

Universidade Federal de Minas Gerais

Mateus Eduardo Herpich

**Pós-condicionamento com
lipopolissacarídeo bacteriano em modelo
animal de epilepsia de lobo temporal**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

MATEUS EDUARDO HERPICH

**PÓS-CONDICIONAMENTO COM LIPOPOLISSACARÍDEO
BACTERIANO EM MODELO ANIMAL DE EPILEPSIA DE
LOBO TEMPORAL**

Dissertação apresentada à banca examinadora da Universidade
Federal de Minas Gerais para obtenção do título de Mestre no
Programa de Pós-Graduação em Neurociências

Orientador: Prof. Dr. Marcio Flavio Dutra Moraes
Coorientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira
Coorientador: Dr. Leonardo de Oliveira Guarnieri

Belo Horizonte
2020

043

Herpich, Mateus Eduardo.

Pós-condicionamento com lipopolissacarídeo bacteriano em modelo animal de epilepsia de lobo temporal [manuscrito] / Mateus Eduardo Herpich. – 2020. 89 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Marcio Flavio Dutra Moraes. Coorientadores: Prof. Dr. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira; Dr. Leonardo de Oliveira Guarnieri.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Neurociências.

1. Neurociências. 2. Epilepsia. 3. Inflamação. 4. Lipopolissacarídeos. I. Moraes, Marcio Flavio Dutra. II. Oliveira, Antônio Carlos Pinheiro de. III. Guarnieri, Leonardo de Oliveira. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 612.8



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DO ALUNA

MATEUS EDUARDO HERPICH

Realizou-se, no dia 04 de dezembro de 2020, às 13:30 horas, Online, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de dissertação, intitulada *Pós-condicionamento com lipopolissacarídeo bacteriano em modelo animal de epilepsia de lobo temporal*, apresentada por MATEUS EDUARDO HERPICH, número de registro 2018663369, graduado no curso de BIOMEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em NEUROCIÊNCIAS, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Márcio Flávio Dutra Moraes - Orientador (UFMG), Prof(a). Victor Rodrigues Santos (UFMG), Prof(a). Maria Elisa Calcagnotto (UFRGS), Prof(a). Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira (ICB UFMG), Prof. Leonardo de Oliveira Guarnieri - Coorientador (ICBUFGM) .

A Comissão considerou a dissertação: Aprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 04 de dezembro de 2020.

Assinatura dos membros da banca examinadora:

Carlos Magno Machado Dias - Secretário(a)

Prof. Márcio Flávio Dutra Moraes (Doutor)

Prof. Leonardo de Oliveira Guarnieri (Doutor)

Prof. Victor Rodrigues Santos (Doutor)

Prof(a). Maria Elisa Calcagnotto (Doutor)

Prof. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira (Doutor)



Documento assinado eletronicamente por **Marcio Flavio Dutra Moraes, Supervisor(a)**, em 10/12/2020, às 09:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Victor Rodrigues Santos, Professor do Magistério Superior**, em 10/12/2020, às 09:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Elisa Calcagnotto, Usuário Externo**, em 10/12/2020, às 09:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Antonio Carlos Pinheiro de Oliveira, Professor do Magistério Superior**, em 10/12/2020, às 10:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Leonardo de Oliveira Guarnieri, Usuário Externo**, em 11/12/2020, às 10:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0460689** e o código CRC **EBF8C4D1**.

Resumo

A epilepsia é uma doença neurológica crônica caracterizada por crises epiléticas espontâneas, ou reflexas, e recorrentes (SRS). Cerca de dois-terços dos afetados pela doença estão aptos a controlá-la através de terapia medicamentosa. Dentre os casos refratários, a possibilidade de cirurgia de ablação de foco existe para apenas uma parte dos pacientes. Portanto, é necessário compreender os mecanismos por trás da evolução da doença, chamado de epileptogênese, a fim de reverter o quadro ou prevenir a patologia.

Neste trabalho, realizamos um protocolo de pós-condicionamento com lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) em modelo de epilepsia de lobo temporal em ratos por injeção intra-hipocampal (i.h.) unilateral de ácido caínico (KA) a fim de investigar quais são as alterações no processo epileptogênico quando a janela temporal da intervenção inflamatória é alterada, sejam elas patogênicas ou pró-resolutivas.

Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais de acordo com o conteúdo da primeira injeção i.h recebida — Salina (Sal) ou KA — e na segunda injeção, 3 dias após a primeira — Sal ou LPS para cada um dos grupos. Os animais foram registrados em vídeo do 9º ao 17º dia após a 1ª injeção para análise comportamental e das SRS. Em seguida, foram submetidos aos testes comportamentais de preferência por sacarose, enterrar esferas, reconhecimento de objeto e nado forçado. Posteriormente, foram perfundidos e marcados para imunofluorescência com Fluoro Jade C, Iba-1 e GFAP.

Não houve diferença na intensidade, frequência e duração das SRS entre os grupos KA. Contudo, o grupo KA+Sal apresentou uma maior frequência de comportamento de perseguição à cauda. Na preferência por sacarose, o grupo KA+LPS apresentou menor aversão à novidade, comparável ao grupo controle Sal+Sal. Além disso, no reconhecimento de objeto, estes animais apresentaram recuperação da memória de longo prazo em relação ao grupo KA+Sal, até o nível do controle.

Ambos os grupos KA apresentaram um processo inflamatório intenso, caracterizado por aumento nas marcações para microglia e astrócitos. Contudo, o grupo KA+Sal

apresentou uma maior morte neuronal, sugerindo uma resposta imune diferente do grupo KA+LPS.

Estes resultados apontam o pós-condicionamento com LPS como capaz de reduzir os danos provocados pelo KA e recuperar alguns parâmetros comportamentais. Este, portanto, é um protocolo de grande interesse para elucidar questões sobre a epileptogênese e a inflamação.

Palavras-chave: epilepsia, inflamação, pós-condicionamento, lipopolissacarídeo bacteriano.

