vivenciando de longe essa fase do doutorado, sempre me motivou a não desistir, dando-me forças e, claro, sendo um exemplo de pessoa, profissional e pesquisador para mim. Nos meus piores momentos, ele foi meu melhor “psicólogo”.

A Universidade Federal de Alagoas e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde no qual me proporcionou experiências e aprendizagens acadêmicas e científicas, assim como aos órgãos de fomento CAPES que me disponibilizou a possibilidade bolsa de doutorado, além de disponibilizar recursos necessários para a execução do trabalho junto ao CNPq e FAPEAL.

Ao meu orientador, Daniel Gitaí, que abriu as portas do seu laboratório para mim, entrei no grupo como estagiária voluntária sem saber nada de Ciência, sobre Epilepsias, mas fui gostando e, assim, passei por três ciclos de projeto de iniciação científica, mestrado e, agora, finalizando meu ciclo de formação acadêmica, o doutorado sob sua orientação. Agradeço toda a ajuda, compreensão e orientação dada a mim por todo esse processo.

Aos meus amigos do grupo de pesquisa, Pedro e Júnior, que foram os que mais me acompanharam de perto, ajudando tanto tecnicamente quanto intelectualmente para a realização dos experimentos. As “ICs” Jordana, Jéssica, Dhennyfer e Karla que me ajudaram na execução dos experimentos, assim como, ao Érico que me ajudou muito na fase do estabelecimento da fase crônica da epileptogênese. A Gabriele, Diana e Carine, que apesar de estarem vinculadas a outro projeto, sempre ofereceram ajuda. As doutoras Mykaella e Wanessa que ajudaram no momento dos experimentos de expressão gênica. Enfim, ao grupo GPECE, gratidão.

A minha parceira de pibic e amiga Layanne, a doutora Yngrid e doutor Igor, foi com eles que aprendi as primeiras técnicas metodológicas no LNFI, compartilhei aflições e bons momentos, assim como, ao prof. Dr. Olagide, coordenador do LNFI que me ajudou nesse durante esse processo também. E que me fez me apaixonar pela Fisiologia, em especial, a Neurofisiologia, e ainda mais, a neuroendócrina, com certeza, a melhor disciplina que tive em toda a minha graduação.

Aos meus, Valdemir e Alessandro, pessoas que eu conto para toda hora, seja manhã, tarde, noite, eu sei que sempre terei eles comigo, ajudando, apoiando, rindo dos problemas, almejando sempre o bom para cada um de nós e, apesar da distância geográfica que a vida possa nos promover algum dia, cada um sendo doutor e buscando novos rumos, eu tenho certeza de que nunca existirá motivos que apagarão o brilho de nossa amizade.

Aos meus cachorros, meus anjinhos Totó e Tobias que já não estão mais entre nós, mas que deram tanto amor a mim e minha família, nunca os esquecerei e sempre serei grata pela companhia que me deram, muitas vezes madrugada a fora quando eu estava estudando, em crise de ansiedade. E ao novo cachorrinho da família, Toddy, nos

dá amor desde o primeiro encontro. Sim, eu amei, amo e sempre amarei meus cachorros como membro da família a ponto de citá-los nos meus agradecimentos.

Por fim, na reta final, mas não menos importante, ao meu namorado Joatan Lucas, pela companhia diária, conselhos, estímulo e apoio, pessoa que tenho muita admiração. Portanto, a todos que passaram e que estão em minha vida e me ajudaram de alguma forma nessa jornada. Obrigada! Gratião Deus por sempre cuidar de mim.

“Se chorei ou se sorri, o importante é que emoções eu vivi”

Emoções- Erasmo Carlos e Roberto Carlos.

RESUMO

A epilepsia é uma doença neurológica caracterizada por uma predisposição crônica do cérebro em gerar crises epiléticas recorrentes e espontâneas (CREs). A Epilepsia do Lobo Temporal Mesial (ELTM) é a forma mais comum em adultos e muitas vezes é resistente aos tratamentos disponíveis. Por isso, é urgente encontrar novas opções terapêuticas. Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa indicaram que o Solutol® HS 15 (SOL), um excipiente farmacêutico usado como surfactante e carreador de fármacos, poderia ter ação anticonvulsivante e antiepileptogênica. Neste estudo, investigamos essa possibilidade usando um modelo animal de *Status Epilepticus* (SE) induzido por pilocarpina. Assim, o objetivo foi avaliar se o SOL: i. reduz as crises epiléticas durante o SE e na fase crônica da epileptogênese, ii. reduz a neurodegeneração e, iii. modula a expressão de genes associados a epileptogênese. Para isso, ratos da linhagem Wistar foram pré-tratados com SOL (grupos experimentais) ou solução salina (SAL) (grupos de controle) por administração intrahipocampal (I.H.) ou intraperitoneal (I.P.), e depois submetidos a 90 minutos de SE. Após 24 horas do SE, os animais foram eutanasiados para as análises histológicas e moleculares. Na fase crônica, animais epiléticos receberam tratamento com SOL ou SAL por via intraperitoneal durante 15 dias. Todos os animais foram monitorados por vídeo durante SE, latência e fase crônica, e as crises epiléticas foram avaliadas usando a escala de Racine. A neurodegeneração hipocampal total e em suas sub-regiões (Corno de Ammon: CA1 e CA3; e hilo) foi avaliada com Fluoro-Jade. A expressão de transcritos associados à epileptogênese foi medida por RT-qPCR. A análise estatística foi realizada com o programa GraphPad, Prism 9.0. Dessa forma, o pré-tratamento com SOL reduziu o número total de crises durante o SE em 38,97% (via I.H.) e 60,87% (via I.P.), a neurodegeneração hipocampal total (29,07% a 66,62%) em todos os modelos testados. Além disso, animais pré-tratados com SOL tiveram um aumento e diminuição na expressão de BDNF (via I.H.) e GFAP (via I.P.), respectivamente, indicando efeito neuroprotetor. Portanto, o estudo mostra que o SOL tem efeitos anticonvulsivantes durante as fases aguda e crônica da epileptogênese, bem como reduz a neurodegeneração hipocampal e modula a expressão de *BDNF* e *GFAP*. Esses achados são promissores para o potencial efeito antiepileptogênico do SOL no tratamento da epilepsia.

Palavras-chave: Epilepsia. Solutol. Neuroproteção. Anticonvulsivante.

ABSTRACT

Epilepsy is a neurological disorder characterized by a chronic predisposition of the brain to generate spontaneous recurrent seizures. Mesial Temporal Lobe Epilepsy (MTLE) is the most common form in adults and often resistant to available treatments. Therefore, finding new therapeutic options is urgent. Previous studies by our research group have indicated that Solutol® HS 15 (SOL), a pharmaceutical excipient used as a surfactant and drug carrier, could have anticonvulsant and antiepileptogenic action. In this study, we investigated this possibility using an animal model of pilocarpine-induced *status epilepticus* (SE). Thus, the objective was to evaluate if SOL: i. reduces epileptic seizures during SE and in the chronic phase of epileptogenesis, ii. reduces neurodegeneration process, and iii. modulates the expression of genes associated with epileptogenesis. Male Wistar rats were pre-treated with SOL (experimental groups) or saline solution (SAL) (control groups) by intrahippocampal (I.H.) or intraperitoneal (I.P.) administration and then submitted to 90 minutes of SE. After 24 hours of SE, the animals were euthanized for histological and molecular analyses. In the chronic phase, epileptic animals received SOL or SAL treatment intraperitoneally for 15 days. All animals were monitored by video during SE, latency, and chronic phase, and their seizures were evaluated using the Racine scale. Total hippocampal neurodegeneration and in its sub-regions (Cornu Ammonis: CA1 and CA3; and hilus) were evaluated with Fluoro-Jade. The expression of transcripts associated with epileptogenesis was measured by RT-qPCR. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 9.0 software. Thus, pre-treatment with SOL reduced the total number of seizures during SE by 38.97% (via I.H.) and 60.87% (via I.P.), total hippocampal neurodegeneration (29.07% to 66.62%) in all tested models. Furthermore, animals pretreated with SOL had an increase and decrease in the expression of BDNF (via I.H.) and GFAP (via I.P.), respectively, indicating a neuroprotective effect. Taken together, our study showed that SOL has anticonvulsant effects during the acute and chronic phases of epileptogenesis, as well as reduces hippocampal neurodegeneration and modulates the expression of BDNF and GFAP. These findings are promising for the potential role of SOL in epilepsy treatment.

Keywords: Epilepsy. Solutol. Neuroprotection. Anticonvulsant.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Principais tipos celulares hipocampais que compõem o circuito trisináptico.
- Figura 2. Representação do modelo experimental de epilepsia do lobo temporal em humanos e animais.
- Figura 3. Estrutura Química do Sol.
- Figura 4. Delineamento Experimental.
- Figura 5. Anatomia hipocampal de rato evidenciando as sub-regiões CA1, CA3 e HILO e as profundidades Dorsal, Medial, Ventral.
- Figura 6. Efeito do SOL (I.H.) no Total das Crises Durante o SE e no Total de Cada Tipo de Crise em Modelo de Indução por Pilo (I.H).
- Figura 7. Efeito do SOL (I.H.) na Neurodegeneração em Modelo de Indução de SE em Modelo de Indução de SE por PILO (I.H).
- Figura 8. Efeito do SOL (I.H.) na Redução da Marcação de Neurônios FJ positivos no Hipocampo Contralateral Total e nas Regiões Hipocampais Contralaterais em Modelo de Indução de SE por PILO (I.H).
- Figura 9. Efeito do SOL (I.H.) no Total das Crises Durante o SE e no Total de Cada Tipo de Crise em Modelo de Indução por LI-PILO (I.P).
- Figura 10. Efeito do SOL (I.H.) na Neurodegeneração em Modelo de Indução de SE por LI-PILO.
- Figura 11. Efeito do SOL (I.H.) na Redução da Marcação de Neurônios FJ positivos no Hipocampo Contralateral Total e nas Regiões Hipocampais Contralaterais em Modelo de Indução de SE Por LI-PILO.
- Figura 12. Efeito do SOL (I.H.) na Redução da Marcação de Neurônios FJ Positivos no Hipocampo Ipsilateral Total e nas Regiões Hipocampais Ipsilaterais em Modelo de Indução de SE por LI-PILO.
- Figura 13. Efeito do SOL (I.H.) na Expressão Gênica Hipocampal dos Transcritos dos Genes *Tnf- α* , *Gfap*, *Npy*, *Bdnf* em Modelo de Indução de SE por LI -PILO.
- Figura 14. Efeito do SOL (I.P.) no Total das Crises Durante o SE e no Total de Cada Tipo de Crise em Modelo de Indução por LI-PILO (I.P).
- Figura 15. Efeito Do SOL (I.P.) na Neurodegeneração em Modelo de Indução de SE por LI-PILO.
- Figura 16. Efeito do SOL (I.P.) na Redução da Marcação de Neurônios FJ positivos no Hipocampo Esquerdo total e nas Regiões Hipocampais Esquerdas em Modelo de Indução de SE por LI-PILO.

Figura 17. Efeito do SOL (I.P.) na Redução da Marcação de Neurônios FJ positivos no Hipocampo Direito Total e nas Regiões Hipocampais Direitas em Modelo de Indução de SE por LI-PILO.

Figura 18. Efeito do SOL (I.P.) na Expressão Gênica Hipocampal dos Transcritos dos Genes *Tnf- α* , *Gfap*, *Npy*, *Bdnf* em Modelo de Indução de SE Por LI -PILO.

Figura 19. Avaliação do perfil das CREs no grupo SAL entre os períodos PRÉ-TRAT e TRAT.

Figura 20. Avaliação do perfil das CREs no grupo SAL entre os períodos PRÉ-TRAT e TRAT.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resumo da Nova Classificação da Epilepsia de Acordo com a ILAE (2017).

Tabela 2. Resumo da Nova Classificação Etiológica da Epilepsia segundo a ILAE (2017).

Tabela 3. Modelo Experimental de Epilepsia do Lobo Temporal Induzida por Pilocarpina/Lítio-Pilocarpina.

Tabela 4. Fármacos utilizados na ELTM.

Tabela 5. Sequência dos primers desenhados dos genes selecionados.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP: Antero Posterior
BDNF: Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
CA: Corno de Ammon
DIR: Direito
CEUA: Comissão de Ética de Uso de Animais
CREs: Crises Recorrentes e Espontâneas
CL: Contralateral
DV: Dorso Ventral
ELT: Epilepsia do Lobo Temporal
ELTM: Epilepsia do Lobo Temporal Mesial
EROs: Espécies Reativas de Oxigênio
ESQ: Esquerdo
FAE: Fármaco Antiepiléptico
FJ: Fluoro-Jade
FIG: Figura
GFAP: Proteína Ácida Fibrilar Glial
I.H.: Intrahipocampal
IL: Ipsilateral
ILAE: International League Against Epilepsy
I.P.: Intraperitoneal
Li: Lítio
ML: Médio Lateral
NMDA: N-metilD-aspartato
OATO: polipeptídeos transportadores de ânions orgânicos
OCT: Transportador de cátion orgânico
NPY: Neuropeptídeo Y
NTCP: proteínas co-transportadoras de Na⁺ dependente como taurocolato
PEG: Polietilenoglicol
PEPT: Transportador de polipeptídeo
PFA: Paraformaldeído
PILO: Pilocarpina
SE: *Status Epilepticus*
SNC: Sistema Nervoso Central

SOL: Solutol® HS 15

TAB: Tabela

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral Alfa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1 Epilepsia.....	20
2.2 Epilepsia do Lobo Temporal Mesial.....	23
2.3 Epileptogênese.....	24
2.4 Modelo Experimental Animal de Indução Química de Epilepsia do Lobo Temporal Mesial.....	27
2.5 Tratamento Farmacológico de Epilepsia do Lobo Temporal.....	29
2.6 Excipiente Farmacêutico Solutol HS 15.....	31
3 OBJETIVOS.....	35
3.1 Objetivo Geral.....	35
3.2 Objetivos Específicos.....	35
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1 Divisão dos Grupos Experimentais.....	37
4.2 Cirurgia Estereotáxica para Implante de Cânula para Administração das Drogas pela Via Intrahipocampal.....	37
4.3 Pré-Tratamento com Solutol HS 15 e Indução de Status Epilepticus com Pilocarpina pela Via Intrahipocampal.....	38
4.4 Pré-Tratamento com Solutol Hs 15 e Indução de Status Epilepticus com Lítio- Pilocarpina pela Via Intra-Hipocampal.....	39
4.5 Análise do Perfil das Crises Durante Status Epilepticus.....	39
4.6 Eutanásia por Decaptação para Análise de Expressão Gênica em Tecido Hipocampal.....	39
4.7 Avaliação do Perfil de Expressão Gênica de Genes Associados à Epileptogênese	39
4.8 Eutanásia por Perfusão Transcardial para Histoquímica com Fluoro-Jade.....	41
4.9 Cortes Histológicos e Histoquímica com Fluoro-Jade para Análises de Neurodegeneração Hipocampal.....	41
4.10 Análise do Perfil das Crises Durante a Fase Crônica da Epileptogênese.....	42
4.11 Análises Estatísticas.....	43
5 RESULTADOS.....	44
5.1 Efeito do Pré-Tratamento (30 Minutos) com SOL (I.H.) nas Crises Durante SE e na Neurodegeneração em Modelo de Indução por Pilo (I.H.).....	44

5.2 Efeito do Pré-Tratamento (30 Minutos) com SOL (I.H.) nas Crises Durante SE, na Neurodegeneração e na Expressão Gênica em Modelo de Indução por LI-PILO (I.P)	46
5.3 Efeito Pré-Tratamento (1 Hora) com SOL (I.P.) nas Crises Durante SE, na Neurodegeneração e na Expressão Gênica em Modelo de Indução por LI-PILO (I.P).....	50
5.4 Efeito do Tratamento (15 Dias) com SOL (I.P.) nas Crises Recorrentes e Espontâneas da Fase Crônica da Epileptogênese Induzida por Li-Pilo (I.P).....	54
6 DISCUSSÃO.....	58
7 CONCLUSÃO	63
PERSPECTIVAS.....	64
REFERÊNCIAS	65
ANEXOS	71

1. INTRODUÇÃO

A epilepsia é considerada uma doença do cérebro e a definição requer a ocorrência de no mínimo duas crises epiléticas não provocada ou reflexa ocorrendo com um intervalo superior a 24 horas (Fisher et al., 2014). De acordo com a etiologia, as epilepsias podem ser classificadas como: *i.* genética, causada devido a um resultado direto de uma mutação genética conhecida ou presumida; *ii.* infecciosa, causada por uma infecção no sistema nervoso central (SNC); *iii.* metabólica, causada devido ao resultado direto de um distúrbio metabólico conhecido ou presumido; *iv.* imunológicas, causada quando existe evidência de inflamação do SNC imunologicamente mediada; *v.* estrutural, causada devido a uma lesão do SNC (Scheffer, 2017); e *vi.* causa desconhecida, quando não há possibilidade de desfecho de diagnóstico.

A epilepsia do lobo temporal (ELT) é a forma mais comum da classificação das epilepsias estruturais na população adulta, sendo subdividida em mesial (ou límbica) e lateral (ou neocortical). A epilepsia do lobo temporal mesial (ELTM), o tipo mais frequente, apresenta uma alta farmacoresistência, em que os medicamentos disponíveis no mercado não controlam as crises epiléticas (Liga internacional contra epilepsia, 2017; Henning, et al., 2023).

Na ELTM, o lobo temporal é a área mais importante para o desenvolvimento das crises epiléticas, visto que apresenta uma série de alterações moleculares, morfológicas e fisiológicas como consequência de insultos epileptogênicos, tais como hipóxia, traumatismo craniano, isquemia, malformações arteriovenosas, encefalites autoimune ou viral, anormalidades genéticas esclerose hipocampal, dentre outros (Walker, 2015). O insulto epileptogênico provoca um processo progressivo de alterações morfofisiológicas em estruturas límbicas, o que culmina em uma predisposição permanente do cérebro em gerar crises epiléticas. Esse processo é conhecido como epileptogênese, que cursa com inflamação, estresse oxidativo neuronal, neurodegeneração, neurogênese aberrante e astrogliose (Klein et al., 2017).

As formas de tratamento para o controle e remissão das crises epiléticas são classificadas em farmacológica, primeira escolha para o tratamento, e em não farmacológicas, como uma ressecção cirúrgica do foco epileptogênico, quando os pacientes apresentam farmacoresistência. No estudo de Kurita e colaboradores (2016), foi evidenciado que os pacientes que realizam cirurgia, como a lobectomia ou amígdalo-hipocampectomia seletiva, apresentam uma remissão das crises em até 60-80%.

Entretanto, a opção cirúrgica não é a mais viável para alguns pacientes por questões socioeconômicas ou até médicas, cujos pacientes apresentam sintomas psiquiátricos ou foco epileptogênico bilateral (Elsharkawy et al, 2009).

No mercado, existe um vasto arsenal de medicamentos anticonvulsivantes, conhecidos como drogas antiepilépticas (DAES), porém em torno de 30% dos pacientes são classificados como fármacoresistentes (Wiebe; Jetté, 2012). No estudo de Brodie (2017), ao avaliar pacientes tratados com o uso de DAES durante um período de acompanhamento de quase 30 anos, observaram que apenas 29% dos pacientes ficaram livres de convulsões com a farmacoterapia e, nos 54% restantes, as convulsões ocorriam pelo menos mais de uma vez por mês mesmo com o tratamento contínuo com as DAES. Esse efeito observado pode ser pelo fato dos medicamentos apresentarem mecanismo de ação em canais iônicos/receptores neuronais, mas não apresentarem considerável efeito antiepileptogênico. Dessa forma, torna-se necessário a busca de novas drogas que além de apresentarem efeito anticonvulsivantes, apresentem, também, efeito antiepileptogênico.

O Solutol® HS 15 (SOL), um excipiente farmacêutico constituído por 70% de monoésteres e diésteres e 30% de polietilenoglicol, é utilizado como solubilizante de drogas não hidrossolúveis e em sistemas carreadores de fármacos (Ku; Velagaleti, 2010). Os excipientes farmacêuticos são considerados inertes, porém, estudos têm demonstrado que muitos deles apresentam efeito biológico, o que gera preocupação com eventual efeito sinérgico, interações farmacodinâmicas, potencialização de reações adversas, dentre outros (Ionova; Wilson, 2020; Caballero *et al.*, 2021; Martilez *et al.*, 2022).

Estudos apontam que SOL confere ação neuroprotetora no hipocampo em modelo experimental de isquemia focal e global, como também promove bloqueio de canais de cálcio ativados por hiperforina, de transportadores de cátions e aniônicos orgânicos e inibição *in vitro* da atividade da glicoproteína P (Lin, et al., 2014; Chauvet et al, 2015; Otter et al., 2017; Gurjar et al., 2018). Considerando esses dados que apontam para uma ação na transmissão sináptica e na neuroproteção, o presente estudo teve como objetivo avaliar se SOL apresenta efeito anticonvulsivante e antiepileptogênico em modelo experimental animal de indução de *status epilepticus* e da fase crônica da epileptogênese.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. EPILEPSIA

Os primeiros relatos sobre epilepsia são datados há mais de 3.000 anos na Babilônia, onde se acreditava que as crises epiléticas eram provocadas pela invasão do corpo por demônios, justificando a terminologia epilepsia, derivada do grego *epilambaneim* que significa ser tomado, ser possuído (Kinnier Wilson; Reynold, 1990). Atualmente, a epilepsia é considerada uma doença do cérebro desordem neurológica crônica, caracterizada pela ocorrência de pelo menos duas crises epiléticas não provocada ou reflexa em intervalo superior a 24 horas. (Fisher et al., 2014).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) (2019), a epilepsia é classificada como uma das condições neurológicas mais comuns. Cerca de 50 milhões de pessoas no mundo são portadoras de epilepsia, sendo que, a cada ano, aproximadamente, 5 milhões de pessoas são diagnosticadas com epilepsia. Assim, a epilepsia é um desafio para saúde pública e está associada a problemas biopsicossociais, incluindo preconceito, restrições de estilo de vida, dificuldade de relações sociais, estigmatização, e comorbidades psiquiátricas (ex. transtorno de ansiedade e humor, bem como ideação suicida). Além do mais, a epilepsia impacta no crescimento econômico e no mercado de trabalho (Fiest et al., 2014; Christensen et al., 2023). Em 2010, a OMS classificou a epilepsia como o segundo distúrbio neurológico mais oneroso em todo o mundo em termos de anos de vida ajustados por incapacidade, ficando atrás da enxaqueca (Murray et al., 2012).

A Liga Internacional Contra Epilepsia (LICA) elaborou uma classificação das epilepsias projetada para efetividade clínica com um diagnóstico em três níveis: I. tipo da crise; II. tipo da epilepsia; III. tipo da síndrome, bem como a etiologia da epilepsia (tabela 1) (Scheffer et al, 2017).

Tabela 1- Resumo da nova classificação da epilepsia de acordo com a ILAE (2017).

Classificação da epilepsia	
Tipo da crise	Início focal;
	Início generalizado;
	Início desconhecido.

Tipo da epilepsia	Epilepsia Focal; Epilepsia Generalizada; Epilepsia Focal e Generalizada Combinada; Epilepsia desconhecida.
Tipo da síndrome	Síndrome de West; Síndrome de Dravet; Epilepsia de Ausência Infantil; Epilepsia de Ausência Juvenil; Epilepsia Mioclônica Juvenil; Convulsões Tônico-Clônicas Generalizadas Isoladas.
Tipo da etiologia	Estrutural; Génética; Infecciosa; Metabólicas; Imunológica; Causa desconhecida.

Quanto a etiologia, a epilepsia é uma condição complexa e multifatorial, de forma que a classificação etiológica da epilepsia se torna um desafio médico, visto que muitas vezes o profissional não possui ferramentas necessárias para um bom fechamento do diagnóstico (Sen et al., 2020). Para facilitar o a análise etiológica, a ILAE estabeleceu um sistema de classificação que pode ser visualizado na tabela 2.

Tabela 2- Resumo da nova classificação etiológica da epilepsia segundo a ILAE (2017).

Classificação etiológica da epilepsia	
Estrutural	Causada por lesão estrutural no cérebro que gera um risco de ocasionar a epilepsia. Pode ser classificada como estrutural adquirida como no caso de acidente vascular cerebral, traumatismo e infecção; ou estrutural genética como em malformações do desenvolvimento cortical. É importante

	salientar que apesar de haver uma base genética para estas malformações, é o fator estrutural que determina a existência da epilepsia. Dessa forma, a etiologia de uma lesão estrutural pode ter origem genética, adquirida ou ambas.
Genética	Causada quando a epilepsia é o resultado direto de uma mutação genética conhecida ou presumida, sendo mutações de ganho ou perda de função causadoras da epilepsia.
Infecciosa	Causada após uma infecção, como é o caso da encefalite viral que é causadora de crises epiléticas após a fase aguda da infecção, assim, refere-se a um indivíduo com epilepsia infecciosa.
Metabólica	Causada devido ao resultado direto de um distúrbio metabólico conhecido ou presumido, em que as crises são o sintoma principal. As causas metabólicas referem-se a alterações metabólicas bem definidas com manifestações clínicas ou alterações bioquímicas por todo o corpo como a porfiria, a uremia, as aminoacidopatias ou as crises piridoxino-dependentes. Estima-se que a maioria das epilepsias metabólicas apresentem uma base genética, mas algumas poderão ser adquiridas, tais como a deficiência de folato cerebral.
Imunológica	Causada quando existe evidência de inflamação do SNC imunologicamente mediada. Tais quais as encefalites anti-receptor NMDA (N-metilD-aspartato) e anti-LGI155. Resulta diretamente de uma perturbação imunológica em que as crises são o sintoma principal.
Causa desconhecida	Há muitos indivíduos com epilepsia cuja causa permanece desconhecida. Nesta categoria não é possível fazer um diagnóstico específico, para além da semiologia eletroclínica básica. A determinação da etiologia depende da extensão da avaliação possível em cada indivíduo. Isto difere nos vários níveis de cuidados de saúde e em diferentes países, como em países com baixos recursos de saúde.

Em relação as epilepsias de causa estrutural adquirida, destaca-se a Epilepsia do Lobo Temporal Mesial (ELTM) devido sua importância clínica justificada pela alta incidência, gravidade e, principalmente, refratariedade ao tratamento farmacológico (Berg et al., 2010).

2.2. EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL MESIAL

A ELT é caracterizada como um tipo de epilepsia de início focal com crises que se originam em regiões do lobo temporal, podendo se difundir por uma rede de interconexões neuronais, gerando crises epiléticas generalizadas (Maillard et al., 2004). A ELT é dividida em dois grupos principais: o primeiro e mais comum é a ELTM, quando a crise se origina nas estruturas temporais mesiais, tais quais o hipocampo e amígdala, que são regiões cerebrais denominadas zonas epileptogênicas (Eglot; Konrad; Morgan, 2016). O segundo grupo corresponde a epilepsia do lobo temporal lateral ou neocortical, que afeta o neocórtex temporal, incluindo as junções temporal-occipital e temporal-parietal e as áreas sensoriais associativas para a audição, funções visuais e de linguagem (Kanner *et al.*, 2004).

A ELTM é o tipo mais comum em indivíduos adultos e cerca de 40% dos pacientes continuam apresentando crises epiléticas apesar do tratamento farmacológico ideal (Eglot; Konrad; Morgan., 2016). Além disso, pacientes com ELTM podem apresentar problemas psiquiátricos, comportamentais e cognitivos de modo a interferir na realização das atividades diárias, como trabalhar, estudar, além de afetar as relações intrapessoal e interpessoais, prejudicando a qualidade de vida dos pacientes (Caplan, 2019). Os fatores envolvidos na etiologia da ELTM, denominados insultos epileptogênicos, apresentam diferentes naturezas, a exemplo do traumatismo craniano, infecções cerebrais como meningite e encefalites, convulsão febril, displasias, hiperplasias, esclerose hipocampal, *Status Epilepticus* (SE), dentre outros. Quando um indivíduo sofre um insulto epileptogênico e apresenta predisponibilidade genética, seu cérebro passará por um processo chamado de epileptogênese que corresponde a um conjunto de alterações de expressão gênica, morfológica e fisiológica (Junna *et al.*, 2013; Garganis *et al.*, 2019). Essas alterações envolvem mudanças moleculares e celulares, incluindo alterações na atividade de canais iônicos, modificação das funções das proteínas, eventos transcripcionais, morte celular, ativação de cascatas inflamatórias, neurogênese,

brotamento de fibras musgosas e gliose, que contribuem para o desequilíbrio excitatório-inibitório neuronal, responsável pela ocorrência das crises epiléticas (Klein, et al., 2017). Vale ressaltar que o achado mais comum associado à ELTM é a esclerose hipocampal, decorrente de uma neurodegeneração, principalmente, no hipocampo (Tatum, 2012). Essas alterações estão localizadas com maior intensidade no hilo do giro dentado e nas camadas de células piramidais CA1 e CA3, embora todas as regiões do hipocampo podem apresentar perda de células neuronais em graus variados (Bote et al., 2008). O dano do hipocampo associado à ELT é frequentemente bilateral, mas assimétrico, uma vez que um hipocampo é mais danificado do que o outro (Wieser, 2004). Interessantemente, alterações que ocorrem na epileptogênese descritas em humanos, também, são descritas em animais por meio do estabelecimento de modelos experimentais.

2.3. EPILEPTOGÊNESE

A epileptogênese é um período entre a ocorrência do insulto epileptogênico e o surgimento da primeira CRE. Entretanto, alguns autores consideram que a epileptogênese se estende além do período latente, visto que a frequência e a gravidade das crises aumentam progressivamente ao longo do tempo, indicando a continuidade desse processo (Pitkänen et al., 2015). Assim, a epileptogênese ocorre de modo progressivo e prolongado de tal forma que as alterações moleculares e celulares que desencadeiam a ocorrência da primeira crise persistem, levando a uma progressão no quadro epilético (Williams *et al.*, 2009; Pitkänen; LUKASIUK, 2011).

Os estudos da epileptogênese em seres humanos são mais difíceis, visto que é necessário a avaliação dos pacientes a partir do momento de um evento epileptogênico que pode não ser identificado, até o início da ocorrência das CREs. Além disso outros aspectos também dificultam as investigações em humanos, a exemplo da heterogeneidade da epilepsia, da dinâmica das alterações moleculares ao longo da epileptogênese e do difícil acesso a tecidos cerebrais. Dessa forma, para contornar essa situação, estudos animais em modelos experimentais são ferramentas importantes para elucidação desse processo (Pitkänen; Engel, 2014).

O processo de epileptogênese em humanos e em animais experimentais está intimamente relacionado ao processo neuroinflamatório e neurodegenerativo mediado por alterações da expressão gênica que culminam na hiperexcitabilidade neuronal. Dentre essas mudanças, destacam-se as que atingem os receptores metabotrópicos de glutamato

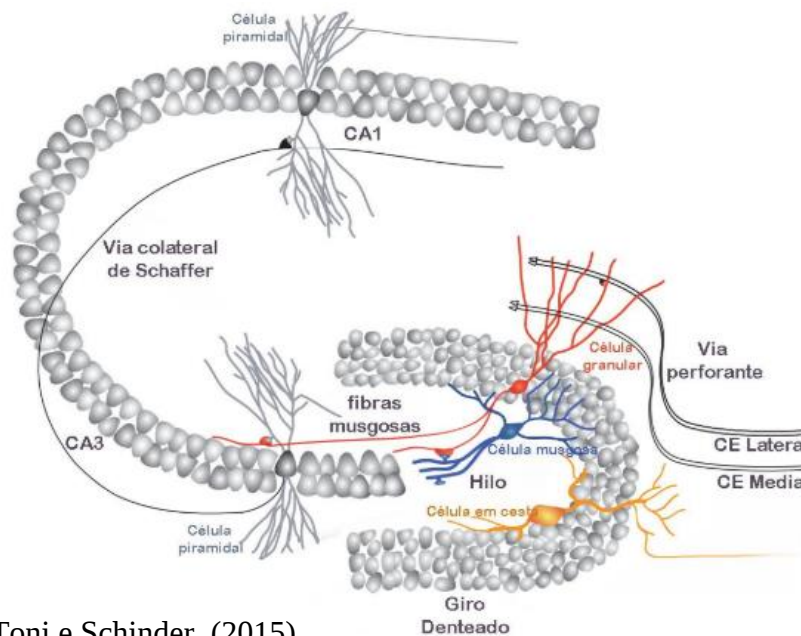
(mGluRs) e suas vias de transdução de sinal, de recaptação e reciclagem do glutamato entre neurônios e astrócitos. Além disso, a disfunção astrocítica e a gliose são também relevantes, pois interrompem o equilíbrio dos íons e neurotransmissores ao redor das redes astrogliais (Qian; Tang, 2016). A indução de uma crise epilética leva a ativação de células gliais, que alteram a expressão gênica, produzindo e liberando moléculas inflamatórias, tais como interleucina-1 β (IL-1 β), IL-6 e fator de necrose tumoral- α (*TNF- α*). O *TNF- α* apresenta uma ação inflamatória e degenerativa que pode reduzir o limiar convulsivo, além de predispor o cérebro à perda neuronal induzida por crise epilética (De Simoni et al., 2000). Além disso, um marcador importante de disfunção astrocitária é a proteína glial fibrilar ácida (*GFAP*), um filamento intermediário, que apresenta uma superexpressão associada a inflamação e a morte neuronal, caracterizando a chamada astrogliose (Diaz-Arrastia *et al.*, 2014; Do Nascimento et al., 2012). A inflamação, de fato, desempenha um papel significativo na progressão da epileptogênese no qual reduz o limiar para o início de crises epiléticas e torna-se ainda mais exacerbado em condições de SE (Wei et al., 2017).

A morte das células neuronais, o mau funcionamento das sinapses e o início da hiperexcitabilidade são sintomas de lesão cerebral causada por concussões, hipóxia ou convulsões febris. A liberação de citocinas, quimiocinas, mediadores lipídicos e protetinas no ambiente neuronal indica que o trauma cerebral causou uma cascata organizada de processos biológicos. Dependendo da parte do cérebro afetada, a desregulação desses mediadores e a expressão de seus receptores pode resultar em sintomas clínicos que incluem lesão neuronal permanente (Rana; Musto, 2018).

Dentre as alterações celulares, destaca-se a perda de neurônios hipocampusais. Sendo assim, o hipocampo é dividido em regiões: CA1, CA2, CA3 e CA4, que variam em tamanho e quantidade de células nervosas. A camada de células piramidais do CA é subdividida, lateromedialmente, em CA1, CA2 e CA3, definidas pelo tamanho e morfologia dos neurônios piramidais (Amaral, 2006). Os corpos celulares ocupam a camada das células piramidais e as árvores dendríticas desses neurônios, são elaboradas e ramificadas e se estendem perpendicularmente em ambas as direções, apical e basal, para fora da camada, classificando esses neurônios como bipolares. CA4, conhecida como o hilo do GD, apresenta uma camada de células polimórficas (Grooms *et al.*, 2000). O córtex entorrinal é considerado o ponto inicial do circuito por onde chega à informação sensorial através dos axônios que compõem a via perfurante e entram em contato com a

camada molecular. As células granulares projetam fibras musgosas para os neurônios piramidais em CA3, que por sua vez projetam através da via colateral de Schaffer para os neurônios piramidais em CA1. Interneurônios no hilo e camada molecular participam modulando a atividade das células granulares (Toni e Schinder, 2015). A figura 1 evidencia uma visão transversal do hipocampo onde se encontram as principais células que compõem o circuito trisináptico.

Figura 1. Principais tipos celulares hipocâmpais que compõem o circuito trisináptico.



Fonte: Toni e Schinder, (2015).

Curiosamente, a neurodegeneração na região do hilo parece desencadear consequências de lesões iniciais primárias e progressão da epileptogênese. De fato, a perda de neurônios hilares corresponde a uma condição histopatológica geral de esclerose mesial temporal (Dudek; Sutula, 2007; Margerison; Corsellis, 1966).

Por outro lado, além dos mecanismos indutores de inflamação, estresse oxidativo, degeneração, mecanismos de caráter antiepileptogênico ocorrem no âmbito celular como tentativa do reestabelecimento da homeostase neural. Scharfman e colaboradores (2005) demonstraram que a expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (*BDNF*) produz plasticidades estruturais das células granulares dentadas do hipocampo, promovendo neurogênese hipocámpal. Paradiso e colaboradores (2009), por sua vez, demonstraram que quando injetado diretamente em hipocampo com esclerose, *BDNF* proporcionou recuperação significativa de dano neuronal e redução significativa da ocorrência das

CREs. Além do mais, em hipocampo lesionado por crises epiléticas prolongadas, *BDNF* repara a neurodegeneração, melhorando, significativamente, a história natural da doença (Paradiso et al., 2009).

Dentre outros mecanismos, vale destacar o papel do neuropeptídeo Y (*NPY*) na epileptogênese, amplamente expresso no sistema nervoso, sobretudo no hipocampo. O *NPY* é um dos neuropeptídeos mais estudados em epilepsia, pois induz neurogênese hipocampal e inibe a transmissão sináptica glutamatérgica nas áreas CA1 e CA3. As crises epiléticas aumentam o nível de *NPY* em interneurônios hipocampais do neurotransmissor ácido gama-aminobutírico (GABA), um neurotransmissor inibitório do SNC, sugerindo um papel anticonvulsivante. (Schwartzkroin, 1994; El Bahh *et al.*, 2005; Takahashi *et al.*, 2000; SUN et al., 2018).

2.4. MODELO EXPERIMENTAL ANIMAL DE INDUÇÃO QUÍMICA DE EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL MESIAL

Um importante modelo experimental para epilepsia se baseia na indução de SE em roedores. Existem diferentes protocolos de indução, sendo os mais comuns os que utilizam estimulações com quimiconvulsivantes (ácido caínico e pilocarpina), ou estimulação elétrica em estruturas cerebrais (Hellier *et al.*, 1998).

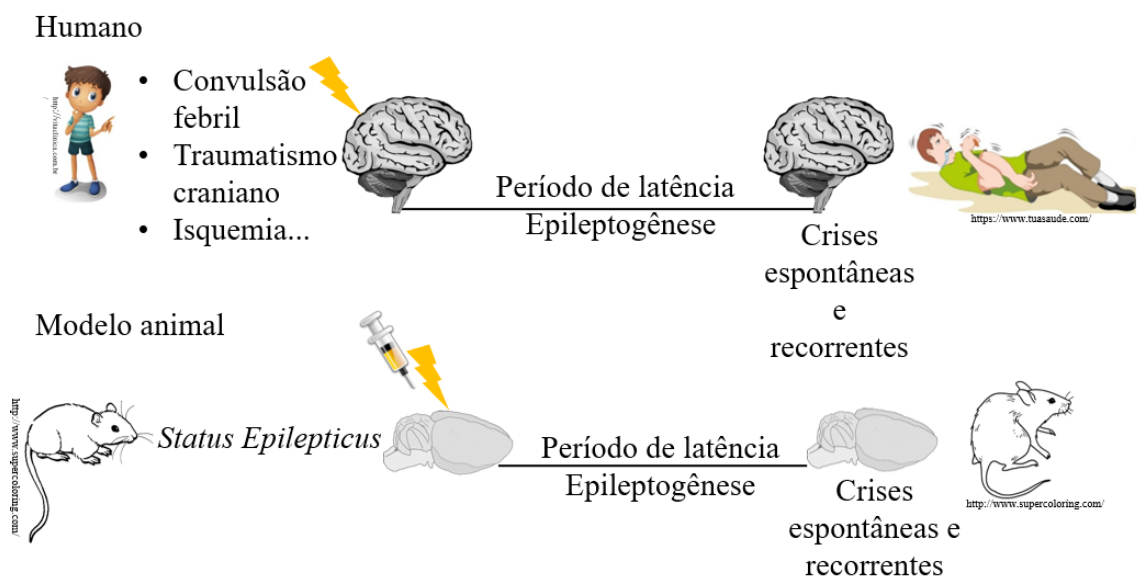
O uso de modelo experimental animal tem como objetivo obter informações que possam beneficiar as pesquisas clínicas em humanos, visto que ensaios pré-clínicos podem ser realizados para investigar a segurança e eficácia de novos procedimentos e medicamentos (Pound; Ritskes-Hoitinga, 2018). Dessa forma, o uso do modelo que mais se aproxima da história natural descrita em pacientes (Leite *et al.*, 1990) é o que representa a melhor escolha para medicina translacional, a exemplo de SE induzido por Pilocarpina (PILO). A administração intraperitoneal ou intrahipocampal da PILO, um fármaco agonista colinérgico muscarínico que gera o início da ocorrência das crises sendo mantida por meio de ação glutamatérgica (Turski *et al.*, 1983) resulta em SE caracterizado por um padrão de crise límbica autossustentada do tipo tônico-clônica contínua com duração de cinco ou mais minutos ou uma série de convulsões sem recuperação entre elas (Trinka; Kälviäinen, 2017).

O SE atua como um insulto epileptogênico, tornando o cérebro do animal susceptível a ocorrência das primeiras CREs, que surgem em média entre duas e três semanas após a reversão do SE. Esse modelo pode ser potencializado com administração

de Cloreto de Lítio (LiCl) para intensificar a ação da PILO, sendo chamado, então, de modelo experimental de ELT induzido por Lítio-Pilocarpina (LI-PILO) (De Bruin et al., 2000). Assim, a indução de SE promove anormalidades subsequentes que compartilham achados patológicos semelhantes à ELTM em humano, tais como neurodegeneração, processos inflamatórios, estresse oxidativo, reorganização da expressão gênica como atividade astrocitária anormal com aumento dos níveis de *GFAP* que causa efeito adverso na morfologia, atividade metabólica, eletrofisiologia e síntese de proteínas por exemplo (Mazzuferi *et al.*, 2012; Marques-Carneiro *et al.*, 2017; Damayer *et al.*, 2011; Alese; Mabandla, 2019).