Abstract

Epilepsy is a chronic neurological disease characterized by spontaneous, or reflex, recurrent seizures (SRS). About two-thirds of the affected are able to control the seizures through medicine usage. Among the refractory cases, the possibility of surgical removal of the epileptic focus exists for only a section of patients. Therefore, it is necessary to comprehend the mechanisms behind the disease evolution, called epileptogenesis, in order to revert cases or prevent the pathology.

In this work, we performed a post-conditioning protocol using bacterial lipopolysaccharide (LPS) in a temporal lobe epilepsy rat model by unilateral intrahippocampal (i.h.) injection of kainic acid (KA) in order to investigate what are the alterations on the epileptogenic process when the timing of the inflammatory intervention is altered, whether they are pathogenic or pro-resolutive.

The animals were divided among four experimental groups according to the content of the first injection — saline (Sal) or KA — and the second injection, three days after the first — Sal or LPS. The rats were video recorded from the 9th to the 17th day after the 1st injection for behavioral and SRS analysis. In sequence, they were submitted to the following behavioral tests: sucrose preference, marble burying, object recognition and forced swim. Afterwards, they were perfused and marked for immunofluorescence with Fluoro Jade C, Iba-1 and GFAP.

There was no difference in the intensity, frequency and duration of the SRS among the KA groups. However, the KA+Sal group presented a higher frequency of the tail chasing behavior. On the sucrose preference test, the KA+LPS group presented a lower novelty aversion, comparable to the Sal+Sal control group. Furthermore, on the object recognition test, these animals presented a higher recovery of the long term memory in relation to the KA+Sal group, up to the control level.

Both groups presented an intense inflammatory process characterized by a raise on the microglia and astrocyte marking. However, the KA+Sal group presented higher neuronal death, suggesting a different profile of the immune response in relation to the KA+LPS group.

These results indicate the LPS post-conditioning as capable of reducing the KA-induced neuronal damage and recovering some of the behavioral parameters. So, this is an experimental protocol of great interest in elucidating the questions about epileptogenesis and inflammation.

Keywords: epilepsy, inflammation, post-conditioning, bacterial lipopolysaccharide.

Agradecimentos

No dia em que decidi fazer a prova da Neurociências eu era uma mistura racêmica de empolgação e ansiedade. Estava encantado com a promessa do que poderia estudar no NNC, mas a perspectiva de mudar sozinho para outro estado era assustadora.

Não fui sozinho e, se tivesse ido, não teria dado certo como deu. Portanto, meu maior agradecimento é para minha companheira, Luiza. Obrigado por fazer comigo essa jornada para lá e de volta outra vez ao Paraná.

Obrigado também à minha “agência de financiamento”, que permitiu que eu passasse mais de dois anos em Belo Horizonte sem bolsa de estudo: pai, mãe, vocês são peça fundamental em tudo o que eu consegui.

Agradeço ao professor Marcio por me receber em seu laboratório sem fazer ideia de quem eu era, abraçar o meu entusiasmo e direcioná-lo para o que seria este trabalho. Espero ter correspondido ao potencial que você viu, e ter aprendido suas lições mais valiosas sobre o pensar científico.

Eu certamente não teria conseguido realizar este trabalho sem a ajuda do Léo, que desde os primeiros dias me ensinou cada um dos procedimentos que realizei, sanando minhas dúvidas mais clássicas e resolvendo meus problemas mais inusitados. Espero que seus próximos orientados tenham situações mais comuns pra lidar do que as minhas, mas obrigado por me ajudar a lidar com o inesperado.

Ainda no laboratório, preciso agradecer ao Flávio pela ajuda com os registros em vídeo, por me ajudar a firmar os pés no chão e, talvez o mais importante, por compartilhar músicas que ressoam por muito tempo; ao Daniel por me ajudar a estruturar raciocínios e clarear ideias; à Lu, Lari, Samir e Gabi pela companhia em experimentos e fora deles e pela ajuda mútua. Aprendi muito com vocês todos.

Obrigado ao professor Antônio por ter entrado nessa logo nas primeiras criações de hipóteses e, nos estágios finais, ter disponibilizado seus recursos para os experimentos e, sempre, suas ideias valiosas. E muito obrigado à Carol por, mesmo nos fins de semana, ter se juntado a mim na bancada.

Não posso deixar de agradecer aos colegas daquelas primeiras aulas em que não sabíamos direito o que estávamos fazendo por lá, aos colegas de laboratório sempre ajudando uns aos outros e às amizades adquiridas no ICB. Vou deixar seus nomes de fora para que não confundam minha falta de memória por falta de apreço, mas saibam que vou guardar os momentos alegres de companheirismo e também os difíceis. Todos são valiosos, e todos deixaram sua marca em mim e neste trabalho

Sumário

| | |
|------------------------------------|-----------|
| Introdução | 9 |
| Epilepsia | 9 |
| Modelos Animais | 11 |
| Epileptogênese | 14 |
| Inflamação | 16 |
| Condicionamento | 17 |
| Pós-Condicionamento | 20 |
| Objetivos | 21 |
| Métodos | 22 |
| Animais | 22 |
| Cirurgia Estereotáxica | 22 |
| Injeção Intra-hipocampal | 23 |
| Acompanhamento e Registro em Vídeo | 24 |
| Testes Comportamentais | 26 |
| Teste de Preferência por Sacarose | 26 |
| Teste de Enterrar Esferas | 27 |
| Teste de Reconhecimento de Objeto | 27 |
| Teste de Nado Forçado | 28 |
| Eutanásia e Perfusão | 28 |
| Fluoro-Jade C | 29 |
| Imunofluorescência | 29 |
| Estatística | 30 |
| Resultados | 31 |
| Crises Recorrentes | 31 |
| Comportamentos Atípicos | 36 |
| Testes Comportamentais | 41 |
| Teste de Preferência por Sacarose | 41 |
| Teste de Enterrar Esferas | 43 |
| Teste de Reconhecimento de Objetos | 45 |
| Teste de Nado Forçado | 48 |
| Morte Neuronal | 51 |
| Microglia | 54 |
| Astrócitos | 56 |
| Discussão | 58 |
| Limitações do Trabalho | 58 |

| | |
|---|-----------|
| Crises Recorrentes na Literatura | 60 |
| Perfil Temporal de Alterações Celulares | 61 |
| Alterações Comportamentais | 62 |
| Crises Recorrentes e Inflamação | 65 |
| Conclusão | 68 |
| Referências | 70 |

Introdução

Epilepsia

A definição de epilepsia mudou ao longo da história humana, mas que sempre esteve presente: durante milênios acreditava-se que a doença possuía um caráter místico, associada a possessão por entidades e demônios — a palavra grega *epilēpsis* deriva do verbo para “tomar controle” ou “possuir” — porém foi somente a partir de 400 AEC, com o tratado de Hipócrates intitulado Sobre a Doença Divina, que a disfunção do sistema nervoso central foi reconhecida como a causa da doença (MAGIORKINIS *et al*, 2010).

A atual definição de epilepsia é de uma doença neurológica caracterizada por uma atividade neuronal excessiva no cérebro, hipersíncrona (ILAE; FISHER *et al*, 2014) com predisposição crônica à geração de crises epiléticas, também chamadas de eventos ictais (NICE CLINICAL GUIDELINE 137, 2012). Outros estudos epidemiológicos fazem ainda distinção entre epilepsia ativa, definida como epilepsia diagnosticada por um médico e sob tratamento ou com ocorrência de uma crise ictal até 12 meses antes do estudo (ZACK; KOBAN, 2017), e epilepsia resolvida, em que o indivíduo não foi acometido de crises ictais nos últimos dez anos e está há pelo menos cinco sem medicação.

A epilepsia afeta mais de 70 milhões de pessoas mundialmente, com maior prevalência em países em desenvolvimento. Enquanto em áreas urbanas a estimativa para a prevalência de epilepsia ativa é de 10,3 casos a cada 1000 habitantes, nas áreas rurais esse número aumenta para 15,4/1000 habitantes (NGUGI *et al*, 2010). No Brasil, seguindo a tendência global, a prevalência na população mais carente é de 7,5/1000 habitantes contra 1,6/1000 habitantes em classes sociais mais elevadas (NORONHA *et al*, 2007). Esta distribuição desigual deve-se em parte aos maiores índices de predisposição em regiões menos desenvolvidas, como infecções, parasitoses e traumatismos cranianos resultantes de acidentes (SINGH; TREVICK, 2016).

O diagnóstico de epilepsia requer a identificação de uma das seguintes condições (ILAE; FISHER *et al*, 2017): no mínimo duas crises ictais não-provocadas ou reflexas em um período maior do que 24 h; uma crise ictal não-provocada ou reflexa e uma probabilidade de, no mínimo, 60% de novas crises ao longo dos próximos 10 anos; ou o diagnóstico de uma síndrome epiléptica, como a Síndrome de Lennox-Gastaut. O diagnóstico diferencial entre epilepsia e outros episódios convulsivos, a identificação do foco epiléptico e do risco de novas crises ictais requerem métodos eletrofisiológicos como a eletroencefalografia (ROSENOW *et al*, 2015). Estes métodos registram a atividade elétrica emergente dos neurônios, cujo padrão de oscilação pode indicar a hipersincronia encontrada na doença.

As diferentes epilepsias são classificadas de acordo com o início das crises e, se possível, enquadradas dentro de uma síndrome epiléptica (FALCO-WALTER *et al*, 2018). As crises podem ter início focal, generalizado ou desconhecido, e as epilepsias se enquadram em uma dessas três categorias ou ainda na categoria combinada (início de crises focal e generalizado), que inclui as síndromes de Dravet e Lennox-Gastaut (SCHEFFER *et al*, 2017).

Em decorrência das várias etiologias existentes, o tratamento medicamentoso é variado, com diferentes mecanismos de ação: bloqueadores de canais de sódio, receptores AMPA ou de NMDA, agonistas de receptores GABA_A, entre outros. A escolha da medicação correta para cada síndrome epiléptica e caso específico é imprescindível, uma vez que o uso incorreto de drogas pode ter efeitos prejudiciais. Por exemplo, a carbamazepina pode agravar crises de ausência (LIU *et al*, 2006) e casos de epilepsia mioclônica juvenil.

Além das crises *per se*, pacientes com epilepsia são mais propensos do que a população geral a sofrerem de comorbidades como dificuldades cognitivas e prejuízos educacionais (BERG *et al*, 2008), transtorno de ansiedade, depressão e outros distúrbios psiquiátricos (GAITATZIS *et al*, 2004). Estas comorbidades podem estar associadas à redução do volume hipocampal independentemente da frequência de crises ictais (CONZ *et al*, 2011), sugerindo causa comum entre elas e a epilepsia, similar a achados em modelos animais .

A atrofia hipocampal, por sua vez, é dependente do dano causado pela reação inflamatória e liberação de espécies reativas de oxigênio (ERO) no processo

epileptogênico (PAUDEL *et al*, 2018). Esta reação inflamatória é relevante não só durante a progressão da doença, mas também em seu início. Antes da ocorrência da primeira crise ictal, durante a epileptogênese, os circuitos neuronais fisiológicos são alterados para um estado patológico por uma série de fatores inflamatórios dependentes da resposta imune (RANA; MUSTO, 2018). Este processo será discutido a fundo nas seções adiante, mas antes é necessário entender os diferentes modelos animais usados para a compreensão da epilepsia.