Similarmente ao descrito em pacientes, o processo epileptogênico induzido no modelo LI:PILO apresenta três fases: i. aguda, correspondente ao período entre 6 horas e 24 horas após a reversão do SE; ii. latente, com duração aproximada de 7 a 42 dias após a reversão do SE, período no qual não ocorrem crises epiléticas; e iii. uma fase crônica, caracterizada pela ocorrência de CREs (Reddy; Kuruba, 2013). A figura 1 apresenta um esquema mostrando a similaridade do processo de desenvolvimento da ELTM em humanos e em modelo experimental. A tabela 3 evidencia os modelos experimentais da ELTM.

Figura 2. Representação do modelo experimental de epilepsia do lobo temporal em humanos e animais.



Fonte: Autora.

Tabela 3 - Modelo experimental de ELT induzida por pilocarpina/Lítio-Pilocarpina.

Fase	Características
Aguda	Corresponde às primeiras 24 horas imediatamente após o SE, início do estabelecimento da epileptogênese.
Latente	Manutenção das alterações epileptogênicas tais quais histológicas, fisiológicas, de expressão gênica, dura de dias a meses, sem a ocorrência das CREs.
Crônica	Manutenção das alterações epileptogênicas e ocorrência das CREs, semelhante às crises apresentadas nos pacientes com ELTM.

Portanto, nesse modelo, a avaliação do efeito de drogas experimentais pode ser realizada com diferentes finalidades terapêuticas: I. administração da droga experimental antes da indução do SE, por exemplo, pode ser feita com o objetivo de identificar drogas com ação anticonvulsivante e antiepileptogênica prevenindo e/ou amenizando a ocorrência do SE e os danos neuronais causados pelo SE. II. administração da droga experimental na fase latente, a fim de identificar drogas que tenham efeito de controlar e/ou abolir as alterações do processo epileptogênico induzida pelo SE para evitar o surgimento das CREs; III. a administração da droga experimental durante o período crônico tem como objetivo testar drogas que apresentem efeito em controlar e/ou abolir as CREs (Leite *et al.*, 2002). Assim, tendo em vista as justificativas para se utilizar esses modelos, têm-se pesquisas de novas drogas com potencial efeito anticonvulsivante e antiepileptogênico.

2.5. TRATAMENTO FARMACOLÓGICO DA ELT

Segundo Engel (2016), o objetivo do tratamento farmacológico para epilepsia é o controle das crises epiléticas, com um menor efeito colateral e uma efetividade mais rápida. Entretanto, pacientes com ELTM apresentam uma alta farmacoresistência, em que cerca de 40% dos indivíduos com epilepsia permanecem apresentando crises epiléticas mesmo em tratamento farmacológico.

A escolha do medicamento anticonvulsivante deve ser individualizada em consulta com um neurologista e baseada em fatores como tipo de crise, presença de síndrome epilética, uso de outros medicamentos, presença de comorbidades, estilo de vida e preferência do paciente (Glauser *et al.*, 2013). A farmacoterapia inicia-se com o uso de um medicamento (monoterapia) e, em caso de não responsividade, seguir para a combinação de dois ou mais medicamentos (politerapia) (Dipiro *et al.*, 2017). Insta notar que interações medicamentosas devem ser mantidas sob atenção, visto que maioria dos medicamentos anticonvulsivantes apresentam índice terapêutico estreito e muitos afetam a atividade das enzimas metabolizadoras de medicamentos, podendo ocasionar interações entre drogas antiepiléticas, ou entre drogas antiepiléticas com outras drogas (Patsalos; Perucca, 2003).

Os medicamentos anticonvulsivantes se diferenciam de acordo com seu mecanismo de ação, atuando, principalmente, em canais iônicos ou receptor gabaérgico ou glutamatérgico. No tratamento da ELTM, a carbamazepina tem sido um fármaco de primeira escolha para adultos, enquanto a lamotragina e gabapentina, por sua vez, mostraram-se mais efetivas em idosos. Além disso, o ácido valproico, fenitoína e fenobarbital são outros fármacos amplamente utilizados na prática clínica. A tabela 4 evidencia o mecanismo de ação desses fármacos (Brasil, 2019).

Tabela 4- Fármacos utilizados na ELTM.

Fármaco	Mecanismo de ação
Carbamazepina e Lamotragina	Agem bloqueando canais de sódio dependente de voltagem.
Gabapentina	Apresenta sítio de ligação a proteína alfa-2-gama, uma subunidade dos canais de cálcio dependentes de voltagem.
Ácido Valproico	Age na redução da atividade de canais de sódio, ativação da condutância do potássio e elevação do GABA por inibição da GABA-transaminase, aumento das enzimas sintetizadoras do GABA, aumento da liberação e inibição da recaptação do GABA.

Fenitoína	Age no bloqueio dos canais de sódio dependentes de voltagem e na inibição da recaptação do GABA
Fenobarbital	Age no bloqueio dos canais de sódio dependentes de voltagem, prolongamento da abertura dos canais de cloreto e receptores de GABA-A, gerando hiperpolarização da membrana pós-sináptica, bloqueio de canais de sódio e potássio, redução do influxo de cálcio pré-sináptico.

Fonte: Brasil (2019).

Além desses fármacos, existem outros que podem ser empregados, também, em casos de crises focais e/ou generalizadas. Entratanto, Brodie (2017), ao avaliar pacientes tratados com o uso de DAES durante um período de acompanhamento de quase 30 anos, observou que apenas cerca de 29% dos pacientes ficaram livres de convulsões com a farmacoterapia e, nos 54% restantes, as convulsões ocorriam pelo menos mais de uma vez por mês mesmo com o tratamento contínuo com as DAES, possivelmente, devido aos medicamentos apresentarem mecanismo de ação em canais iônicos/receptores neuronais, mas não apresentarem considerável efeito antiepileptogênico. Dessa forma, torna-se necessário a busca de novas drogas que além de apresentarem efeito anticonvulsivantes, apresentem efeito antiepileptogênico.

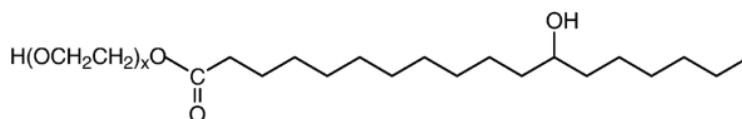
2.6. EXCIPENTE FARMACÊUTICO SOLUTOL® HS 15

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), “os medicamentos são produtos farmacêuticos, tecnicamente obtidos ou elaborados, com finalidade profilática, curativa, paliativa ou para fins de diagnóstico” (Brasil, 1973). O fármaco corresponde ao insumo ativo presente no medicamento, a substância que apresenta efeito terapêutico, já o excipiente, corresponde ao insumo inerte, ou seja, não apresenta efeito terapêutico, mas atua como adjuvante farmacotécnico com finalidades diversas, incluindo agente desintegrante, diluente, lubrificante, suspensor, emulsificante, flavorizante, corante, estabilizante químico.

Apesar dos excipientes serem considerados inertes, estudos demonstram que eles têm a habilidade de influenciar a taxa da absorção de fármacos (Aulton, Taylor et al., 2016). De fato, por muito tempo, acreditou-se que os excipientes farmacêuticos são inertes, porém, estudos têm demonstrado que excipientes podem apresentar efeito biológico, o que instiga a realização de estudos visto que em determinadas formulações de medicamentos, a junção de fármacos e excipientes podem promover possibilidades de efeito sinérgico, interações farmacodinâmicas, potencialização de reações adversas, dentre outros quando associados um fármaco a determinados excipientes (Ionova; Wilson, 2020; Caballero et al., 2021; Martilez et al., 2022).

O Solutol® HS 15 (SOL) é um excipiente farmacêutico produzido por meio da reação entre o ácido 12-hidroxiesteárico com polietilenoglicol. Essa reação gera como produto o ácido 12-hidroxiesteárico polioxietilado, o qual consiste em aproximadamente 70% de monoésteres e diésteres de ácido 12-hidroxiesteárico, bem como cerca de 30% de polietilenoglicol, segundo o fabricante *BAFS Global*. Assim, SOL apresenta uma porção hidrofílica (polietilenoglicol) e uma porção lipofílica (monoésteres e diésteres de ácido 12-hidroxiesteárico) (Bhaskar et al., 2015). A figura 2 mostra a estrutura química do SOL.

Figura 3. Estrutura química do Solutol® HS 15.



FONTE: (Buggins et al., 2007)

Além disso, o fabricante relata que SOL é um surfactante não iônico e agente emulsificante utilizado em várias formulações tais quais em administração intravenosa para solubilizar propanidida em panitol (agente anestésico), vitamina K1 e diclofenaco. Ku e Velagaleti (2010) demonstraram que SOL é utilizado como solubilizante em formulações com fármacos como miconazol, alfaxalona, nifedipina e piroxicam.

Entretanto, além de apresentar utilização em formulações farmacotécnicas, estudos tem demonstrado que SOL apresenta efeitos biológicos, dentre os quais, efeito de interferir na farmacocinética de fármacos como é possível observar no estudo de Buggins e colaboradores (2007), no qual é evidenciado o efeito de SOL no metabolismo de

midazolam reduzindo a depuração dos substratos CYP3A, no metabolismo e a farmacocinética da colchicina visto que promove diminuição significativa na depuração e um aumento na concentração plasmática máxima da colchicina. Além disso, SOL reduz a concentração inibitória (IC) 50 da colchicina, vinblastina e doxorubicina e interfere na ligação a lipoproteínas plasmáticas que pode influenciar na maior permanência de fármacos na circulação sanguínea. Essas características geram preocupação na escolha de um excipiente para formulação de medicamentos, visto que excipientes farmacêuticos ativos no organismo podem gerar erros na interpretação de dados farmacocinéticos e interações medicamentosas indesejáveis (Otter et al., 2017).

O estudo de Lin e colaboradores (2014) demonstrou que o pré-tratamento e tratamento com SOL (2 mL/ Kg) (30%/70%, SOL/SAL, v.v.) pela via intraperitoneal (i.p.) em ratos machos wistar promoveram neuroproteção hipocampal na região CA1 em modelo de isquemia cerebral focal e global. Ademais, SOL pode influenciar a sinalização celular de cálcio no cérebro, pois causa inibição do transporte de cálcio através de canais ativado por hiperforina em células neurais (Chauvet et al., 2015). Além disso, SOL apresenta efeito de inibir os transportadores de cátions orgânicos (OTC 1-3) e os transportadores de oligopeptídeos (PEPT 1 e 2) (OTTER et al., 2017). SOL também é capaz de inibir a glicoproteína P, transportadores ABC e de soluto (SLC), características importantes na modulação de farmacoresistência (Gurjar et al., 2018).

Estudos têm mostrado a toxicidade de SOL. Stoke e colaboradores (2013) que demonstrou que SOL associado a polietilenoglicol em formulação SOL/PEG400 (30%/70%, respectivamente), administrado por 91 dias uma vez ao dia por gavagem oral na dose de (10 mL/kg) em ratos machos e fêmeas e na formulação SOL/PEG 400 (10/90% ou 30/70%) em doses de (2 ou 5 mL/kg/d) administrado durante 28 dias uma vez ao dia por gavagem oral em cadelas beagle não apresentou efeitos de toxicidade. Ali e Kolter (2019) evidencia que SOL é um solubilizante usado em: *i.* formulação parenteral injetáveis como intravenosa, intramuscular, subcutânea; *ii.* formulação oral, como veículo na entrega de moléculas encapsuladas em micelas ou microemulsões; *iii.* sistemas autoemulsificantes de administração de medicamentos; e *iv.* nanopartículas à base de lipídio. Eles indicaram que o SOL apresenta segurança e ausência de toxicidade.

Dessa forma, diante das atividades biológicas apresentadas pelo excipiente SOL, o presente estudo teve como hipótese que o SOL apresenta efeito biológico no modelo experimental de ELTM induzida por lítio-pilocarpina, considerando que na

epileptogênese ocorre desequilíbrio excitatório/inibitório de neurotransmissores e influxo e efluxo de substâncias como cálcio que pode ser citotóxico em acúmulo celular, neurodegeneração hipocampal, reorganização da expressão gênica. Portanto, esse trabalho teve como objetivo investigar a atividade do SOL na fase aguda e crônica da epileptogênese em modelo experimental de ELTM.

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar o efeito do SOL em modelo experimental de epilepsia do lobo temporal mesial.

3.2 ESPECÍFICOS

1. Avaliar o efeito do pré-tratamento com SOL administrado pela via intrahipocampal e intraperitoneal na (s):

- crises durante SE;
- neurodegeneração durante a fase aguda da epileptogênese;
- expressão dos transcritos *GFAP*, *TNF- α* , *NPY*, *BDNF*, durante a fase aguda da epileptogênese.

2. Avaliar o efeito do tratamento com SOL administrado pela via intraperitoneal nas CREs da fase crônica da epileptogênese.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. DIVISÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

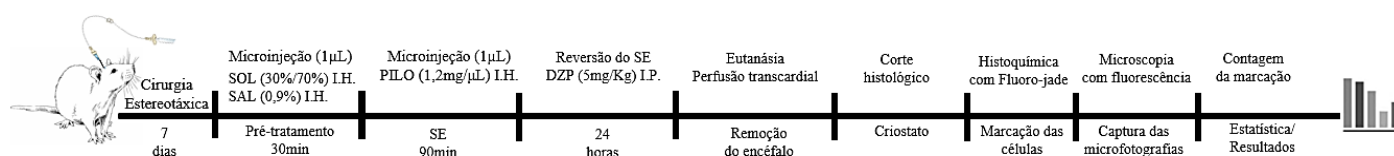
Os animais utilizados nesse estudo foram ratos da linhagem Wistar com idade entre 60 e 70 dias e peso entre 250 e 300g provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas (UFAL). Os animais foram alocados em gaiolas contendo no máximo 5 animais com acesso livre à água e ração e mantidos no biotério setorial do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde com temperatura de $\pm 22^{\circ}\text{C}$ e com ciclo de 12 horas claro/escuro (6h/18h). Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética de Uso de Animais da UFAL sob nº 37/2017; 14/2019 (ANEXO).

Os animais foram divididos em grupos experimentais de acordo com: *i.* o tipo de modelo de indução das crises: com pilocarpina (PILO) ou lítio-pilocarpina (LI-PILO); *ii.* a via de administração [intrahipocampal (I.H.) ou intraperitoneal (I.P)]; *iii.* o tipo de tratamento com SOL em pré-tratamento (I.H.) 30 minutos antes da indução de SE com PILO (I.H.); pré-tratamento (I.H.) 30 minutos antes indução de SE com LI-PILO (I.P.); pré-tratamento (I.P.) 1 hora antes da indução de SE com LI-PILO (I.P.); tratamento (I.P.) durante 15 dias consecutivos na fase crônica da epileptogênese induzida por LI-PILO (I.P.); *iv.* animais que receberam administração de SOL (grupos experimentais) ou veículo solução salina a 0,9% (SAL) (grupos controles) e naive. Sendo assim, as nomenclaturas para os grupos ficaram dispostas em: SOL (I.H.) + PILO (I.H.), SAL (I.H.) + PILO (I.H.), SOL (I.H.) + LI-PILO, SAL (I.H.) + LI-PILO, SOL (I.P.) + LI-PILO, LI-PILO, PRÉ-TRAT, TRAT, PÓS-TRAT.

Figura 4. Delineamento Experimental.

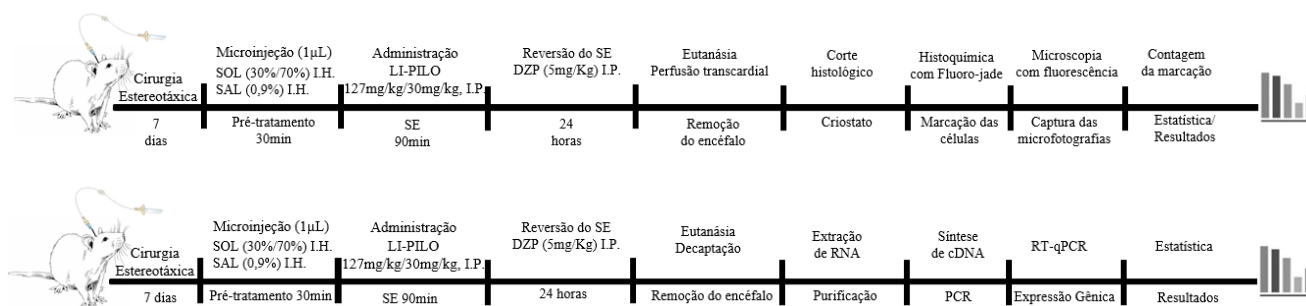
Pré-tratamento com SOL (I.H.) e indução do SE com PILO (I.H.)

Avaliação do perfil das crises e neurodegeneração



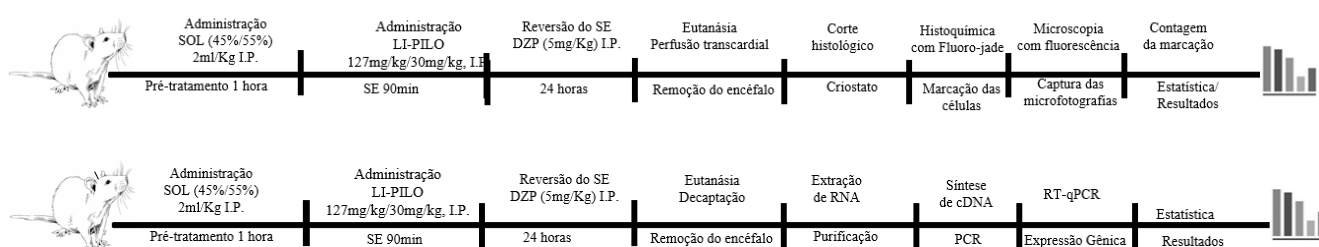
Pré-tratamento com SOL (I.H.) e indução do SE com LI-PILO (I.P.)

Avaliação do perfil das crises, neurodegeneração e expressão gênica



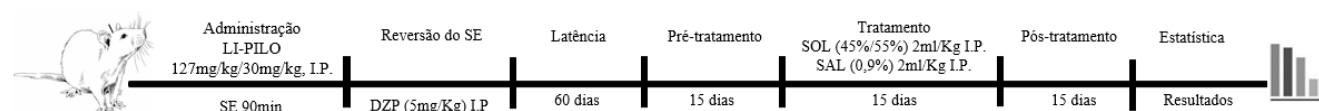
Pré-tratamento com SOL (I.P.) e indução do SE com LI-PILO (I.P.)

Avaliação do perfil das crises, neurodegeneração e expressão gênica



Tratamento com SOL e indução do SE com LI-PILO (I.P.)

Avaliação do perfil das crises nas fases de pré-tratamento, tratamento e pós-tratamento



Fonte: imagem rato- <https://depositphotos.com/br/vectors/rat-silhouette.html/> imagem gráfico- <https://www.ingeniovirtual.com/tipos-de-graficos-y-diagramas-para-la-visualizacion-de-datos/>

4.2. CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

Para o pré-tratamento com SOL (i.h), os animais passaram por procedimento cirúrgico para implante de uma cânula no hilo do giro dentado esquerdo. Para isso, os animais foram anestesiados com 0,08mL/100g de cetamina (i.p.) e 0,04mL/100g de xilazina (i.p.). Para verificar a efetividade da anestesia, observou-se a presença de reflexo através do aperto de pata. Posteriormente, os animais foram tricotomizados na cabeça, fixados no estereotáxico, e receberam injeção subcutânea de lidocaína (0,2 ml por animal), anestésico local, e administração de pentabiótico (0,1/100g) administrado na via intramuscular (i.m.) antes do início da cirurgia. A cânula foi implantada estereotaxicamente seguindo as coordenadas de (Paxinos & Watson, 1996): Hilo do giro

denteado do hipocampo esquerdo – 6,30mm Antero posterior (AP) (em relação ao bregma); 4,50mm médio lateral (ML) (em relação ao seio sagital) e - 4,50mm dorsoventral (DV) (em relação à dura-máter), de acordo com Furtado et al., (2002). Após a cirurgia, um mandril de fio de aço foi utilizado para fechar a cânula, a fim de evitar obstrução e infecção. Os animais permaneceram por 7 dias no biotério setorial para recuperação pós-cirúrgica.

4.3. PRÉ-TRATAMENTO COM SOLUTOL® HS 15 E INDUÇÃO DE STATUS EPILEPTICUS COM PILOCARPINA PELA VIA INTRAHIPOCAMPAL

O SOL utilizado neste estudo foi fabricado pela Sigma-Aldrich (com nome comercial de Kolliphor® HS 15) e foi obtido por colaboração com o Laboratório de Farmacologia e Imunidade (LAFI/UFAL). Assim, SOL foi aquecido em 37°C e diluído em SAL na proporção (30%/70%, respectivamente) seguindo o protocolo de (Lin, et al 2015). Os animais que receberam administração de SOL pela via i.h. passaram por microinjeção com infusão de 1µL de SOL através de uma seringa Hamilton de 5µL com velocidade de 0,5µL/minuto no hipocampo esquerdo do animal 30 minutos antes da administração de 1µL de PILO (1,2mg/µL) para a indução de SE com PILO (i.h.). O grupo controle recebeu microinjeção de 1µL de SAL 0,9% (i.h.).