Modelos Animais

A história dos modelos animais de epilepsia inicia em 1882 com Pietro Albertoni, que utilizou eletrochoques no córtex motor de cães para induzir convulsões e estudar o efeito de drogas como brometos e atropina (LÖSCHER, 2017). Em 1930, um protocolo experimental de limiar convulsivo de eletrochoques foi utilizado em gatos para estudar os efeitos da fenitoína (PUTNAM; MERRIT, 1937). Em 1944, o primeiro modelo roedor de crises convulsivas, utilizando pentilenotetrazol (PTZ) em camundongos, foi desenvolvido (EVERETT; RICHARDS, 1944), trazendo um avanço significativo para a praticidade dos estudos com epilepsia. A partir desses avanços, os Institutos Nacionais de Saúde (*National Institutes of Health*, ou NIH) estabeleceram na década de 1970 o *Anticonvulsant Screening Project*, projeto responsável pela avaliação de mais de 30 mil substâncias e descoberta de fármacos como topiramato e lacosamida (KEHNE *et al*, 2017). A importância de modelos animais, principalmente dos roedores, para o tratamento da epilepsia é, portanto, imprescindível, e a comunidade científica continua desenvolvendo novos modelos ao longo dos anos.

Pioneiros na pesquisa em epilepsia, protocolos experimentais usando eletrochoques provocam tanto crises convulsivas agudas quanto alterações neurológicas crônicas, com mudanças na sensibilidade à estimulação elétrica e na intensidade das convulsões ao longo dos dias de intervenção (GRAHAM *et al*, 1969). Para produzir alterações crônicas, a estimulação direta e recorrente da via perfurante, uni ou bilateral, ativa as fibras hipocâmpais aferentes e pode produzir o *status epilepticus*

(SE), ou estado de mal epiléptico, uma crise ictal com duração superior a cinco minutos (NIRWAN *et al*, 2018).

Existe atualmente uma grande gama de modelos genéticos de epilepsia, selecionados através de endocruzamentos para produzir linhagens suscetíveis a certos estímulos ou que apresentem crises espontâneas recorrentes (SRS, do inglês *spontaneous recurrent seizures*). Modelos como os *Genetic Absence Epilepsy Rat from Strasbourg* (GAERS) e os *Wistar Albino Glaxo/Rijwijk* (WAG/Rij) têm crises de ausência, de origem audiogênica no primeiro (VERGNES *et al*, 1982) e espontânea no segundo, podendo também, em linhagens específicas, ter origem audiogênica (SARKISOVA; VAN LUIJTELAAR, 2011). Os *Wistar Audiogenic Rats* (WAR) apresentam crises convulsivas tônico-clônicas com início reflexo após estímulos auditivos de alta intensidade, bem como maior susceptibilidade a estímulos elétricos e drogas pró-convulsivantes (SCARLATELLI-LIMA *et al*, 2003). Eles vêm sendo usados para elucidar a fisiologia, a ocorrência de comorbidades e buscar por novos anticonvulsivantes (CASTRO *et al*, 2017; GARCIA-CAIRASCO *et al*, 2017). Além de ratos, existem modelos de crises audiogênicas em outras espécies de roedores, como os camundongos *Dilute Brown Non-Agouti* (DBA/2) e os *Genetic Audiogenic Seizure Hamsters* (GASH) (CARBALLOSA-GONZALEZ, 2013). Apesar de seu valor para entender a circuitaria ictogênica, estes modelos não são adequados para este trabalho por não permitirem o estudo do processo epileptogênico, conforme será discutido adiante.

Os modelos farmacológicos de epilepsia baseiam-se na ocorrência do SE para a indução das SRS, relacionando-se dessa forma com a ocorrência da doença em humanos, uma vez que os insultos cerebrais mais relacionados à epilepsia em pacientes humanos são crises agudas associadas com SE (HESDORFFER *et al*, 1998). Um dos primeiros modelos desenvolvido foi o de PTZ, cujo antagonismo de receptores de ácido gama-aminobutírico (GABA) aumenta a excitabilidade de neurônios e provoca crises agudas (SQUIRES *et al*, 1984; DHIR, 2012). Este é, portanto, um modelo satisfatório para o estudo da ictogênese e da eletrofisiologia das crises, porém, por não produzir crises recorrentes a longo prazo, não se enquadra no nosso escopo. Já o *kindling* com PTZ, utilizando doses progressivamente maiores em um período de tempo relativamente curto, é capaz de

gerar SE, o que propicia a epileptogênese a longo prazo e fornece um modelo robusto de epilepsia de lobo temporal (ELT) (SHIMADA; YAMAGATA, 2018).

A pilocarpina é outra droga atualmente utilizada de forma abrangente na pesquisa de epilepsia. Estudada nesse contexto pela primeira vez por Turski em roedores (TURSKI *et al*, 1983), seu efeito pró-convulsivante ocorre através da ligação com receptores neuronais muscarínicos M1 e receptores de glutamato do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA). A pilocarpina pode ser administrada tanto via intraperitoneal (i.p.) quanto intra-hipocampal (i.h.), mas a primeira provoca uma maior mortalidade dos animais pela intensa ativação de receptores muscarínicos periféricos. O uso de lítio em conjunto com a pilocarpina potencia a atividade convulsiva em ratos, aumentando a taxa de SE (JOPE *et al*, 1986), enquanto a administração de metil escopolamina reduz os efeitos periféricos e, conseqüentemente, a mortalidade (MUSTO *et al*, 2015), tornando-a mais adequada para estudos a longo prazo da epileptogênese e das SRS.