4.4. PRÉ-TRATAMENTO COM SOLUTOL® HS 15 E INDUÇÃO DE STATUS EPILEPTICUS COM LÍTIO-PILOCARPINA PELA VIA INTRAPERITONEAL

Nesse delineamento experimental, SOL foi aquecido em 37°C e diluído em SAL na proporção (45%/55%, respectivamente) de acordo com ajuste de dose arbitrária para administração sistêmica (i.p.). Assim, os animais receberam administração de SOL (2mL/Kg, i.p) 1 hora antes da indução do SE com LI-PILO (i.p.). Para a indução do SE, seguiu-se o protocolo em que os animais foram submetidos à administração de cloreto de lítio (127mg/kg, i.p.) 16 horas antes da administração da PILO. O butilbrometo de escopolamina (1mg/kg, i.p.) foi aplicado 30 minutos antes da administração de PILO para reduzir os efeitos da ação da PILO em receptores muscarínicos periféricos. Após 30 minutos da aplicação da escopolamina, foi administrada PILO (30mg/kg, i.p.) para a indução do SE. O SE foi mantido durante 90 minutos e, ao término do tempo, os animais receberam administração de diazepam (5mg/kg, i.p.) para reverter o SE. Os animais foram vídeomonitorados em câmera (DCR-SR68- Sony Brasil LTDA) a partir do momento da

administração de PILO até o término do SE para posterior análise do perfil das crises epilépticas.

4.5. ANÁLISE DO PERFIL DAS CRISES DURANTE *STATUS EPILEPTICUS*

A análise do perfil das crises foi realizada utilizando a escala de Racine. Esta escala é composta por nível (de 0 a 5) atribuídos a diferentes tipos de comportamento durante o SE e que reflete de forma arbitrária, porém crescente, a gravidade das crises (RACINE, 1972). Sendo o nível 0, imobilidade, nível 1, os automatismos faciais, nível 2, mioclonias de cabeça e pescoço, nível 3, clonias de patas anteriores, nível 4, elevação sobre as patas posteriores e, nível 5, elevação e queda. Assim, foi avaliado o perfil da gravidade das crises de cada animal durante o tempo de 90 minutos de SE.

4.6. EUTANÁSIA POR DECAPITAÇÃO PARA ANÁLISES DE EXPRESSÃO GÊNICA DE TECIDO HIPOCAMPAL

Para análises de expressão gênica, 24h horas após a reversão do SE, os animais foram decapitados e, imediatamente, em seguida, o encéfalo foi removido. Posteriormente, o cérebro foi dissecado e os hipocampus direito e esquerdo coletados, congelados em nitrogênio líquido para o rápido congelamento e transferidos ao freezer -80°C, onde ficaram estocados até a etapa de processamento.

4.7. AVALIAÇÃO DO PERFIL DA EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS A EPILEPTOGÊNESE

4.7.1. Extração de RNA Total

Os hipocampus esquerdos dos animais foram transferidos do freezer a -80°C para nitrogênio líquido e extração do RNA total foi realizada individualmente com o uso do kit para extração com reagente trizol. Após a extração dos RNAs, foram avaliadas a concentração e pureza das amostras através de espectrofotometria (Espectrofotômetro Eppendorf BioPhotometer Plus). O padrão de quantificação utilizado nas amostras, seguiu o método da densidade óptica (OD) obtida em comprimento de onda de 260nm. A pureza das amostras foi avaliada a partir do cálculo da razão entre os valores de absorbância nos comprimentos de onda 260 nm e 280nm.

4.7.2. Síntese de cDNA e RT-qPCR para avaliação da expressão gênica relativa de genes associados ao processo epileptogênico

Para a síntese de cDNA a partir do RNA total extraído, foi utilizado o *Kit High Capacity cDNA Reverse Transcription* da *Applied Biosystems*. A quantificação dos transcritos *GFAP*, *BDNF*, *NPY* e *TNF- α* foi realizada através de RT-qPCR. Esses genes foram selecionados, pois correspondem a genes associados ao processo epileptogênico com perfil de expressão modulada. Dessa forma, as reações de amplificação foram realizadas utilizando-se SYBR® Green PCR Master Mix, conforme as informações do fabricante GoTaq® qPCR Master Mix (Promega). A avaliação de expressão relativa foi realizada a partir do método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Para a normalização, utilizamos *Actina* e *PRIG* como genes de referência. As reações foram realizadas em triplicatas e o perfil dos níveis de expressão identificados. A tabela 5 apresenta a sequência dos *primers* desenhados dos genes avaliados (MARQUES, 2013; MARQUES 2018; BARBOSA, 2017).

Tabela 5. Sequência dos *primers* desenhados dos genes selecionados.

GENE	SIGLA	SEQUÊNCIA DOS PRIMERS 5'-3'
Proteína glial fibrilar ácida	<i>GFAP</i>	F- ACCGCATCACCATTCTGT
		R- ATCTCCACCGTCTTTACCAC
Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro	<i>BDNF</i>	F – TCATACTTCGGTTGCATGAAGG
		R – AGACCTCTCGAACCTGCCC
Neuropeptídeo Y	<i>NPY</i>	F- GCTCTGCGACACTACATCAATC
		R-CCATCACCACATGGAAGGGT
Fator de Necrose Tumoral-α	<i>TNF- α</i>	F-GCTCCCTCTCATCAGTTCCA
		R-CTCCGCTTGGTGGTTTGCTA
Beta-actina	<i>Actb</i>	F - AGCCTTCCTTCCTGGGTATG
		R - GAGGTCTTTACGGATGTCAAC

Proteína	<i>RPLP1</i>	F - GCATCTACTCCGCCCTCA
Ribossomal,		
grande, p1		R - ATCTTATCCTCCGTGACCGT

4.8. EUTANÁSIA POR PERFUSÃO TRANSCARDIAL PARA HISTOQUÍMICA COM FLUORO-JADE

Após 24h da reversão do SE, outros grupos de animais foram anestesiados com cetamina (0,08mL/100g, (i.p.) e xilazina (0,04mL/100g i.p.), o coração foi exposto e uma agulha acoplada a um cateter foi colocada no ventrículo esquerdo. Cada animal foi infundido com 200 mL de tampão fosfato heparinizado e posteriormente com 150 mL de paraformaldeído (PFA) a 4% em tampão fosfato, pH 7,4. Após, os animais foram decapitados e os cérebros removidos. Os cérebros foram pós-fixados em solução de PFA a 4% por 24 horas, crioprotetidos em solução de sacarose 30% e mantidos estocados em freezer a -20°C até o momento do processamento dos cortes histológicos em criostato.

4.9. CORTES HISTOLÓGICOS E HISTOQUÍMICA COM FLUORO-JADE PARA ANÁLISES DE NEURODEGENERAÇÃO HIPOCAMPAL

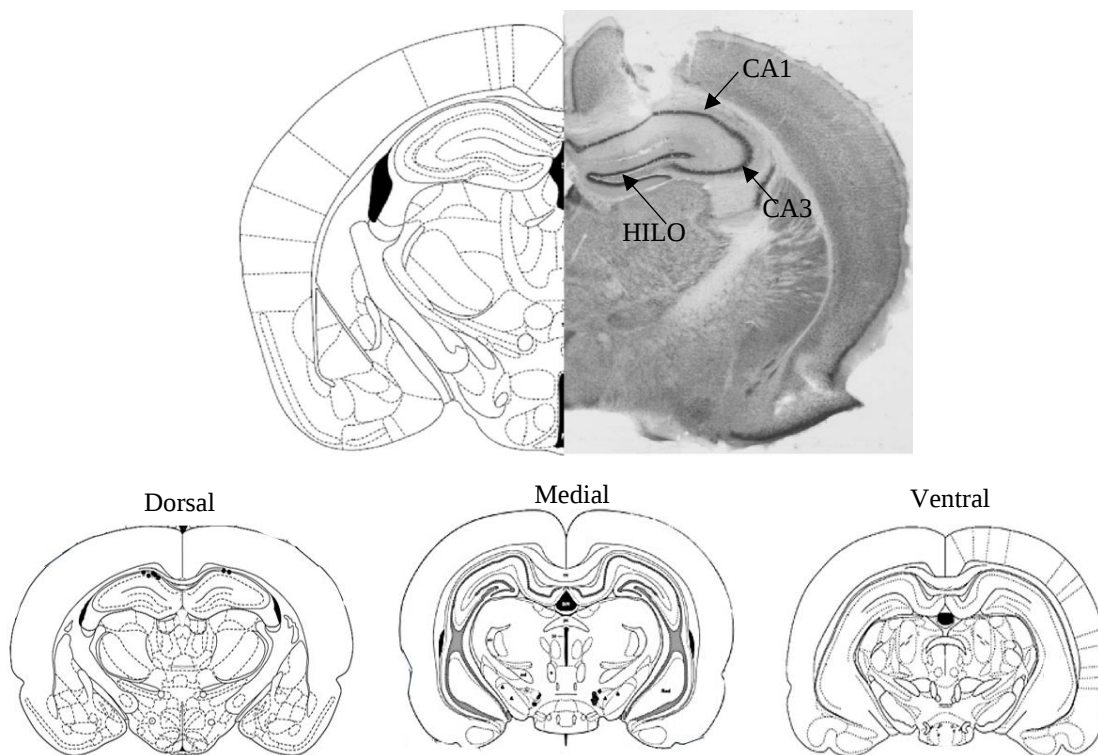
Para o processamento dos cortes histológicos, os cérebros foram cobertos com Tissue Tek e, então, cortados em secções de 30 µm em criostato, com temperatura a -20°C. Os cortes foram colocados em lâminas gelatinizadas (solução para gelatinização: gelatina 0,5% e sulfato duplo de cromo e potássio 0,05%) contendo cada lâmina seis níveis cerebrais (dorsal, medial e ventral), representando a extensão anteroposterior do hipocampo de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (1996).

A análise do processo de neurodegeneração foi realizada utilizando a técnica de histoquímica com Fluoro-Jade, de acordo com o protocolo proposto por Schmued e colaboradores (1997) e modificado por Castro (2011). Essa técnica possui um mecanismo ainda desconhecido, mas é sabido que envolve a afinidade deste corante pela acidose desencadeada neste processo de morte celular. Assim, as lâminas com os cortes histológicos foram submetidas a banhos sucessivos de etanol absoluto por 3 minutos, etanol 70% por 1 minuto, água destilada por 1 minuto, permanganato de potássio 0,06 % por 15 minutos, com agitação branda, 3 lavagens em água destilada por 1 minuto e 30 minutos em Fluoro-Jade (FJ) (0,0001%), sob agitação branda. Posteriormente, as lamínulas foram montadas nas lâminas por meio de uma mistura na proporção de 3:1 de

ácido acético 0,1% e Fluoromount respectivamente. Os cortes foram analisados e as imagens capturadas através de um microscópio de fluorescência (Nikon DS RI1).

A contagem de células foi realizada utilizando o programa ImageJ (Wayne Rasband; Research Services Branch, National Institute of Mental Health Bethesda, MD, USA). Foram contados os números de células em três regiões hipocâmpais: CA1, CA3 e Hilo, considerando os níveis (dorsal, medial e ventral) do hipocampo. Essas regiões foram selecionadas devido à alta sensibilidade ao processo neurodegenerativo (CASTRO, 2011). A figura 5 evidencia a localização das sub-regiões hipocâmpais avaliadas.

Figura 5. Anatomia hipocâmpal de rato evidenciando as sub-regiões CA1, CA3 e HILO e as profundidades Dorsal, Medial, Ventral.



Fonte: modificado de Vandresen-Filho *et al.*, (2012); Paxinos (1997); Naghavi *et al.*, (2018).

4.10. ANÁLISE DO PERFIL DAS CRISES DURANTE A FASE CRÔNICA DA EPILEPTOGÊNESE

Os animais utilizados para o estabelecimento da fase crônica da epileptogênese foram mantidos sob filmagem por 60 dias, período chamado de latência, no tempo de 24h por dia após a reversão do SE até a confirmação do estabelecimento da fase crônica. Para confirmar a fase crônica, foi feita a análise dos videomonitoramentos e confirmação de pelo menos 2 crises recorrentes e espontâneas de nível 3. Após confirmação, os animais

foram divididos em grupo tratado com SOL e grupo SAL. Assim, estabeleceu-se o protocolo de tratamento, de modo que os animais continuaram sendo mantidos em filmagem por 24h por dia por mais 45 dias, divididos nas fases de 15 dias pré-tratamento, 15 dias tratamento e 15 dias pós-tratamento.

Desse modo, os animais ficaram 15 dias sob videomonitoramento correspondendo a fase de pré-tratamento. Em seguida, foi iniciado o tratamento, em que os animais foram administrados com SOL diluído em solução salina a 0,9% (45%/55%, v/v, respectivamente, 2 mL/Kg) uma vez ao dia no mesmo horário por 15 dias. Em paralelo, animais do grupo controle receberam administração de SAL a 0,9% (2mL/Kg, i.p.) para compor o grupo SAL. Finalizado os 15 dias de tratamento, os animais permaneceram em videomonitoramento por mais 15 dias correspondendo a fase pós-tratamento. Ao final desse processo, o perfil das crises nas fases pré-tratamento, tratamento e pós-tratamento, foi avaliada de acordo com a escala de Racine.

4.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA

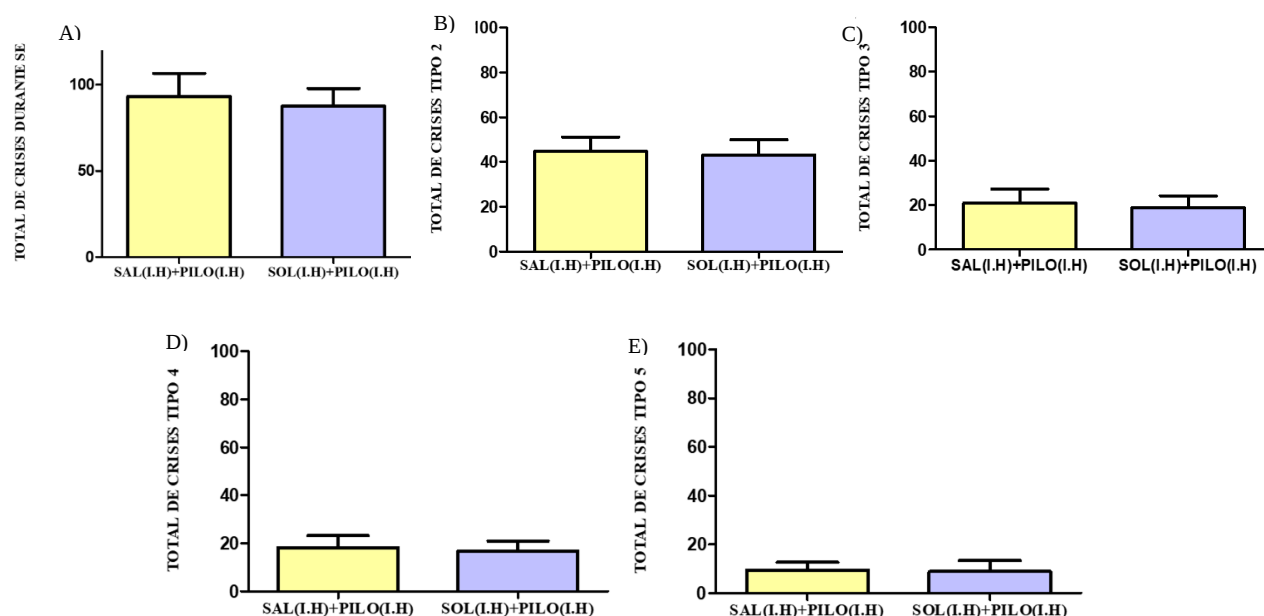
Os dados foram expressos como valores de média $\pm$ erro padrão média (EPM) analisados para normalidade, seguido pelo teste t paramétrico ou não paramétrico utilizando o programa estatístico *GraphPad, Prism 7.0*. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5. RESULTADOS

5.1. EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO (30 MINUTOS) COM SOL (I.H.) NAS CRISES DURANTE SE E NA NEURODEGENERAÇÃO EM MODELO DE INDUÇÃO POR PILO (I.H.)

Para verificar o efeito do pré-tratamento com SOL administrado pela via (I.H.) nas crises epilépticas durante o SE induzido por PILO (I.H.), foram utilizados 9 animais no grupo SAL(I.H.)+PILO(I.H.) e 11 animais do grupo SOL(I.H.)+PILO(I.H.). Foi observado que não houve diferença estatisticamente significativa no total das crises e em cada tipo de crise durante os 90 minutos de SE quando comparado os grupos, conforme exposto na fig. 6.

Figura 6. Efeito do SOL (I.H.) no total das crises durante o SE e no total de cada tipo de crise em modelo de indução por PILO (I.H.).

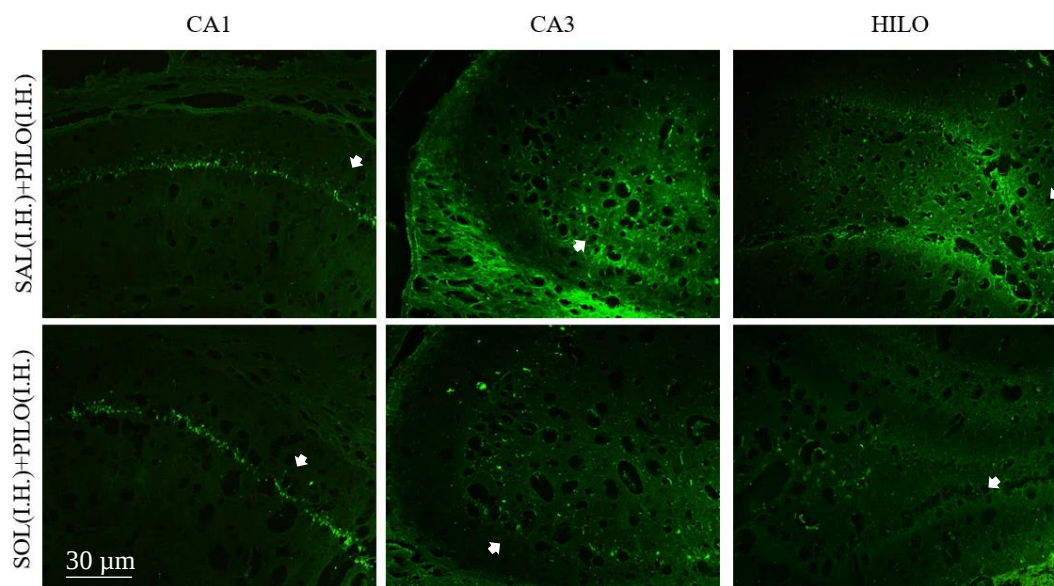


Perfil das crises durante SE. (A) total de crises durante 90 minutos de SE, teste paramétrico, $p > 0,05$. (B) total de crises tipo 2, (C) total de crises tipo 3, (D) total de crises tipo 4 e (E) total de crises tipo 5 durante 90 minutos de SE, teste paramétrico, $p < 0,05$. Valores expressos em média±EPM. Grupo SAL(I.H.)+PILO(I.H.) (n=9), grupo SOL(I.H.)+PILO(I.H.) (n=11).

Para avaliar o efeito do pré-tratamento com SOL administrado pela via (I.H.) na neurodegeneração do hipocampo contralateral total e suas sub-regiões CA1, CA3 e Hilo, 24h após a reversão do SE induzido por PILO(I.H.), foram utilizados 5 animais no grupo SAL(I.H.)+PILO(I.H.) e 5 animais do grupo SOL(I.H.)+PILO(I.H.).

A fig. 7 apresenta as microfotografias representativas do padrão de marcação de FJ no hipocampo dos animais do grupo SAL(I.H.)+PILO(I.H.) e SOL(I.H.)+PILO(I.H.).