O modelo de ácido caínico (KA) possui diversas vantagens em relação aos outros modelos de indução de crises. O KA é um análogo de L-glutamato e age como agonista de receptores ionotrópicos glutamatérgicos do tipo KA e α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico (AMPA) (VINCENT; MULLE, 2009). Pode ser administrado via i.p. (LEE *et al*, 2000), subcutânea (GOLDEN, 1995. BERTOGLIO *et al*, 2017), intra-amigdalóide (BEN-ARI *et al*, 1979) e i.h. (RAEDT *et al*, 2009). Esse último método propicia uma menor mortalidade e, mesmo em injeções sistêmicas, a taxa de mortalidade é menor do que a da pilocarpina. A injeção i.p. de diazepam é capaz de encerrar o SE provocado, diminuindo ainda mais a mortalidade do modelo sem reduzir a ocorrência de SRS (MARESCAUX *et al*, 2002). A injeção de KA provoca lesões hipocampais similares às de pacientes com ELT (BEN-ARI *et al*, 1979). A ocorrência de frequentes crises eletrográficas e sua resistência a diversos fármacos anticonvulsivantes fez com que o modelo de injeção i.h. de KA fizesse parte do *Epilepsy Therapy Screening Program* (KEHNE *et al*, 2017). Dentre as diversas linhagens de ratos, os Wistar apresentam a menor variabilidade nos resultados deste modelo em relação aos Sprague-Dawley, Fisher 344 e Long-Evans Hooded (GOLDEN *et al*, 1995). Portanto, a fim de realizar experimentos que dependam do processo epileptogênico, a injeção

intra-hipocampal de ácido caínico em ratos Wistar satisfaz os requisitos deste estudo.

Epileptogênese

A fim de gerar a epilepsia, os diferentes modelos animais dependem de um mesmo processo de alterações estruturais, organizacionais e de homeostase do sistema nervoso, principalmente nas redes neurais e nas células da glia do hipocampo (SIMONI *et al*, 2000. TERRONE *et al*, 2019). Esse conjunto de alterações que conduz à ocorrência das SRS é chamado de epileptogênese. Essas mudanças iniciam com o insulto epileptogênico — o *kindling* ou o SE, no caso dos modelos animais —, ocorrem durante o período latente e continuam a se intensificar depois das primeiras SRS, progredindo e agravando a doença, se não controlada (ENGEL, 2008). Como será exposto adiante, o insulto epileptogênico provoca resposta inflamatória e alterações agudas e crônicas que são a base da patologia.

Os diversos insultos usados nos modelos animais propiciam inicialmente a morte neuronal por meio da excitotoxicidade. A intensa despolarização dos neurônios piramidais do *stratum lucidum* de CA3 pela administração de KA provoca um influxo de cálcio com efeitos citotóxicos para neurônios do *cornus ammonis* 1 (CA1) (VINCENT; MULLE, 2009) e interneurônios. Por meio da ativação da caspase-3, estes neurônios entram em apoptose (KONDRATYEV; GALE, 2000), e não somente a morte celular, mas também a excitação exacerbada, ativam as células da glia (TIAN *et al*, 2005).

Um insulto, mesmo que não seja de natureza infecciosa, provoca uma resposta inflamatória com ativação de microglia e astrócitos e estresse oxidativo (VEZZANI *et al*, 2011) dependente da ativação de receptores TLR4. Nas primeiras horas, um conjunto de citocinas pró-inflamatórias — *e.g.* IL-1, IL-2, IL-6, TNF α e IFN- γ — têm seus níveis aumentados tanto no sangue quanto no tecido nervoso, acompanhadas pela modulação de micro-RNAs (HUANG; ZHU, 2018). A microglia ativada altera sua morfologia e produz citocinas pró-inflamatórias que modificam a expressão de fatores dos astrócitos, aumentam a excitabilidade de neurônios, aumentam a permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE) e recrutam leucócitos

periféricos (VEZZANI *et al*, 2011. PENG *et al*, 2018). Estudos com minociclina, um antibiótico inibidor da microglia, demonstram o papel neurodegenerativo deste tipo celular na epileptogênese, uma vez que o bloqueio da sua atividade reduz a morte neuronal em CA1 e CA3 (TANG *et al*, 2010). Após um período de intensa resposta imune, recrutamento de leucócitos e ativação e multiplicação de células da glia, o tecido nervoso entra em uma fase pró-resolutiva, em que a produção de fatores pró-inflamatórios cai e passam a ser secretados fatores anti-inflamatórios, além dos leucócitos periféricos sofrerem apoptose ou retornarem para a circulação via sistema linfático (SERHAN *et al*, 2011).

Astrócitos ativados apresentam morfologia e atividade diferentes de acordo com a condição da ativação, e tentativas de sistematizá-los em grupos (LIDDELOW; BARRES, 2017) criaram duas categorias abrangentes: Astrócitos A1 e A2, cuja ocorrência se dá após diferentes tipos de insultos — inflamação para A1, isquemia para A2 — e que provocam consequências distintas, respectivamente neurodegeneração e neuroregeneração (LI *et al*, 2019). O mesmo grupo de pesquisa demonstrou que, em camundongos *knockout* *Csf1r* *-/-*, a astrocitose reativa ao lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) depende da microglia (LIDDELOW *et al*, 2017) e que IL-1 β , TNF α e C1q, citocinas presentes na resposta inflamatória durante a epilepsia, são capazes de induzir o fenótipo A1.

Mesmo que as definições dos diferentes padrões de ativação de astrócitos não sejam tão precisas quanto estes trabalhos apontam, o papel de uma população de astrócitos “tipo-A1” na epileptogênese pode ser crucial, uma vez que camundongos B6/CBA — com expressão aumentada de IL-1Ra, o que, teoricamente, propiciaria astrócitos A1 — apresentam crises mais curtas e menos frequentes frente à bicuculina, um antagonista de receptores GABA_A (VEZZANI *et al*, 2000).

Outro fator modificador da doença é o estresse oxidativo sofrido pelas células neurais, que se correlaciona com a inflamação e pode ter papel importante na epileptogênese, uma vez que astrócitos são as células responsáveis por mitigar esse tipo de agressão ao tecido (BHATIA *et al*, 2019). O estresse oxidativo causado pela injeção de H₂O₂ desencadeia uma resposta similar à de um insulto inflamatório, inclusive culminando na regulação positiva de TLR4 e produção de IL-1 β e NF κ B, essenciais para esse processo (ARENA *et al*, 2019). Esse estresse também pode

estar envolvido no hipometabolismo observado durante a epileptogênese na ELT (ZHANG *et al*, 2015).

Tendo em vista todos os fatores não-neuronais que contribuem para o desenvolvimento da epilepsia, a inflamação coloca-se como causa central da patogênese e é, portanto, um promissor alvo de tratamentos (KOSTOULA *et al*, 2019. VAN VLIET *et al*, 2018. CHONG *et al*, 2018). Voltaremos a esse conceito na última seção desta introdução, apresentando uma proposta de tratamento não-farmacológico baseado na inflamação presente na epilepsia e discutindo maneiras de modulá-la.

Inflamação

O processo inflamatório é fundamental para o desenvolvimento da epilepsia e, para compreender as tentativas de modificar a epileptogênese, deve ser melhor compreendido (SIMONI *et al*, 2000).

O cérebro, como um órgão imunoprivilegiado, possui particularidades na resposta inflamatória aos diversos estresses, sejam eles endógenos ou exógenos (ABBAS *et al*, 2015). O reconhecimento de antígenos é realizado pela microglia, células da linhagem dos macrófagos e residentes do SNC. Elas são capazes de identificar, por meio de receptores de superfície ou citoplasmáticos, padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou a dano celular (DAMPs). Esses receptores fazem parte da família dos receptores tipo Toll (*Toll-like receptor*, ou TLR) que, em seres humanos, compreende 12 receptores diferentes, com diversos efeitos e ligantes. Alguns deles, como o TLR4, respondem tanto a PAMPs quanto a DAMPs, como o HMGB1 (VEZZANI, 2020), e o estudo de seus ligantes mais comuns pode elucidar sua ação como um todo.

A molécula de LPS, derivada da parede de bactérias Gram-negativas como a *Escherichia coli*, é um potente ativador da resposta imune inata. Seu reconhecimento pelo organismo começa com a ligação à proteína ligadora de LPS (*LPS-binding protein*, ou LBP) plasmática, que permite a interação com o receptor CD14 presente na superfície de células do sistema imune, como macrófagos e microglia. A molécula adaptadora MD-2 conecta o CD14 ao receptor de superfície

TLR4. No caso dos receptores TLR3 e 4, o domínio citoplasmático *Toll-IL-1-Receptor* (TIR) ativa duas vias distintas, a MyD88-dependente e independente (FITZGERALD *et al*, 2003).

Na primeira, o domínio TIR liga ao fator de diferenciação mielóide 88 (do inglês *myeloid differentiation factor*, MyD88), que recruta as quinases associadas ao receptor de interleucina-1 (*interleukin-1 receptor-associated kinase*, IRAK) 1, 2 e 4 e, em sequência, fosforilam TRAF6 e TAK1 (KAWAI; AKIRA, 2010). A ativação destas proteínas desencadeia a cascata da I κ B-quinase, que conduz à ativação do fator de transcrição NF κ B. Concomitantemente, TAK1 ativa a cascata da MAPK, que conduz à produção de IL-10, molécula anti-inflamatória de ação inibitória sobre a produção de outras citocinas, na apresentação de antígenos pelo MHC-II, e anérgica sobre linfócitos T.

Na segunda via, a ligação das moléculas adaptadoras *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β* (TRIF) e *TRIF-related adaptor molecule* (TRAM) promovem a síntese de IRF3 e liberação de IL-10 e IFN- γ (FITZGERALD *et al*, 2003), com ativação tardia de NF κ B (TANIMURA *et al*, 2008).

A ativação das mesmas vias também pode acontecer pela ligação com receptores endógenos, como ácido hialurônico, biglicano e proteína surfactante A (KAWAI; AKIRA, 2010). Dessa forma, a ativação de receptores TLR4 promove duas vias distintas, com possíveis consequências contrastantes na epileptogênese. Modular esta ativação pode, portanto, alterar o curso da doença.

Condicionamento

A modulação da inflamação em modelos animais de epilepsia é um protocolo utilizado há anos para o estudo das bases fisiológicas da doença. Essa modulação pode ser realizada tanto pela administração de substâncias anti-inflamatórias (LU *et al*, 2018. VAN VLIET *et al*, 2018) quanto pelo controle da resposta imune via seleção de linhagens de animais *knockout* ou *knockdown* (VEZZANI *et al*, 2000. KÓVACS *et al*, 2014. LEMOS *et al*, 2017), ou ainda inativação ou ablação de linhagens celulares como da microglia (ZHU *et al*, 2014).

Outra maneira de modular a inflamação na epilepsia é o condicionamento (PLAMONDON *et al*, 1999). Nestes protocolos um insulto brando ao animal alivia as consequências do insulto principal. Esta intervenção recebe nomenclaturas diferentes de acordo com sua relação temporal com o insulto principal: pré-condicionamento quando ocorre antes do insulto, percondicionamento quando simultânea ou imediatamente em seguida (VINTEN-JOHANSEN; SHI, 2011), ou pós-condicionamento quando ocorre após (DAVIS *et al*, 2005. BINGHAM *et al*, 2011; BINGHAM *et al*, 2013). Dentre esses, o mais estudado no contexto da epilepsia é o pré-condicionamento.

Protocolos de pré-condicionamento para epilepsia fazem uso dos vários modelos de indução da doença, como KA (LEE *et al*, 2000), PTZ (SAYYAH *et al*, 2003), pilocarpina (DMOWSKA *et al*, 2010) e estimulação elétrica (AHMADI *et al*, 2013). Para o condicionamento em si, o estressor mais utilizado é a injeção de LPS, embora o estudo pioneiro de pré-condicionamento na epilepsia tenha utilizado também um insulto isquêmico (PLAMONDON *et al*, 1999).

O estado da arte sobre o pré-condicionamento com LPS demonstra resultados variáveis e dependentes tanto da espécie e idade do animal quanto da janela temporal em que o protocolo é realizado. Em camundongos, a administração de LPS entre 30 min e 12 h antes da injeção intravenosa de PTZ diminui o limiar para desencadear crises (SAYYAH *et al*, 2003). Contudo, após 24 h, o efeito do LPS é protetor, reduzindo a intensidade da crise aguda de pilocarpina e KA de maneira microglia-dependente (MIRRIONE *et al*, 2010) e MyD88-dependente, mas não TRIF-dependente (LAROCHELLE *et al*, 2015).