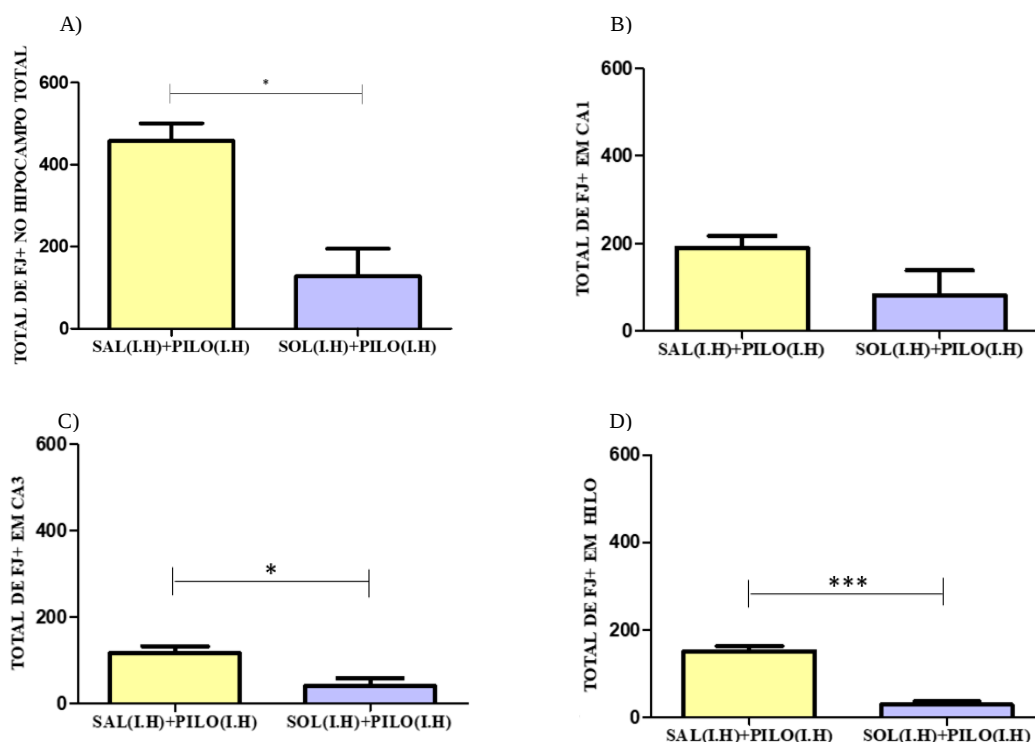
Figura 7. Efeito do SOL (I.H.) na neurodegeneração em modelo de indução de SE em modelo de indução de SE por PILO (I.H.).



Cortes histológicos submetidos a técnica Fluoro-Jade. Os pontos em verde brilhante indicam marcação de neurônios em degeneração. Na vertical estão as sub-regiões analisadas do hipocampo, com seta branca indicando cada região. Na horizontal estão os grupos experimentais. Aumento de 10x.

Foi observado a presença de neurônios FJ positivos nas regiões CA1 e CA3 e no Hilo 24 horas após a reversão do SE nos dois grupos experimentais. Vale ressaltar que esta análise foi direcionada para as sub-regiões CA1, CA3 e Hilo nas profundidades dorsal, medial e ventral do hipocampo contralateral. A quantidade de células FJ positivas de todas as profundidades foram somadas para a análise quantitativa, obtendo-se, assim, o padrão de marcação total das regiões CA1, CA3 e Hilo. Assim, foi observado uma diminuição estatisticamente significativa de 66,62% de marcação de neurônios FJ positivos no hipocampo total do grupo SOL(I.H.)+PILO(I.H.) (fig. 8A). Além disso, foi observada uma redução de 64,15% na sub-região CA3 e de 80,34% em Hilo estatisticamente significativa no grupo SOL(I.H.)+PILO(I.H.) quando comparados ao grupo SAL(I.H.)+PILO(I.H.) (fig. 8C e 8D). Não houve diferença em CA1 (fig. 8B).

Figura 8. Efeito do SOL (I.H.) na redução da marcação de neurônios FJ positivos no hipocampo contralateral total e nas regiões hipocâmpais contralaterais em modelo de indução de SE por PILO (I.H.).

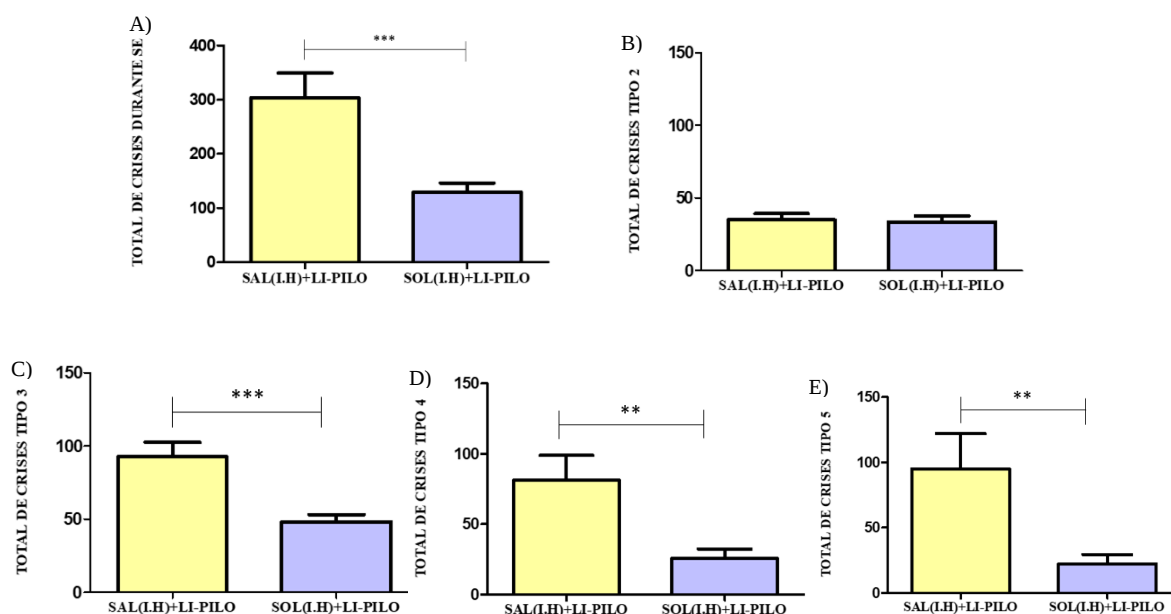


Marcação de neurônios em processo de degeneração no hipocampo contralateral total (A) e nas sub-regiões CA1(B), CA3(C) e Hilo(D). Teste paramétrico, $p < 0,05$. Valores expressos em média $\pm$ EPM. * $< 0,05$, *** $< 0,0005$. Grupo SAL(I.H.)+PILO(I.H.) (n=5), grupo SOL(I.H.)+PILO(I.H.) (n=5).

5.2. EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO (30 MINUTOS) COM SOL (I.H.) NAS CRISES DURANTE SE, NA NEURODEGENERAÇÃO E NA EXPRESSÃO GÊNICA EM MODELO DE INDUÇÃO POR LI-PILO (I.P)

Para verificar o efeito do pré-tratamento com SOL administrado pela via (I.H.) nas crises durante o SE induzido por LI-PILO (I.P.), foram utilizados 7 animais no grupo SAL(I.H.)+LI-PILO e 10 animais do grupo SOL(I.H.)+LI-PILO. Foi observado uma diminuição significativa de 38,97% no total das crises, sendo 25,71% no tipo 3, 54,65% no 4 e 66,36% no tipo 5 durante os 90 minutos de SE no grupo SOL(I.H.)+LI-PILO quando comparado com o grupo SAL(I.H.)+LI-PILO, conforme representado na fig. 9A, 9C, 9D e 9E respectivamente.

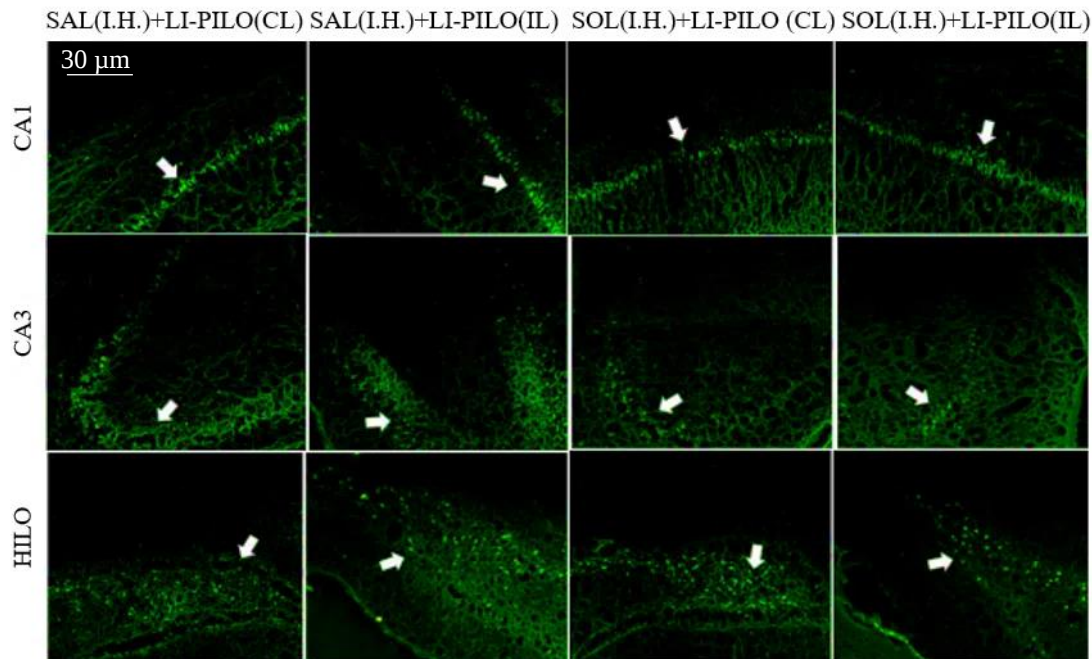
Figura 9. Efeito do SOL (I.H.) no total das crises durante o SE e no total de cada tipo de crise em modelo de indução por LI-PILO (I.P).



Perfil das crises durante SE. (A) total de crises durante 90 minutos de SE, teste paramétrico, $p > 0,05$. (B) total de crises tipo 2, (C) total de crises tipo 3, (D) total de crises tipo 4 e (E) total de crises tipo 5 durante 90 minutos de SE, teste paramétrico, $p < 0,05$. Valores expressos em média±EPM. ** < 0,005, *** <0,0005. Grupo SAL(I.H.)+LI-PILO(I.P) (n=7), grupo SOL(I.H.)+LI-PILO(I.P.) (n=10).

Para verificar o efeito do pré-tratamento com SOL administrado pela via (I.H.) na neurodegeneração do hipocampo contralateral e ipsilateral total e em suas sub-regiões CA1, CA3 e Hilo 24 h após a reversão do SE induzido por LI-PILO(I.P.), foram utilizados 5 animais no grupo SAL(I.H.)+LI-PILO e 5 animais do grupo SOL(I.H.)+LI-PILO. A fig.10 apresenta as microfotografias representativas do padrão de marcação de FJ no hipocampo dos animais de cada grupo.

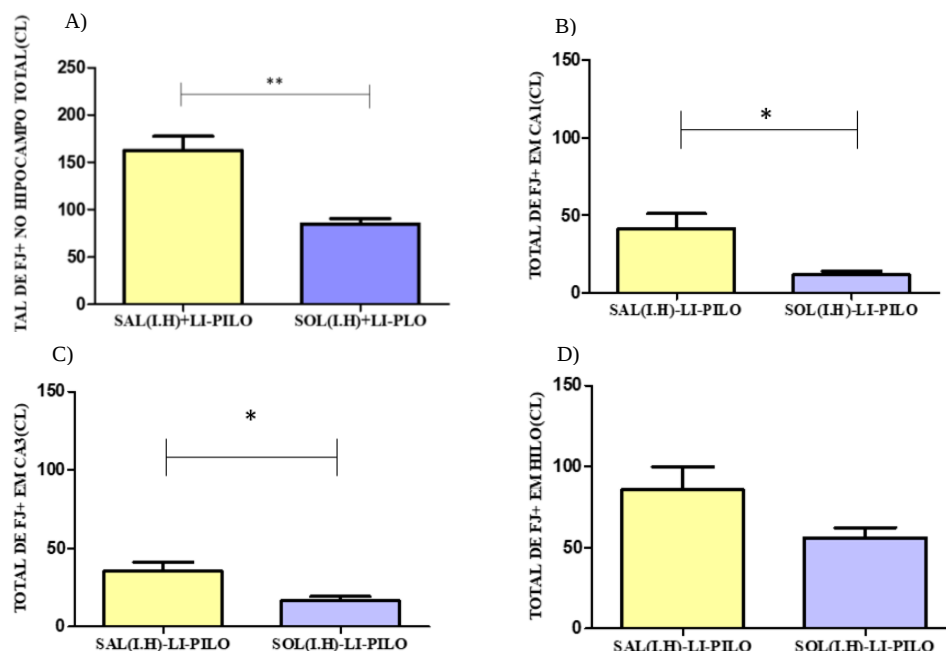
Figura 10. Efeito do SOL (I.H.) na neurodegeneração em modelo de indução de SE por LI-PILO.



Cortes histológicos submetidos a técnica Fluoro-Jade. Os pontos em verde brilhante indicam marcação de neurônios em degeneração. Na horizontal estão as sub-regiões analisadas do hipocampo, com seta branca indicando cada região. Na vertical estão os grupos experimentais. Aumento de 10x.

Na neurodegeneração do hipocampo contralateral, foi observado uma diminuição significativa de 29,07% na marcação por FJ no hipocampo total (fig. 11A), sendo de 66,47% na sub-região CA1 e de 40% em CA3 no grupo SOL(I.H.)+LI-PILO quando comparado ao grupo SAL(I.H.)+LI-PILO (fig. 11B e 11C). Não houve diferença em Hilo (fig. 11D).

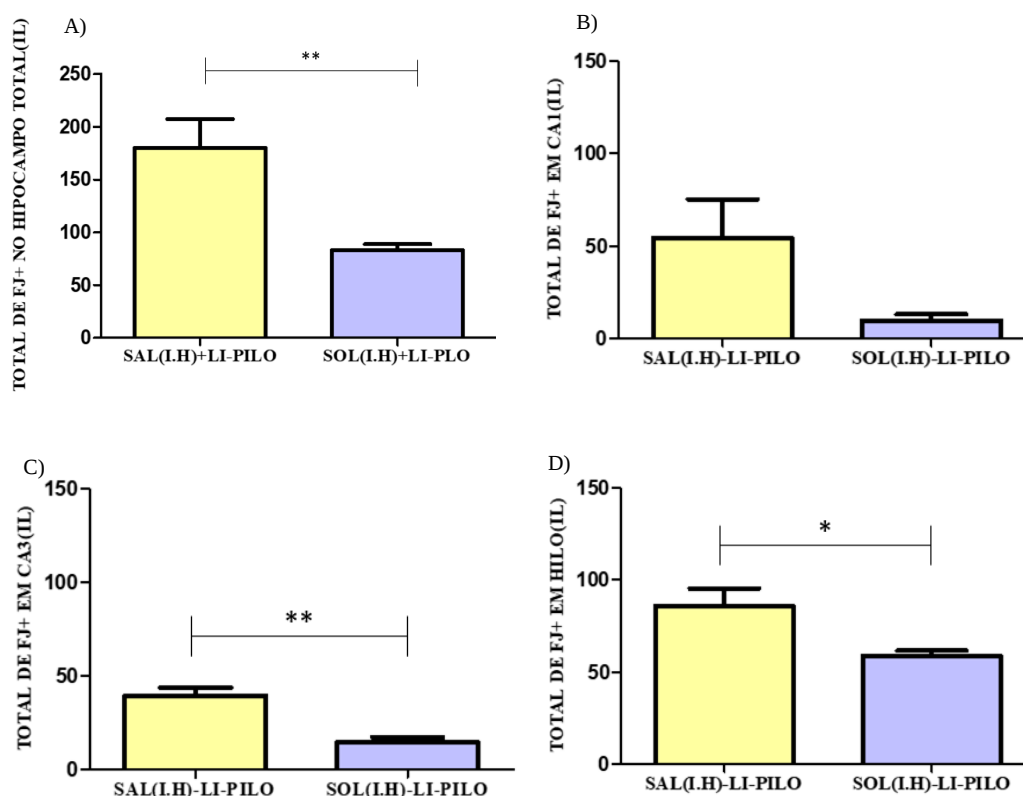
Figura 11. Efeito do SOL (I.H.) na redução da marcação de neurônios FJ positivos no hipocampo contralateral total e nas regiões hipocâmpais contralaterais em modelo de indução de SE por LI-PILO.



Marcação de neurônios em processo de degeneração no hipocampo contralateral total (A), e nas sub-regiões CA1(B), CA3(C) e Hilo(D). Teste paramétrico, $p < 0,05$. Valores expressos em média $\pm$ EPM. * $< 0,05$, ** $< 0,005$. Grupo SAL(I.H.)+LI-PILO (n=5), grupo SOL(I.H.)+LI-PILO (n=5).

Na neurodegeneração do hipocampo ipsilateral, foi observado diminuição significativa de 56,40% na marcação por FJ positivo no hipocampo total (fig. 12A), de 67% na sub-região CA3 e de 22,77% em Hilo (fig. 12C e 12) no grupo SOL(I.H.)+LI-PILO quando comparado ao grupo SAL(I.H.)+LI-PILO. Não houve diferença em CA1 (fig. 12B).

Figura 12. Efeito do SOL (I.H.) na redução da marcação de neurônios FJ positivos no hipocampo ipsilateral total e nas regiões hipocâmpais ipsilaterais em modelo de indução de SE por LI-PILO.



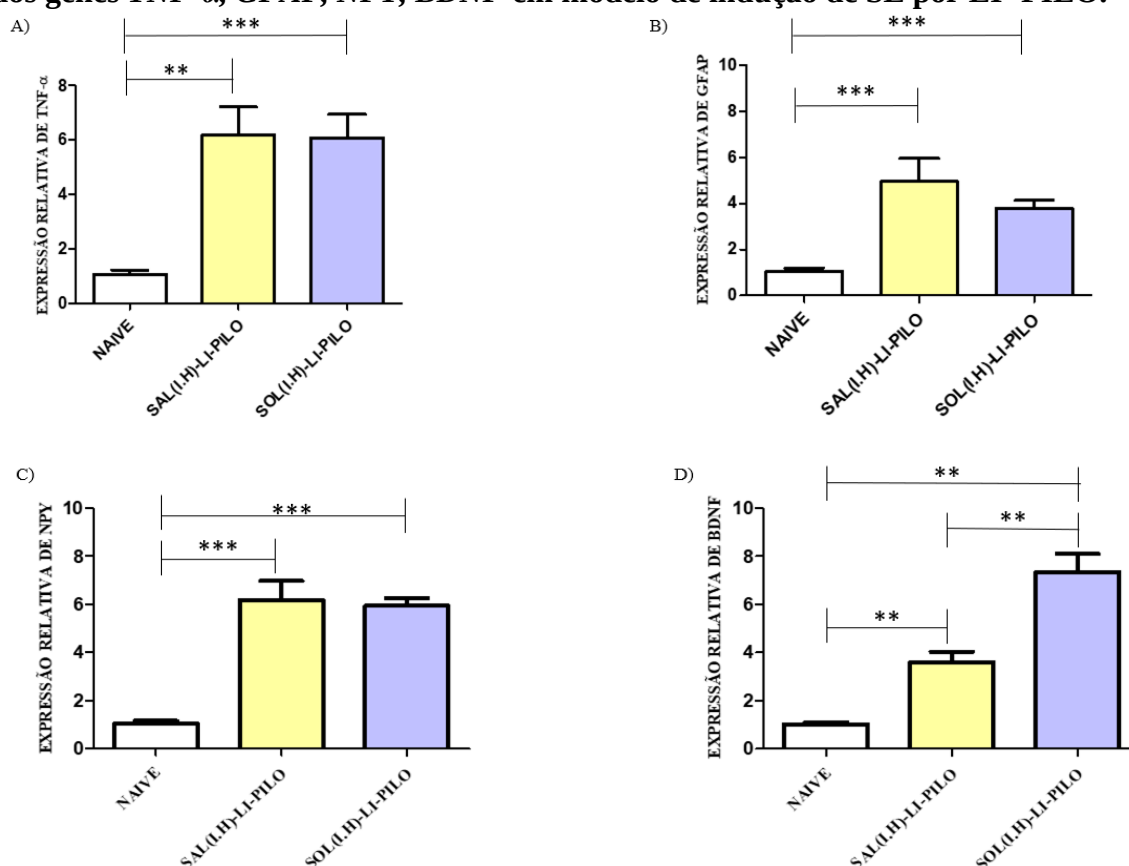
Marcação de neurônios em processo de degeneração no hipocampo ipsilateral total (A), e nas sub-regiões CA1(B), CA3(C) e Hilo(D). Teste paramétrico, $p < 0,05$. Valores expressos em média $\pm$ EPM. * $< 0,05$, ** $< 0,005$. Grupo SAL(I.H.)+LI-PILO (n=5), grupo SOL(I.H.)+LI-PILO (n=5).

Para verificar o efeito do pré-tratamento com SOL administrado pela via (I.H.) na expressão de transcritos dos genes associados ao processo epileptogênico (*TNF- α* , *GFAP*, *NPY*, *BDNF*), 24 horas após a reversão do SE induzido por LI-PILO (I.P.), foram utilizados 6 animais no grupo *Naive*, cinco animais no grupo SAL(I.H.)+LI-PILO e cinco animais do grupo SOL(I.H.)+LI-PILO. A fig. 13 representa os níveis do transcrito *Tnf- α* ,

Gfap, *Npy*, *Bdnf* expressos no hipocampo dos animais do grupo *Naive*, SAL(I.H.)+LI-PILO e SOL(I.H.)+Li-PILO.