Já em ratos, a administração de LPS em infantes no 17º dia pós-natal (PN 17) 3 h antes de injeção i.p. de KA aumenta o número de animais com crises tônico-clônicas, o número de mortes e a temperatura corporal média (LEE *et al*, 2000). Em outro protocolo de pré-condicionamento 2 h antes de *kindling* elétrico ou injeção i.p. de lítio e pilocarpina, ratos PN 14 tiveram a epileptogênese facilitada (AUVIN *et al*, 2011a. AUVIN *et al* 2011b). Também em ratos PN 14, o ácido poli-inosínico:policitidílico (poly I:C) — agonista de receptores TLR3 — tem efeito pró-epileptogênico 24 h antes de *kindling* elétrico rápido (DUPUIS *et al*, 2016).

Apesar destes estudos sugerirem que o protocolo de pré-condicionamento em infantes não apresenta benefícios, os efeitos da intervenção com LPS 24 h antes do insulto ainda não foram esclarecidos em animais desta idade. Contudo, o pré-condicionamento com LPS em fêmeas Wistar grávidas (dia gestacional 17), protegeu a prole de dano na massa branca por LPS nos dias gestacionais 18 e 19 (KUMRAL *et al*, 2012).

Em ratos adultos, o pré-condicionamento com LPS 72 h antes da administração de pilocarpina não diminuiu a pontuação das crises agudas ou alterou a morfologia de astrócitos (JAWORSKA-ADAMU *et al*, 2011), porém reduziu a neurodegeneração em CA1, CA3 e giro denteado (GD) (DMOWSKA *et al*, 2010). Outros estudos (AHMADI *et al*, 2013. ESLAMI *et al*, 2015. AMINI *et al*, 2018) demonstram uma redução das crises e dificuldade do *kindling* de maneira dose e tempo-dependente em diferentes modelos de crises convulsivas agudas e SRS.

Efeitos similares ao do pré-condicionamento podem ser proporcionados por estimulação direta de receptores do tipo IL1-Ra em camundongos (VEZZANI *et al*, 2000) e os mesmos receptores mostraram-se efetivos em reverter os efeitos de LPS em ratos infantes (AUVIN *et al*, 2011a).

Em linhagens geneticamente propensas a crises de ausência (WAG/Rij, GAERS e Long Evans), o LPS provoca aumento de *spike-wave discharges* registradas por EEG, com efeito abolido pela administração do anti-inflamatório indometacina (KÓVACS *et al*, 2014). Essa piora pode refletir diferenças na circuitaria neural entre animais selecionados para crises audiogênicas ou de ausência e animais cujas crises são provocadas por *kindling* ou administração farmacológica e cuja epileptogênese pode ser modulada pelo pré-condicionamento, por exemplo: Enquanto o pré-condicionamento nos protocolos de epilepsia provocada pode modificar a reorganização do circuito após o SE, em animais geneticamente propensos a crises o único efeito relevante seria o aumento de excitabilidade de neurônios glutamatérgicos (VEZZANI; VIVIANI, 2015). Isso também levanta questões ainda não estudadas sobre a influência do LPS nas SRS após o estabelecimento da epilepsia, por exemplo, meses após o SE causado por KA.

Pós-Condicionamento

O protocolo de administração de um estressor brando após o insulto principal é chamado de pós-condicionamento. Seus efeitos benéficos já foram demonstrados para a isquemia, inclusive de maneira remota, em que o estresse em um órgão condiciona outro (KIM *et al*, 2014).

O pós-condicionamento com LPS 2 h depois do insulto é capaz de reduzir o recrutamento leucocitário no cérebro após injeção de IL-1 β e na medula espinhal após lesão por compressão (DAVIS *et al*, 2005). Neste mesmo estudo, o pós-condicionamento com LPS 2 h após a administração de IL-1 β também reduziu o infiltrado leucocitário, mas, para fins de comparação, o mesmo efeito não foi obtido através do pré-condicionamento com IL-1 β , sugerindo outro mecanismo de ação, possivelmente via MyD88-independente da ativação de TLR4 (LAROCHELLE *et al*, 2015). Em um modelo *in vitro* de traumatismo cranioencefálico, a morte celular é reduzida e a quantidade de IL-6, aumentada, em cultivo com LPS (BINGHAM *et al*, 2011). *In vivo*, o pós-condicionamento com LPS reduziu linfócitos e plaquetas circulantes, o número de microglia e alterou o perfil de citocinas para redução de IFN- γ e TNF α (BINGHAM *et al*, 2013).

O pré-condicionamento é impraticável como forma de tratamento, visto que não é possível saber quando uma pessoa sofrerá um acidente que causará traumatismo craniano ou será acometido por uma encefalite que desencadeará o processo epileptogênico. Contudo, o pós-condicionamento pode ser uma abordagem terapêutica alternativa e, mesmo que a administração de LPS não seja de todo benéfica, estudar seus efeitos pós-condicionantes pode elucidar questões sobre o desenvolvimento da epilepsia e novos alvos de pesquisa visando o tratamento da doença. É com esse interesse que este trabalho foi realizado.

Objetivos

Objetivo Geral

Este trabalho teve por objetivo demonstrar o efeito da modulação inflamatória na epileptogênese realizada em uma janela temporal posterior ao insulto e, assim, prolongando o período inflamatório agudo pós-injeção de ácido caínico. Tomando como base os trabalhos de pré-condicionamento no mesmo modelo, avaliamos parâmetros comportamentais e histológicos destes quatro grupos experimentais e os comparamos com a literatura científica.