Conforme esperado, o grupo SAL(I.H.)+LI-PILO apresentou níveis significativamente aumentados dos transcritos *BDNF*, *TNF- α* , *GFAP*, *NPY* quando comparados com animais naives. O pre-tratamento com SOL não mudou esse padrão de expressão, exceto para *BDNF* (Fig. 11). De fato, observamos que houve um aumento significativo de 126,52% nos níveis relativos de transcritos *BDNF* no grupo SOL(I.H.)+LI-PILO quando comparado com SAL(I.H.)+LI-PILO, conforme representado na (fig. 11D).

Figura 13. Efeito do SOL (I.H.) na expressão gênica hipocampal dos transcritos dos genes *TNF- α* , *GFAP*, *NPY*, *BDNF* em modelo de indução de SE por LI-PILO.

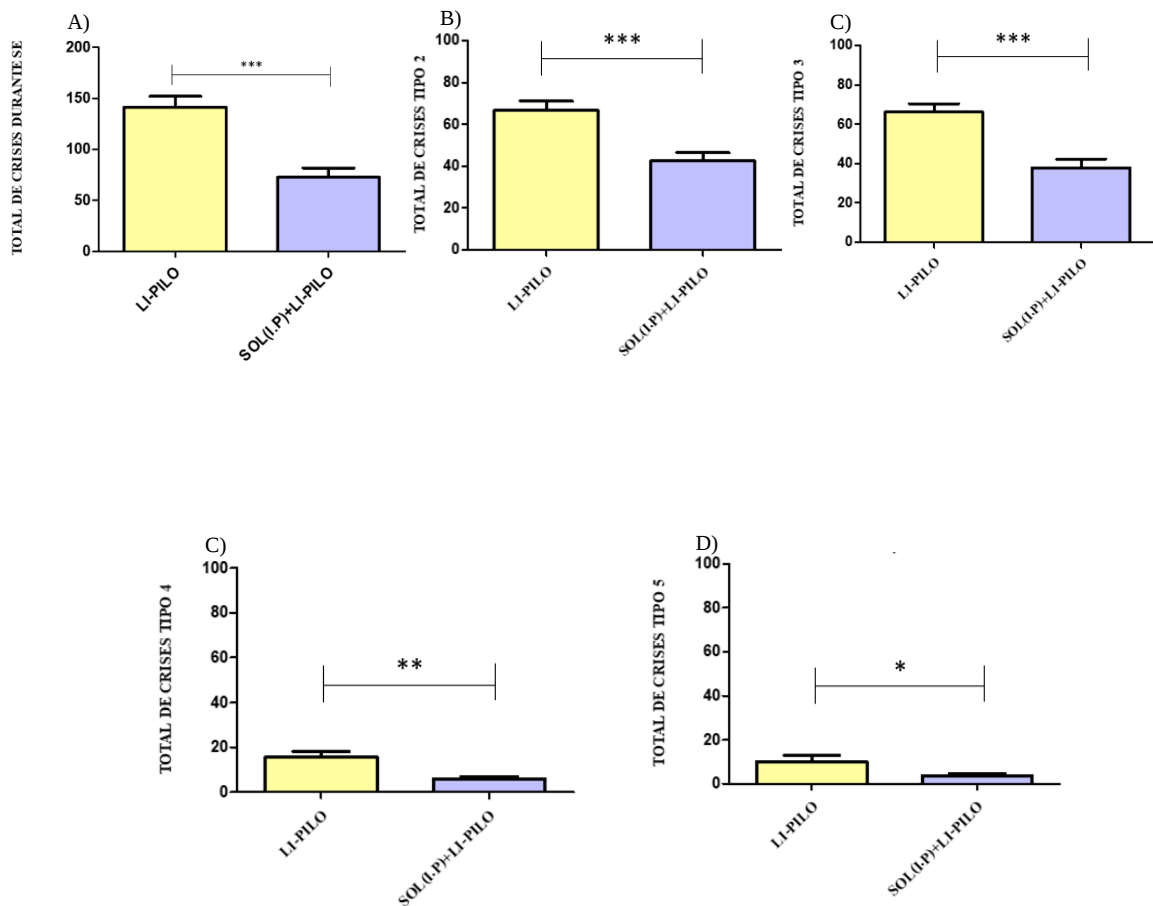


Expressão gênica hipocampal de transcritos *TNF- α* (A), *GFAP* (B), *NPY* (C) e *BDNF* (D). Teste paramétrico, $p < 0,05$. Valores expressos em média $\pm$ EPM. ** $< 0,005$, *** $< 0,0005$. Grupo *Naive* (n=6), SAL(I.H.)+LI-PILO (n=5), grupo SOL(I.H.)+LI-PILO (n=5).

5.3. EFEITO PRÉ-TRATAMENTO (1 HORA) COM SOL (I.P.) NAS CRISES DURANTE SE, NA NEURODEGENERAÇÃO E NA EXPRESSÃO GÊNICA EM MODELO DE INDUÇÃO POR LI-PILO (I.P)

Para verificar o efeito do pré-tratamento com SOL administrado pela via (I.P.) nas crises durante o SE induzido por LI-PILO(I.P.), foram utilizados 21 animais no grupo LI-PILO e 16 animais do grupo SOL(I.P.)+LI-PILO. Foi observado que houve diminuição estatisticamente significativa de 60,87% no total das crises, de 42,46% no tipo 2, de 59,53% no tipo 3, de 71,4% no tipo 4 e de 73,1% no tipo 5, durante os 90 minutos de SE no grupo SOL(I.P.)+LI-PILO quando comparado ao grupo LI-PILO, conforme exposto na fig. 14.

Figura 14. Efeito do SOL (I.P.) no total das crises durante o SE e no total de cada tipo de crise em modelo de indução por LI-PILO (I.P.).

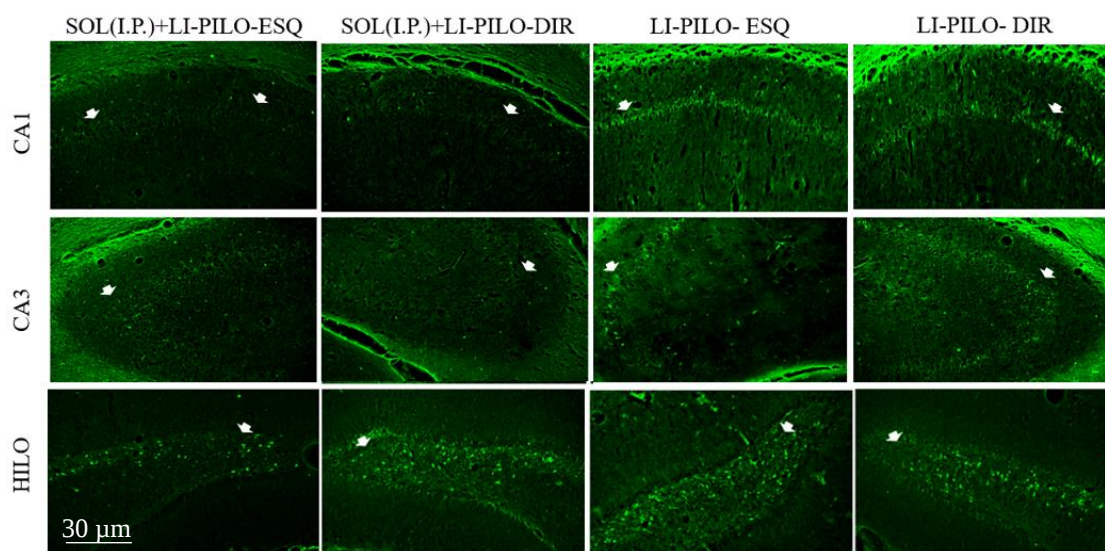


Perfil das crises durante SE. (A) total de crises durante 90 minutos de SE, teste paramétrico, $p > 0,05$. (B) total de crises tipo 2, (C) total de crises tipo 3, (D) total de crises tipo 4 e (E) total de crises tipo 5 durante 90 minutos de SE, teste paramétrico, $p < 0,05$. Valores expressos em média ± EPM. * $<0,05$, ** $<0,005$, *** $<0,0005$. Grupo SAL(I.H.)+LI-PILO(I.P.) (n=21), grupo SOL(I.H.)+LI-PILO(I.P.) (n=16).

Para avaliar o efeito do pré-tratamento com SOL administrado pela via (I.P.) na neurodegeneração do hipocampo esquerdo e direito e em suas sub-regiões CA1, CA3 e Hilo, 24 h após a reversão do SE induzido por LI-PILO, foram utilizados 6 animais no grupo LI-PILO e 6 animais do grupo SOL(I.P.)+LI-PILO.

A fig. 15 apresenta as microfotografias representativas do padrão de marcação de FJ no hipocampo dos animais do grupo LI-PILO e SOL(I.P.)+LI-PILO.

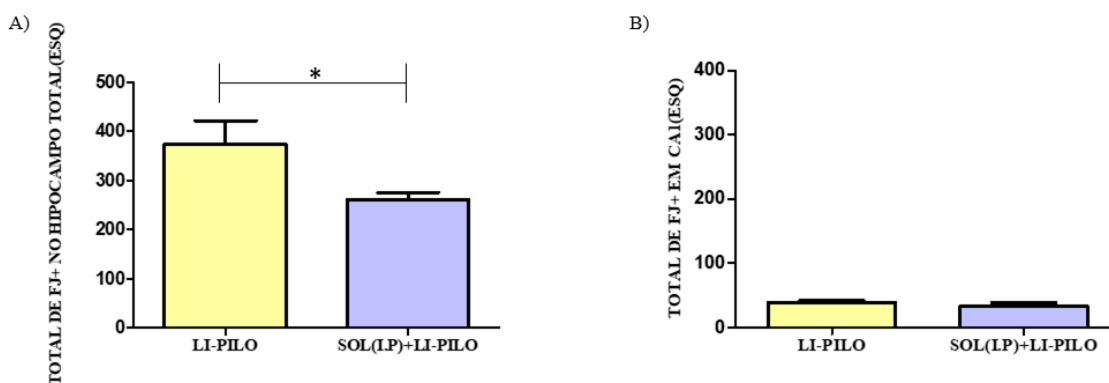
Figura 15. Efeito do SOL (I.P.) na neurodegeneração em modelo de indução de SE por LI-PILO.

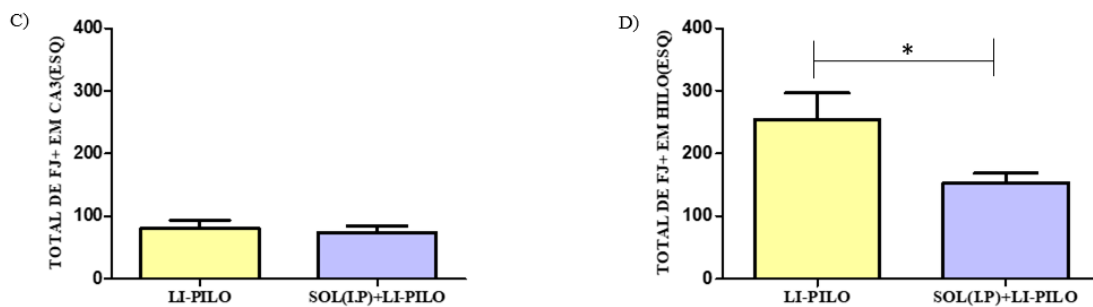


Cortes histológicos submetidos a técnica Fluoro-Jade. Os pontos em verde brilhante indicam marcação de neurônios em degeneração. Na horizontal estão as sub-regiões analisadas do hipocampo, com seta branca indicando cada região. Na vertical estão os grupos experimentais. Aumento de 10x.

Na neurodegeneração do hipocampo esquerdo, foi observado uma diminuição significativa de 30,27% na marcação de neurônios FJ positivo no hipocampo total (fig. 16A) e (39,67%) na sub-região Hilo (fig. 16D) no grupo SOL(I.P.)+LI-PILO quando comparado ao grupo LI-PILO. Nas regiões CA1 e CA3, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados (fig. 16B e 16C).

Figura 16. Efeito do SOL (I.P.) na redução da marcação de neurônios FJ positivos no hipocampo esquerdo total e nas regiões hipocampais esquerdas em modelo de indução de SE por LI-PILO.

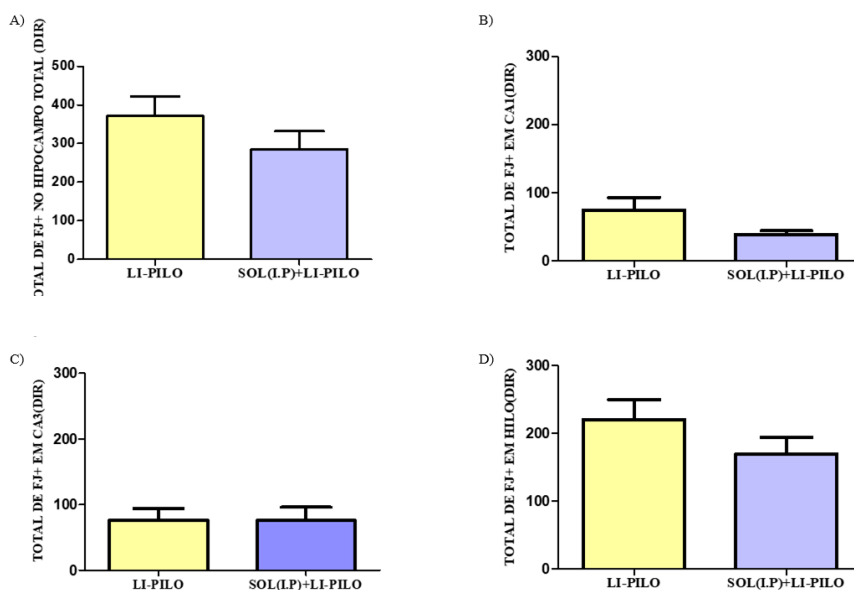




Marcação de neurônios em processo de degeneração no hipocampo esquerdo total (A), e nas sub-regiões CA1(B), CA3(C) e Hilo(D). Teste paramétrico, $p < 0,05$. Valores expressos em média±EPM. * $< 0,05$. Grupo LI-PILO (n=6), grupo SOL(I.P.)+LI-PILO (n=6).

Na neurodegeneração do hipocampo direito, por sua vez, foi observado que não houve diferença estatisticamente significativa da marcação por FJ positivo no hipocampo total e em suas sub-regiões no grupo entre os grupos avaliados fig.17.

Figura 17. Efeito do SOL (I.P.) na redução da marcação de neurônios FJ positivos no hipocampo direito total e nas regiões hipocampais direitas em modelo de indução de SE por LI-PILO.

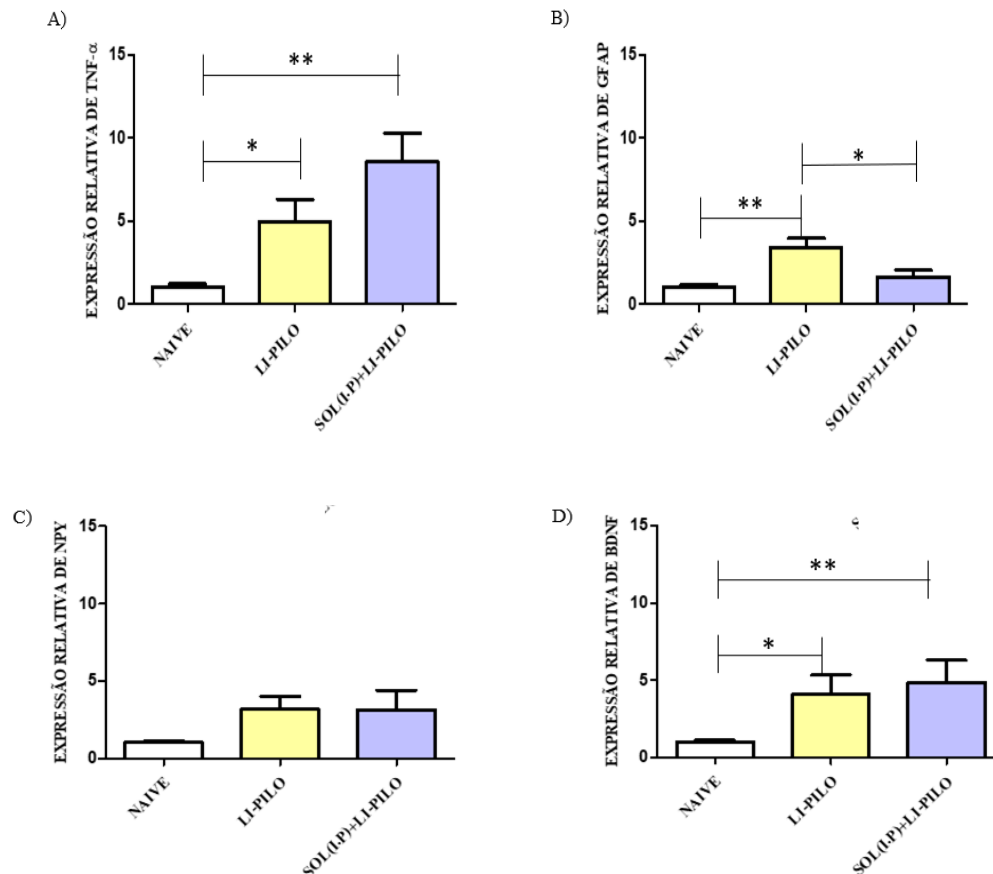


Marcação de neurônios em processo de degeneração no hipocampo esquerdo total (A), e nas sub-regiões CA1(B), CA3(C) e Hilo(D). Teste paramétrico, $p > 0,05$. Valores expressos em média±EPM. Grupo LI-PILO (n=6), grupo SOL(I.P.)+LI-PILO (n=6).

Para verificar o efeito do pré-tratamento com SOL administrado pela via (I.P.) na expressão de transcritos dos genes associados ao processo epileptogênico (*TNF- α* , *GFAP*, *NPY*, *BDNF*) 24 horas após a reversão do SE induzido por LI-PILO (I.P.), foram utilizados 6 animais no grupo *Naive*, 6 animais no grupo LI-PILO e 5 animais do grupo SOL(I.P.)+LI-PILO. A fig. 18 representa os níveis do transcrito *Tnf- α* , *Gfap*, *Npy*, *Bdnf* expressos no hipocampo dos animais do grupo *Naive*, LI-PILO e SOL(I.P.)+Li-PILO.

Podemos observar que houve um aumento estatisticamente significativo dos níveis de transcritos de *GFAP* no grupo LI-PILO quando comparado ao grupo *Naive*, evidenciando o padrão associado a epileptogênese, bem como uma diminuição de (46,58%) estatisticamente significativa da expressão de transcritos *GFAP* no grupo SOL(I.H.)+LI-PILO quando comparado ao grupo LI-PILO conforme representado na (fig. 18B). Além disso, o grupo SOL(I.P.)+LI-PILO e LI-PILO apresentaram aumento estatisticamente significativo dos níveis dos transcritos *TNF- α* e *BDNF* quando comparado ao grupo *Naive* (fig. 18A e 18D) e não houve diferença estatisticamente significativa na modulação de *NPY* entre os grupos avaliados (fig. 18C).

Figura 18. Efeito do SOL (I.P.) na expressão gênica hipocampal dos transcritos dos genes *TNF- α* , *GFAP*, *NPY*, *BDNF* em modelo de indução de SE por LI -PILO.



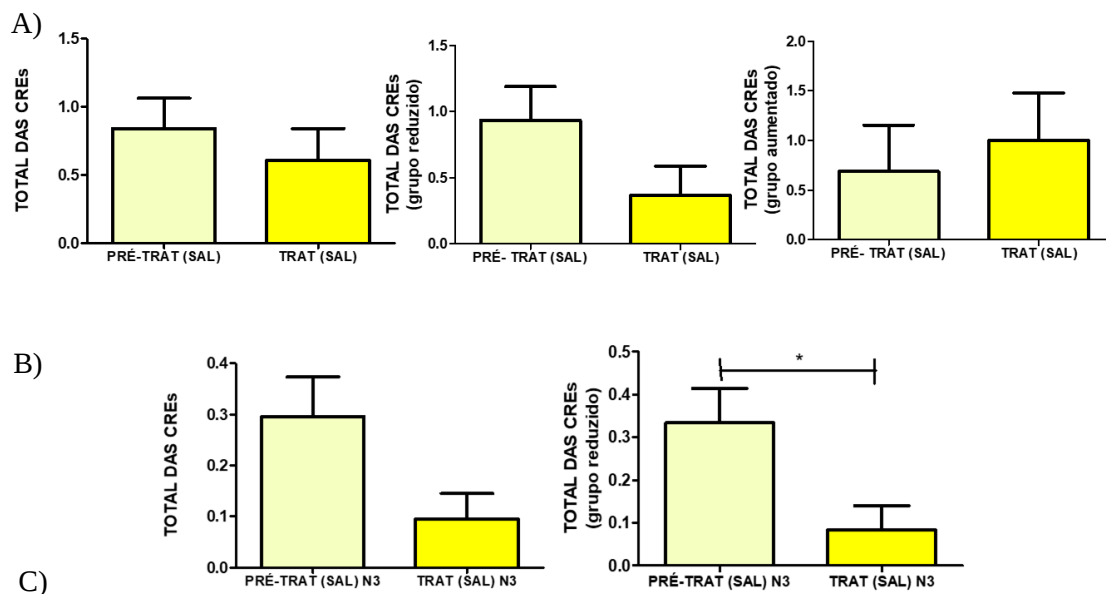
Expressão gênica hipocampal de transcritos *TNF- α* (A), *GFAP* (B), *NPY* (C) e *BDNF* (D). Teste paramétrico, $p < 0,05$. Valores expressos em média $\pm$ EPM. * $< 0,05$, ** $< 0,005$. Grupo *Naive* (n=6), LI-PILO (n=5), grupo SOL(I.H.)+LI-PILO (n=5).

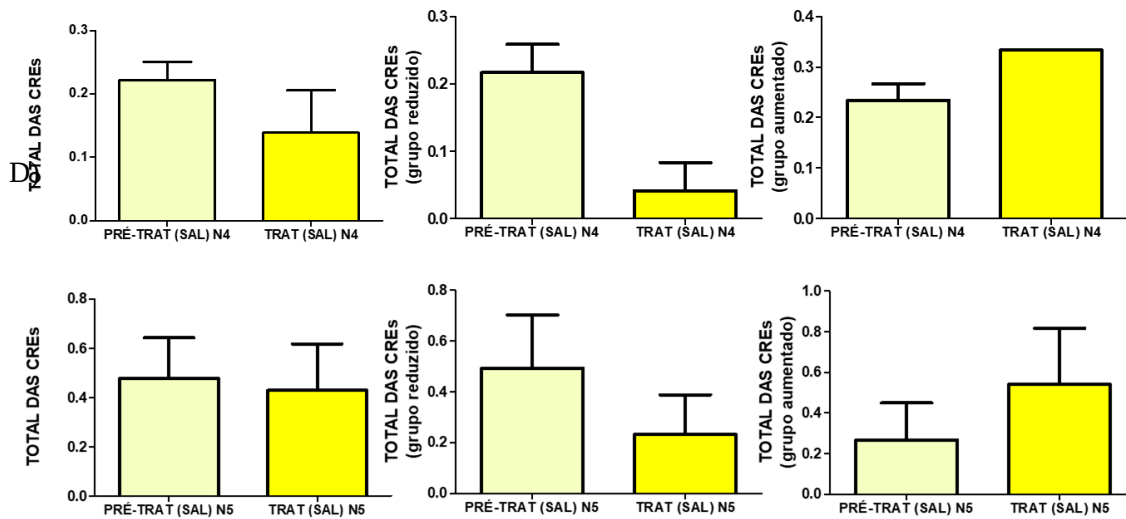
5.4. EFEITO DO TRATAMENTO (15 DIAS) COM SOL (I.P.) NAS CRISES RECORRENTES E ESPONTÂNEAS DA FASE CRÔNICA DA EPILEPTOGÊNESE INDUZIDA POR LI-PILO (I.P)

Para verificar o efeito do SOL nas CREs, foram utilizados 10 animais para o grupo SOL e 10 animais para do grupo SAL, sendo avaliados quanto ao total das crises e o total de crises no nível 3,4 e 5; e comparando o perfil das crises antes do tratamento (PRÉ-TRAT) com o perfil durante o tratamento (TRAT) ou após o tratamento (PÓS-TRAT). Considerando uma potencial farmacorresistência, as análises foram realizadas com base no perfil das crises de: i, todos os animais de cada grupo, animais que apresentaram crises reduzidas e, iii. animais que apresentaram as crises aumentadas. Vale ressaltar que os resultados estão expressos em valores de normalização crises/dia (quantidade de crises por dia dividido pela quantidade de dias total de avaliação). PRÉ-TRAT e PÓS-TRAT (n total de crises/15 dias), TRAT (n total de crises/6 dias).

Ao comparar o perfil das crises no grupo SAL entre os períodos PRÉ-TRAT e TRAT (fig.19), não houve diferença significativa no total das crises ados (fig. 19A). Entretanto, ao avaliar as crises de nível 3, foi observado que houve uma redução significativa durante o período TRAT quando comparado ao grupo PRÉ-TRAT. Em relação ao perfil das crises de nível 4 e 5 nos períodos PRÉ-TRAT e TRAT, foi observado que não houve diferença significativa tanto para animais com crises reduzidas quanto para animais com crises aumentadas (fig. 19C e 19D).

Figura 19. Avaliação do perfil das CREs no grupo SAL entre os períodos PRÉ-TRAT e TRAT.



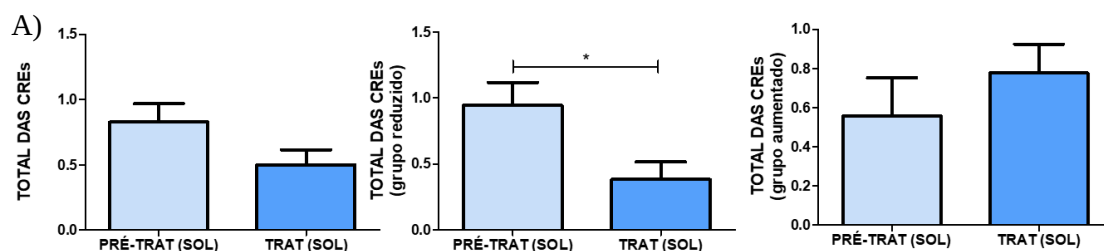


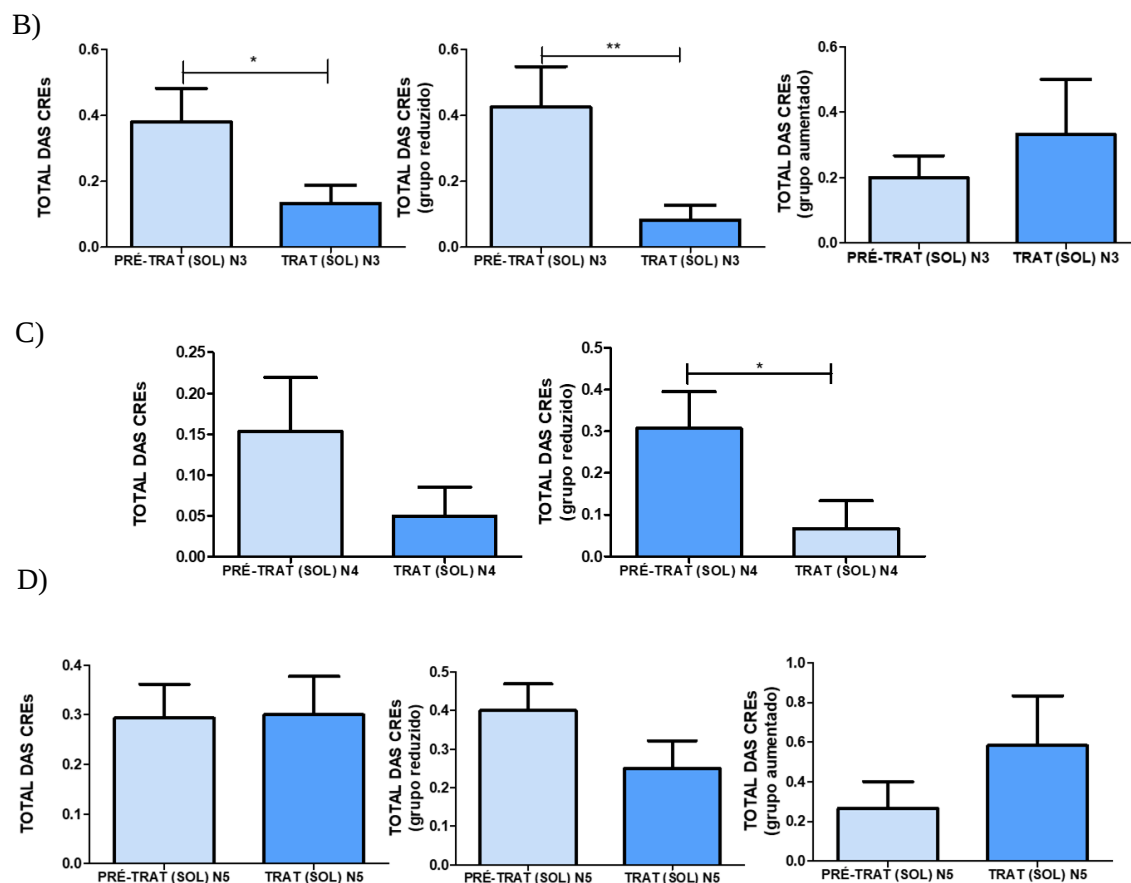
Perfil das crises na fase crônica da epileptogênese. (A) total de crises (n= 10, n= 7, n=3), (B) crises nível 3 (n= 7, n=6), (C) crises nível 4 (n=6, n=4, n=2), (D) crises nível 5 (n=7, n=5, n=4), teste paramétrico, $p < 0,05$. Valores expressos em média $\pm$ EPM. * $<0,05$, ** $<0,005$, *** $<0,0005$.

O mesmo perfil foi observado ao avaliar o perfil das crises entre os períodos TRAT e PÓS-TRAT.

Ao analisar o perfil das crises no grupo SOL entre os períodos PRÉ-TRAT e TRAT (fig.20), foi observado que no total das crises não houve diferença significativa com todos os animais e somente com os que tiveram crises aumentadas, mas houve diminuição do total das crises no grupo de animais que apresentaram as crises reduzidas (fig. 20A). Ao avaliar o tipo de crise individualmente, foi observado que houve diminuição das crises nível 3 no período TRAT quando comparado ao período PRÉ-TRAT (fig. 20B). Similarmente, ao avaliar as crises de nível 4, foi observado que houve uma diminuição estatisticamente significativa no período TRAT quando comparado ao PRÉ-TRAT no grupo de animais que apresentaram crises reduzidas. E, não houve animais que apresentaram mais crises (aumentadas) no período TRAT conforme apresentado na (fig.20 C). Já no nível 5, não houve diferença estatística.

Figura 20. Avaliação do perfil das CREs no grupo SOL entre os períodos PRÉ-TRAT e TRAT.





Perfil das crises na fase crônica da epileptogênese. (A) total de crises ($n=10$, $n=7$, $n=3$), (B) crises nível 3 ($n=10$, $n=8$, $n=2$), (C) crises nível 4 ($n=5$, $n=4$), (D) crises nível 5 ($n=8$, $n=4$, $n=2$), teste paramétrico, $p < 0,05$. Valores expressos em média $\pm$ EPM. * $<0,05$, ** $<0,005$, *** $<0,0005$.

O mesmo perfil foi observado ao avaliar o perfil das crises entre os períodos TRAT e PÓS-TRAT. Com a diferença de que no nível 4, houve diferença estatisticamente significativa, também, no total das crises, além do grupo reduzido.

6. DISCUSSÃO

Estudos anteriores do nosso grupo verificou que SOL apresenta efeito na neuroproteção hipocampal em modelo experimental de ELTM em um estudo quando utilizado como veículo da caulerpina (CAU), um alcaloide hidrossolúvel. Assim, o grupo de animais que receberam CAU+SOL apresentaram efeito anticonvulsivante e neuroprotetor e, curiosamente, os animais que receberam somente SOL promoveram uma neuroproteção hipocampal. Dessa forma, o presente estudo avaliou o efeito de SOL em modelo experimental de ELTM, utilizando vias de administração e dosagens diferentes. O pré-tratamento com SOL na dosagem de (30%/70%, SOL/SAL, v/v, respectivamente) administrado pela via (I.H) 30 minutos antes da administração de PILO (I.H) não conferiu efeito nas crises durante SE (Fig. 6). Esse achado pode estar associado à via de administração utilizada, visto que a administração de PILO de modo local pode conferir maior ativação em receptores muscarínicos colinérgicos hipocampais culminando, assim, em potencialização do desequilíbrio excitatório e inibitório. De fato, Castro e colaboradores (2011) afirmam que os efeitos de PILO administrada pela via (I.H) são localizados regionalmente em comparação com o modelo de administração de PILO pela via sistêmica.

Por outro lado, foi observado que, apesar de não apresentar efeito sob as crises, SOL reduziu a marcação de morte neuronal no hipocampo total e em CA3 e Hilo individualmente (Fig. 8), isso pode ser explicado devido ao mecanismo de processamento hipocampal, onde o Hilo é a região onde se iniciam os processos epileptogênicos (Sloviter, 1994). Como a cânula foi implantada nessa região, é possível que SOL tenha apresentado maior efeito neuroprotetor no hilo e na subsequente região CA3. Segundo Arundine e Tymianski (2003), a morte neuronal que ocorre devido a indução de SE pode ser relacionado com a excitotoxicidade provocada pela ativação excessiva dos receptores de glutamato e alto influxo de Ca^{2+} aos neurônios. Como SOL tem demonstrado efeito na modulação de cálcio (Chauvet et al., 2015), é possível que a redução da morte neuronal esteja associada a um efeito de SOL em reduzir o influxo de cálcio nos neurônios hipocampais, o que leva a uma diminuição no processo de neurodegeneração.

Os resultados obtidos por meio da via de administração (I.H.) de SOL e PILO instigou ao questionamento de como seriam os efeitos de SOL quando administrado pela via (I.H) no modelo sistêmico de indução do SE com a administração de LI-PILO (I.P). Assim, quando administrado pela via (I.H) 30 minutos antes da indução de SE por LI-

PILO (I.P.) (Fig. 9 e 11), SOL apresentou efeito em reduzir o total das crises tipo 3, 4 e 5 durante SE, além disso, reduziu a marcação de neurodegeneração nas regiões CA1 e CA3 no hipocampo contralateral e em CA3 e HILO no hipocampo ipsilateral, reforçando a hipótese de que com a implantação da cânula no hipocampo ipsilateral, o efeito neuroprotetor foi mais intensificado em HILO e em sua região subsequente CA3. Com a mudança da via indutora do SE, o SOL apresentou perfil diferente no efeito sob as crises, além de manter a ação de diminuir a neurodegeneração hipocampal.

Esses achados podem ser justificados frente ao modelo de indução de SE, visto que a administração sistêmica de LI-PILO pode ter refletido em uma interação dos fármacos de forma distribuída pelos tecidos corpóreos reduzindo, então, a intensificação da ativação de receptores colinérgicos muscarínicos hipocampais e, consequentemente, gerando um novo perfil da ocorrência das crises e neurodegeneração hipocampal.

Além disso, nesse modelo, foi avaliado, também, o efeito do SOL na expressão de genes associados ao processo epileptogênico (Fig. 13) e foi observado, assim, que *BDNF* foi superexpresso no hipocampo dos animais tratados com SOL quando comparados com os animais do grupo controle SAL(I.H.) + LI-PILO(I.P) e aos animais *Naive*. Esse achado pode dar sustentação a hipótese de que com os níveis aumentados, *BDNF* contribuiu para a redução das crises e da neurodegeneração nos animais pré-tratados com SOL. O estudo de Egbenya e colaboradores (2023) evidenciaram um aumento significativo no *BDNF* total nos terminais pré-sinápticos CA3 do hipocampo, sendo os principais fatores que desencadeiam alterações nas concentrações de *BDNF* são o influxo de Ca^{2+} e a liberação de glutamato. A atividade do Ca^{2+} é um importante regulador do *BDNF*, logo alterações na rede neuronal induzidas pelo Ca^{2+} têm implicações significativas para o *BDNF* (lindvall et al., 1994). O *BDNF* tem recebido a maior atenção devido ao seu possível papel no desenvolvimento de numerosos distúrbios neurológicos e psiquiátricos e devido ao seu potencial valor terapêutico (Gliwiska et al, 2023). Assim, *BDNF* tem sido estudado como um possível biomarcador de gravidade da epilepsia (McGonigal et al, 2023). Em modelo crônico de epilepsia, foi observado que *BDNF* estava em níveis aumentados nas regiões pré-sinápticas de neurônios de CA3 (Egbenya et al., 2023).

Apesar do SOL não ter modulado a expressão de *TNF- α* , *GFAP* e *NPY* quando comparado ao grupo controle, foi observado que esses transcritos se apresentaram aumentados no grupo SOL(I.H.)+LI-PILO e SAL(I.H.)+LI-PILO quando comparados ao

grupo *Naive*, evidenciando, assim, que são genes que sofrem modulação durante o processo epileptogênico.

Diante dos achados associados ao pré-tratamento de SOL pela via (I.H) 30 minutos antes da indução de SE, tornou-se necessário avaliar o efeito desse excipiente farmacêutico na via sistêmica. Por se tratar de uma via em que o perfil farmacocinético, farmacodinâmico e metabólico é diferente, foi aumentada a dosagem de SOL para 45%/55%, SOL/SAL, v/v, respectivamente) e o tempo de pré-tratamento passou para 1 hora antes da indução de SE.

Curiosamente, com a administração de SOL (I.P), foi observado que houve redução das crises tipo 2, 3, 4 e 5 quando comparado ao grupo controle fig 14. Diante disso, foi levantado a hipótese de que como se trata de uma administração sistêmica na via (I.P), um tecido altamente vascularizado e como SOL apresenta uma porção lipofílica, houve uma maior facilitação de SOL para alcançar a corrente sanguínea sistêmica e isso ocasionou na redução do desequilíbrio excitatório celular ocasionada pelo LI-PILO culminando na redução das crises.

Dessa forma, ao ser administrado pela via (I.P), o perfil de neurodegeneração foi alterado também fig 16 e 17, assim, foi observado que houve redução da marcação de morte neuronal no HILO do hipocampo esquerdo, porém, ao avaliar o hipocampo direito, não houve redução da morte neuronal quando comparado ao grupo controle. Para entender melhor esse achado, vale ressaltar que a literatura demonstra que em estudos neuroanatômicos e funcionais do SNC existe diferenças hemisféricas esquerda-direita nas regiões cerebrais de humanos e roedores, tais diferenças estruturais e funcionais, no volume do hipocampo e na morfologia das células piramidais do hipocampo, assim como no número é significativamente menor de neurônios nas áreas direitas CA1, CA2 e CA3 do em ratos do que no hipocampo esquerdo (Jordan, 2020; Rogers, 2021; Kozareva *et al.*, 2019; Lister *et al.* 2006).

Além disso, foi observado, que no perfil da expressão gênica (Fig 18), houve modulação de *GPAF*, nesse caso, níveis diminuídos de *GFAP* foram observados no grupo SOL quando comparado ao grupo controle. Astrócitos ativos e micróglia emitem a citocina pró-inflamatória TNF- α que controla a N-caderina, que é essencial para o desenvolvimento e estrutura das sinapses excitatórias que amplifica a transmissão glutamatérgica e resulta em influxo excessivo de íons de cálcio e neurotoxicidade (Rana; Musto, 2018).

Vale ressaltar que o hipocampo utilizado para avaliação de expressão gênica foi o esquerdo, o que pode corroborar, dessa forma, com a neurodegeneração reduzida no hipocampo esquerdo visto que a superexpressão de *GFAP* está associada ao processo neurodegenerativo durante a epileptogênese. Assim, os grupos SOL(I.P)+LI-PILO e SAL(I.P)+LI-PILO apresentaram aumento nos níveis de *GFAP* quando comparados ao grupo *Naive* evidenciando, portanto, que esse gene está associado ao processo epileptogênico (Marques et al., 2013). No estudo Diaz e colaboradores (2023) foi observado que em hipocampo de camundongos estimulados com PTZ apresentaram aumento nos níveis de *GFAP* e um padrão anormal de oscilações intracelulares de Ca^{2+} . Assim, é possível que uma modulação de Ca^{2+} por SOL possa ter influenciado nos níveis de *GFAP*. Além disso, Nashar e colaboradores (2022) mostraram que com o tratamento com extrato de *Stevia rebaudiana* Bertoni por via oral durante 4 semanas diminuiu os níveis de *GFAP* em CA3 de hipocampo de ratos. É possível que SOL esteja modulando os níveis de *GFAP* em CA3 também.

Ao verificar o efeito de SOL nas crises durante o SE, foi levantado o questionamento da possibilidade de SOL apresentar efeito nas CREs. Assim, foram realizados os grupos SAL e SOL da fase crônica da epileptogênese. Ao avaliar o efeito de SAL na fase crônica da epileptogênese, foi observado que houve redução das crises nível 3 no grupo SAL fig. 19 que pode ser explicado devido ao processo de manipulação animal que confere redução de estresse que é considerado um fator indutor de crises. De fato, Manouze e colaboradores (2021) demonstra que a manipulação animal reduz o estresse animal de modo a diminuir a ocorrência das crises epiléticas visto que os ratos são seres sociáveis e o contato com o manipulador assemelha a convivência em grupo. Além disso, segundo Racine (1972), a crise tipo 3 é mais branda quando comparadas ao nível 4 e 5 que são crises generalizadas.

Ao avaliar o efeito do SOL na fase crônica foi observado que SOL, também, apresenta efeito de reduzir o total de crises, nesse caso as CREs. Esse achado demonstra que SOL apresentam efeito biológico e age como anticonvulsivante fig. 20. Vale ressaltar que foi observado uma redução das crises em 70% dos animais no grupo reduzido, sendo assim, SOL não conferiu efeito em 30% da amostra, esse dado se assemelha ao que é verificado no perfil da farmacorreristência em seres humanos (Weaver; Pohlmann-Eden, 2013).

Esse é o primeiro estudo em que o excipiente SOL é associado a um efeito terapêutico na epilepsia, assim, espera-se que novos estudos sejam realizados para

auxiliar na compreensão dos mecanismos farmacológicos envolvidos para conferir a ação anticonvulsivante e antiepileptogênica desse excipiente farmacêutico.

7. CONCLUSÃO

Diante dos achados, sugere-se, então, que o excipiente farmacêutico SOL apresenta:

1. efeito anticonvulsivante visto que reduz o total de crises durante SE e na fase crônica da epileptogênese;
2. efeito antiepileptogênico por reduzir a neurodegeneração hipocampal
3. efeito antiepileptogênico por promover modulação de transcritos de genes associados ao processo epileptogênico como aumento dos níveis de transcritos de *BDNF* e diminuição dos níveis de *GFAP* na fase aguda da epileptogênese em modelo experimental de ELT.

PERSPECTIVAS

Frente aos achados do presente estudo, surge-se a possibilidade de explorar mais conhecimentos do SOL por meio realização de estudos que possam avaliar o efeito do SOL em modelo experimental de convulsão, o efeito terapêutico associado a fármacos anticonvulsivantes e, inclusive, em mecanismos de farmacorresistência associada a epilepsia do lobo temporal mesial.

REFERÊNCIAS

- ALI, S., KOLTER, K. Kolliphor® HS 15 - An Enabler for Parenteral and Oral Formulations. **American Pharmaceutical Review**. 22(1), 2019.
- AMARAL, D.; LAVENEX, P. **Hippocampal Neuroanatomy**. In: The Hippocampus Book. Eds. Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J, Oxford University Press, New York, 2006.
- ARUNDINE M.; TYMIANSKI, M. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. **Cell Calcium**. 34: 325-337, 2003.
- AULTON, M. E.; TAYLOR, K. M. G. Delineamento de formas farmacêuticas. 4ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.
- BHASKAR, V. V. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for quantitative estimation of solutol HS15 and its applications. **Journal of Pharmaceutical Analysis**. 5(2):120–129, 2015.
- BARBOSA, M. R. **Efeito de variações de fotoperíodo na expressão de Per2 e Bdnf no cérebro de camundongos da linhagem C57BL/6**. 2017. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2017.
- BOTE, P. P.; et al. Hippocampal Sclerosis: Histopathology Substrate and Magnetic Resonance Imaging. **Seminars in Ultrasound, CT and MRI**. 2-14, 2008.
- BRASIL, Ministério da Saúde. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Epilepsia. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Epilepsia**. Brasília: Ministério da Saúde, 2019.
- BRODIE, M. J. Outcomes in newly diagnosed epilepsy in adolescents and adults: Insights across a generation in Scotland. **Seizure**. 44: 206–210, 2017.
- BUGGINS, T. R.; et al. The effects of pharmaceutical excipients on drug disposition. **Advanced Drug Delivery Reviews**. 59: 1482 – 1503, 2007.
- CABALLERO, M. L.; et al. Hidden Dangers: Recognizing Excipients as Potential Causes of Drug and Vaccine Hypersensitivity Reactions. **J Allergy Clin Immunol Pract**. 9(8):2968-2982, 2021.
- CASTRO, O.; W.; et al. Comparative neuroanatomical and temporal characterization of FluoroJade-positive neurodegeneration after status epilepticus induced by systemic and intrahippocampal pilocarpine in Wistar rats. **Brain Research**. 1374: 43-55, 2011.

CAPLAN, R. Epilepsia, linguagem e habilidades sociais. **Cérebro Lang.** 193 :18–30, 2019.

CHRISTENSEN, J.; et al. Estimates of epilepsy prevalence, psychiatric co-morbidity and cost. **Seizure.** 107: 162-171, 2023.

DIAZ-ARRASTIA, R.; et al. Acute biomarkers of traumatic brain injury: relationship between plasma levels of ubiquitin C-terminal hydrolase-L1 and glial fibrillary acidic protein. **J. Neurotrauma.** 31, 19–25, 2014.

DIAZ, F. et al. Enhanced Astrocyte Activity and Excitatory Synaptic Function in the Hippocampus of Pentylentetrazole Kindling Model of Epilepsy. **Int J Mol Sci.** 24(19): 14506, 2023.

DE SIMONI, M. G., et al. Inflammatory cytokines and related genes are induced in the rat hippocampus by limbic status epilepticus. **Eur J Neurosci.** 12(7):2623-33, 2000.

DIPIRO, J.T.; et al. **Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach.** 10th ed. New York, NY: McGraw-Hill Education. 837–866, 2017.

DO NASCIMENTO, A. L.; et al. Neuronal degeneration and gliosis time-course in the mouse hippocampal formation after pilocarpine-induced status epilepticus. **Brain Res.** 98–110, 2012.

DUDEK, E. F., SUTULA, T. P. Epileptogenesis in the dentate gyrus: a critical perspective. **Prog Brain Res.** 163:755-73, 2007.

EGBENYA, D.; L.; et al. Synapse-specific changes in Arc and BDNF in rat hippocampus following chronic temporal lobe epilepsy. **Neuroscience Research.** 191: 1-12, 2023.

EL BAHH, B., et al. The anti-epileptic actions of neuropeptide Y in the hippocampus are mediated by Y and not Y receptors. **Eur J Neurosci.** 22(6):1417-30, 2005.

ELSHARKAWY, A. E.; et al. Long-term outcome and determinants of quality of life after temporal lobe epilepsy surgery in adults. **Epilepsy Res.** 86: 191- 199, 2009.

ENGEL, J. J. What can we do for people with drug-resistant epilepsy?. **American Academy of Neurology.** 87:2483–2489, 2016.

ENGLLOT, D.J.; KONRAD, P.E.; MORGAN, V. L. Distúrbios de conectividade regional e global na epilepsia focal, sequelas neurocognitivas relacionadas e bases mecánísticas potenciais. **Epilepsia.** 57 :1546–57, 2016.

FIEST, K.M.; et al. Stigma in epilepsy. **Curr Neurol Neurosci Rep.** 14:444, 2014.

FISHER, R. S. et al. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. **Epilepsia.** 55(4):475-82, 2014.

GARGANIS, K.; et al. Temporal lobe ‘plus’ epilepsy associated with oligodendroglial hyperplasia (MOGHE). **Acta Neurol Scand.** 140: 296-300, 2019.

GROOMS, S. Y.; et al. Status epilepticus decreases glutamate receptor 2 mRNA and protein expression in hippocampal pyramidal cells before neuronal death. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** 97, (7): 3631–6, 2000.

GLIWINSKA, A.; et al. The Role of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) in Diagnosis and Treatment of Epilepsy, Depression, Schizophrenia, Anorexia Nervosa and Alzheimer's Disease as Highly Drug-Resistant Diseases: A Narrative Review. **Brain Sci.** 18;13(2):163, 2023.

GURJAR, R. et al. Inhibitory Effects of Commonly Used Excipients on P-Glycoprotein in Vitro. **Mol. Pharmaceutics.** 15, 4835–4842, 2018.

HENNING, O.; et al. **Temporal lobe epilepsy.** Tidsskrift for Den norske legeförening. 2023.

IONOVA, Y.; WILSON, L. Biologic excipients: Importance of clinical awareness of inactive ingredients. **Plos One.** 25;15(6), 2020.

JUNNA, M.; et al. Prognostic importance of risk factors for temporal lobe epilepsy in patients undergoing surgical treatment. **Mayo Clin Proc.** 88: 332-6, 2013.

KANNER, A. M.; CAMPOS, M. G. **Epilepsia del lóbulo temporal**, in Kanner A. M.; Campos M. G. (eds): *Epilepsias: Diagnóstico y Tratamiento*. Santiago, Chile, Editorial Mediterráneo. 252-268, 2004.

KINNIER WILSON, J. V; REYNOLDS, E. H. Translation and analysis of a cuneiform text forming part of a Babylonian treatise on epilepsy. **Medical History** .34: 185–198, 1990.

KLEIN, P.; et al. Commonalities in epileptogenic processes from different acute brain insults: do they translate? **Epilepsia.** 59: 37-66., 2017.

KURITA, T. et al. Very Long-Term Outcome of Non-Surgically. *Plos One.* 11(7), 2016.

LIN, H. W. et al. Fatty Acid Methyl Esters and Solutol HS 15 Confer neuroprotection After Focal and Global Cerebral Ischemia. **Transl Stroke Res.** February; 2014. 5(1): 109–117.

LINDVALL, O.; et al. Neurotrophins and brain insults. **Review.** 17: 490-496, 1994.

MAILLARD L, et al. Semiologic and electrophysiologic correlations in temporal lobe seizures subtypes. **Epilepsia** 45(12):1590- 1599, 2004.

- MARGERISON, J. H.; CORSELLIS, J. A. Epilepsy and the temporal lobes. A clinical, electroencephalographic and neuropathological study of the brain in epilepsy, with particular reference to the temporal lobes. **Brain**. 89: 499–530, 1966.
- MARQUES, T. E. B. S.; et al. Validation of Suitable Reference Genes for Expression Studies in Different Pilocarpine-Induced Models of Mesial Temporal Lobe Epilepsy. **PLoS One**. 8(8): e71892, 2013.
- MARQUES, T. E. B. S. **Efeito do fotoperíodo no status epilepticus e epileptogênese**. 2019. 100 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2018.
- MARTINEZ, M. N.; et al. A Critical Overview of the Biological Effects of Excipients (Part I): Impact on Gastrointestinal Absorption. **AAPSJ**. 2; 24(3):60, 2022.
- McGONIGAL, A., et al. BDNF as potential biomarker of epilepsy severity and psychiatric comorbidity: pitfalls in the clinical population. **Epilepsy Res**. 195:107200, 2023.
- MURGIA, S.; et al. Characterization of the Solutol® HS15/water phase diagram and the impact of the Δ^9 -tetrahydrocannabinol solubilization. **Journal of Colloid and Interface Science**. 390 (1): 129-136, 2013.
- NAGHAVI, F. S., et al. The Involvement of Intra-Hippocampal Dopamine Receptors in the Conditioned Place Preference Induced By Orexin Administration into the Rat Ventral Tegmental Area. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**. 18; (1): 328-338, 2018.
- NASHAR, E., et al. Effects of Stevia rebaudiana Bertoni extracts in the rat model of epilepsy induced by pentylenetetrazol: Sirt-1, at the crossroads between inflammation and apoptosis. **J Integr Neurosci**. 28; 21(1): 21, 2022.
- PARADISO, B. et al. Localized delivery of fibroblast growth factor-2 and brain-derived neurotrophic factor reduces spontaneous seizures in an epilepsy model. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 28; 106(17):7191-6, 2009.
- PATSALOS, P. N.; PERUCCA, E. Clinically important drug interactions in epilepsy: Interactions between antiepileptic drugs and other drugs. **Lancet Neurol**. 2:473-481, 2003.
- PITKÄNEN, A. et al. Epileptogenesis. **Cold Spring Harb Perspect Med**. 18;5(10):a022822, 2015.
- PITKÄNEN, A., ENGEL, J. Past and present definitions of epileptogenesis and its biomarkers. **Neurotherapeutics**. Apr;11(2):231-41, 2014.

PITKÄNEN, A., LUKASIUK, K. Mechanisms of epileptogenesis and potential treatment targets. PITKÄNEN, A., ENGEL, J. Past and present definitions of epileptogenesis and its biomarkers. **Neurotherapeutics**. Apr;11(2):231-41, 2014. 10(2):173-86, 2011.

MANOUZE, H., et al. Antiseizure effects of Anacyclus pyrethrum in socially isolated rats with and without a positive handling strategy. **Epilepsia**. 62 (10):2551-2564, 2021.

MURRAY, C. J.; et al. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **Lancet**. 380:2197–2223, 2012.

Organização Mundial da Saúde. **Epilepsy: a public health imperative**. Geneva: World Health Organization; 2019.

POUND, P.; RITSKES-HOITINGA, M. Is it possible to overcome issues of external validity in preclinical animal research? Why most animal models are bound to fail. **J. Transl. Med**. 16 (1), 304, 2018.

QIAN, F.; TANG, F. R. Metabotropic Glutamate Receptors and Interacting Proteins in Epileptogenesis. **Curr Neuropharmacol**. 14(5):551-62, 2016.

RANA, A.; MUSTO, A.E. O papel da inflamação no desenvolvimento da epilepsia. **J Neuroinflamação**. 15(1):1–12, 2018

SCHARFMAN, H.; et al. Increased neurogenesis and the ectopic granule cells after intrahippocampal BDNF infusion in adult rats. **Experimental Neurology**. 192 (2): 348-356, 2005.

SCHEFFER, I. E., et al. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. **Epilepsia**. 58(4):512-521, 2017.

SEN, A.; et al. Epilepsy in older people. **Lancet**. 395(10225):735-748, 2020.

SHAH, A. K.; Agnihotri. S. A. Recent advances and novel strategies in pre-clinical formulation development: An overview. **Journal of Controlled Release**. 156: 281–296, 2011.

SLOVITER, R.; S. Possible functional consequences of synaptic reorganization in the dentate gyrus of kainate-treated rats. **Neurosci. Lett**, 1992.

STOKES, A. H., et al. Effects of Solutol (Kolliphor) and cremophor in polyethylene glycol 400 vehicle formulations in Sprague-Dawley rats and beagle dogs. **Int J Toxicol**. 32(3):189-97, 2013.

SUN, Z., et al. Hippocampal neuropeptide Y protein expression following controlled cortical impact and posttraumatic epilepsy. **Epilepsy Behav**. 87:188-194, 2018.

- TAKAHASHI, Y., et al. Altered hippocampal expression of neuropeptide Y, somatostatin, and glutamate decarboxylase in Ihara's epileptic rats and spontaneously epileptic rats. **Neurosci Lett.** 23; 287(2):105-8, 2000.
- TATUM, W.O.; IV Epilepsia do lobo temporal mesial. **J Clin neurophysiol.** 29 (5):356–365, 2012.
- TONI, N.; SCHINDER, A. F. Maturation and Functional Integration of New Granule Cells into the Adult Hippocampus. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, 2015.
- TRINKA, E.; KÄLVIÄINEN, R. 25 years of advances in the definition, classification and treatment of status epilepticus. **Seizure.** 44:65-73, 2017.
- VANDRESEN-FILHO, et al. NMDA Preconditioning Attenuates Cortical and Hippocampal Seizures Induced by Intracerebroventricular Quinolinic Acid Infusion. **Neurotoxicity Research.** 24(1), 2012.
- WALKER, M. C. Hippocampal Sclerosis: Causes and Prevention. **Semin Neurol.** 35: 193–200, 2015.
- WEAVER, D., POHLMANN-EDEN, B. Pharmacoresistant epilepsy: unmet needs in solving the puzzle(s). *Epilepsia.* 54, 2:80-5, 2013.
- WEI, F.; et al. Genes de canais iônicos e epilepsia: alteração funcional, potencial patogênico e mecanismo de epilepsia. **Touro Neurosci.** 33:455–77, 2017.
- WIEBE, S., JETTÉ, N. Epilepsy surgery utilization: who, when, where, and why?. **Curr Opin Neurol .** 25(2):187-9, 2012.
- WIESER, H. G. Comissão da ILAE sobre Neurocirurgia da Epilepsia, Relatório da Comissão da ILAE. Epilepsia do lobo temporal mesial com esclerose hipocampal. **Epilepsia.** 45 :695–714, 2004.
- WILLIAMS, P. A., et al. Development of spontaneous recurrent seizures after kainate-induced status epilepticus. **J Neurosci.** 18;29(7):2103-12, 2009.

ANEXOS

AUTOBIOGRAFIA

Após realizar o ensino fundamental e médio em escola pública, chegou a hora de decidir o que eu queria ser, qual a minha profissão. Assim, para traçar os caminhos de uma profissão, escolhi fazer o curso de graduação em Farmácia pela Universidade Federal de Alagoas, um curso integral e de duração de cinco anos, meu ciclo foi entre 2011-2016. Durante esse período, procurei me engajar em atividades extrassala de aula. Desse modo, durante a graduação, participei de 3 ciclos de PIBIC no Laboratório de Biologia Molecular e Celular entre 2013-2016, que me proporcionou conhecer mais de perto a Ciência contribuindo na formação do pensamento crítico, aprendizagem de manipulação animal, técnicas de biologia molecular e histológicas além de colaborar em outros estudos; passei em 3 seleções de Programa de Monitoria, exercendo a função na disciplina de Biofísica e Fisiologia Humana entre 2014-2016, que me fez conhecer o ambiente de sala de aula, técnicas para lecionar e ferramentas didáticas. Em 2015, tive a oportunidade de participar do Curso de Verão de Fisiologia e do Curso de Inverno de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto. Participei de Projeto de Extensão sobre Sexualidade Humana entre 2015-2019, no qual foram realizadas atividades para adolescentes estudantes do ensino fundamental e médio de escolas públicas sobre temas de saúde sexual, oportunidade essa que proporcionou um maior contato com a sociedade.

Ao finalizar a graduação, optei em ingressar na Pós-Graduação *stricto sensu* do Programa de Ciências da Saúde da UFAL no qual, passei em primeiro lugar, sendo bolsista e, a partir de então, pude dar continuidade aos estudos com o SOL além de participar de eventos científicos tanto na área de epilepsia quanto de sexualidade. Após o mestrado que ocorreu entre 2017-2019, optei em prestar a seleção de doutorado no mesmo programa e passei em primeiro lugar. Durante o doutorado, não obtive bolsa logo de início e surgiu a pandemia da COVID-19, desse modo, tive a oportunidade de trabalhar em farmácia comunitária privada como farmacêutica responsável técnica em Marechal Deodoro por 7 meses entre 2020-2021, somente por esse período, pois prestei seleção docente para o Centro Universitário Maurício de Nassau onde além das aulas, participo como orientadora de Monitoria, de Projeto de Extensão, de Projeto de Iniciação Científica e de Trabalho de Conclusão de Curso. Além disso, passei, no mesmo período, na Faculdade Estácio também no qual, além de lecionar, fui preceptora de estágio em Farmácia Comunitária entre 2021-2023 e orientadora de monitoria em 2021.

Paralelo as atividades acadêmicas e científicas, participei do Conselho Regional de Farmácia de Alagoas sendo eleita Diretora, Conselheira Regional, Coordenadora do Grupo de Trabalho em Saúde Mental e do Grupo de Trabalho de Mulheres Farmacêuticas entre 2022-2023. Realizei duas pós-graduações *latu sensu* em Farmácia Clínica e Atenção Farmacêutica 2020-2021 e em Metodologias Ativas de Ensino em Ensino Superior 2021-

2022, e estou finalizando outra pós-graduação *latu sensu* em Aromaterapia 2023-2024. Além disso, prestei o concurso do Exame Nacional de Residência (ENARE) no qual, passei em terceiro lugar em 2023 e em primeiro lugar em 2024 ambos na área da residência em saúde mental, porém, não optei em não me matricular. Pois quero tentar me tornar docente de ensino superior da rede pública Estadual/Federal.



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

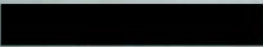


CERTIFICADO

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

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

Maceió, 13 de setembro de 2017.


Profª. Drª. Silvana Ayres Martins
Coordenadora CEUA/UFAL

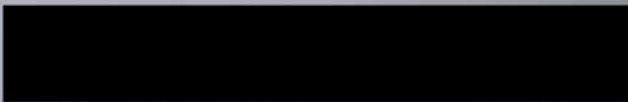



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "*Investigação do efeito do Solutol HS-15 em modelo experimental de epilepsia de lobo temporal induzida por lítio-pilocarpina*", registrada com o nº 14/2019, sob a responsabilidade do pesquisador **Prof. Dr. Daniel Leite Goes Gital**, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alagoas (CEUA/UFAL), em reunião de 23 de julho de 2019.

Vigência da autorização	01.08.2019 a 31.12.2023
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico Wistar
Nº de animais	152
Peso/idade	250 g – 350 g / 60 dias
Sexo	Macho
Origem/Local de manutenção	Biotério Central da Ufal / Biotério Setorial do Instituto de Ciências Biológicas (ICBS) da Ufal.
Colaboradores	Carmem L. A. Silva, Gabriele F. C. Santos, Pedro A. T. Paulino, Erivaldo D. S. Júnior, Wanessa S. Pereira, Maria J. C. Santos, Jéssica G. S. Alves e Dhennyfer L. S. Silva

Maceió, 25 de julho de 2019.


Elvan Nascimento dos Santos Filho
Coordenador da CEUA