Objetivos Específicos

- Implementar um protocolo de pós-condicionamento com LPS em um modelo animal de ELT por injeção intra-hipocampal unilateral de KA;
- Avaliar a latência para início, frequência, intensidade e duração das SRS e compará-las entre animais submetidos e não-submetidos ao pós-condicionamento;
- Avaliar a memória de curto e longo prazo e os comportamentos hedônico, tipo-ansioso e tipo-depressivo nesses animais por meio de testes comportamentais;
- Avaliar a ocorrência de morte neuronal hipocampal durante o período crônico por meio da marcação com Fluoro Jade C;
- E avaliar a ativação de astrócitos e da microglia por meio de técnicas de imunofluorescência..

Métodos

Animais

A utilização de animais e todos os protocolos experimentais foram autorizados pelo Comitê de Ética em Uso de Animal (CEUA), registrado sob o número 384/2018.

Os animais experimentais utilizados foram ratos machos da linhagem Wistar Hannover a partir de 200 g, obtidos no Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os animais foram alojados no Biotério 2 do ICB-UFMG em caixas coletivas de polipropileno (414 mm X 344 mm X 174 mm), 5 animais por caixa, mantidos em um ciclo de claro-escuro de 12h-12h e com acesso livre a água e alimento (Nuvilab, Quimtia).

Posteriormente, após o início dos procedimentos, os animais foram transferidos para gaiolas de com 35 cm de comprimento, 20 cm de largura e 20 cm de altura, com tampas de grade de 10 cm de altura e alojados individualmente para o bem-estar dos animais e recuperação após a cirurgia.

Os animais foram separados em quatro grupos experimentais, numerados de 1 a 4. Os grupos passaram pelo mesmo procedimento cirúrgico, descrito na próxima seção, e diferem somente no protocolo de injeção intra-hipocampal de maneira que será explicada na seção relevante.

Cirurgia Estereotáxica

Os animais foram submetidos a cirurgia estereotáxica para implantação de uma cânula-guia de injeção no hipocampo ventral esquerdo. As cânulas foram produzidas a partir de agulhas 22G cortadas em 17 mm, cujas pontas foram lixadas e desgastadas por eletrocorrosão a fim de remover lascas. Os ratos receberam anestesia geral com isoflurano (1 mL/mL, Isoforine[®], Cristália Prod. Quím. Farm. Ltda) por meio de sistema de inalação com taxa de indução entre 500 e 1000 mL/min a 5% de isoflurano, e de manutenção da anestesia entre 100 e 200 mL/min

a 2-3% de isofluorano. Uma vez anestesiados, foram fixados no aparelho estereotáxico. Os pelos do escalpo foram removidos e foi realizada a assepsia com álcool 70% e iodopovidona (PVPI). Os animais receberam anestesia local com solução de cloridrato de lidocaína e epinefrina a 2% (MOURÃO *et al*, 2016) e foram posicionados no sistema estereotáxico (Stoelting Co., Wood Dale, IL, EUA). Dois parafusos para fixação do capacete de acrílico foram inseridos no crânio. A cânula-guia foi implantada na região CA3 do hipocampo ventral, nas coordenadas relativas à sutura bregma -5,6 mm anteroposterior, 4,3 mm laterolateral e -5,5 mm dorsoventral, segundo o atlas *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (PAXINOS; WATSON, 2001). Os parafusos e cânula foram fixados com cimento de zinco e acrílico. Ao término da cirurgia, os animais receberam uma injeção subcutânea do anti-inflamatório opióide tramadol (3 mg/kg, diluição resultando em volume aproximado de 1 ml). Os animais permaneceram em repouso e observação no biotério durante 7 dias, até sua completa recuperação.

Injeção Intra-hipocampal

Após o período de recuperação, os animais receberam injeções i.h. em dois momentos distintos. O conteúdo das injeções foi diferente para cada grupo, da seguinte maneira:

Os grupos KA+Sal e KA+LPS receberam dose de KA i.h. (concentração de 9,3 mM, diluição de 0,4 µg/µL de salina, volume total 0,4 µL), administrado por bomba de infusão a 0,1 µL/min (BRAGIN *et al*, 2009) em dois períodos, de modo a facilitar a absorção pelo tecido: Injeção de 0,2 µg/µL, intervalo de 10 min sem remover a sílica injetora, então injeção dos 0,2 µg/µL restantes. Os animais dos grupos Sal+Sal e Sal+LPS receberam o mesmo volume de salina (Sal), administrada da mesma maneira. O tubo de sílica usado para injeção foi mantido dentro da cânula-guia por 1 min após o procedimento para evitar refluxo.

Nos 180 min seguintes, os animais ficaram em observação com registro em vídeo para verificar a ocorrência de SE. Quando ocorreu, o SE foi interrompido após 30 min por meio de injeção i.p. de diazepam (20 mg/kg Laboratório Teuto Brasileiro,

Anápolis, GO, Brasil), seguindo as normas de biossegurança de maneira a evitar a morte dos animais (BEN-ARI *et al*, 1979. DE OLIVEIRA *et al*, 2014).

Três dias após a primeira injeção, os animais dos grupos KA+LPS e Sal+LPS receberam, como parte do protocolo de pós-condicionamento, uma dose i.h. de 8 µg/kg do animal (aproximadamente 0,5 µL) de LPS de *Escherichia coli* 0111:B4 (1 mg/mL, Sigma-Aldrich®), administrado por bomba de infusão a 0,1 µL/10s (AHMADI *et al*, 2013), enquanto os animais dos grupos Sal+Sal e KA+Sal receberam o mesmo volume de salina, administrada da mesma maneira. Novamente, o tubo de sílica foi mantido dentro da cânula-guia por 1 min após o procedimento.

Acompanhamento e Registro em Vídeo

Os animais foram mantidos no biotério por 6 dias após a segunda injeção. A partir do 9º dia após a primeira injeção — ou 6º dia após a segunda —, os animais foram transferidos para caixas de acrílico transparente com as mesmas dimensões das caixas individuais e iniciou-se o registro em vídeo.

As caixas foram dispostas em uma estante de metal com duas a três caixas por patamar, etiquetas com a identificação do animal diante da caixa e uma câmera de filmagem preto-e-branco de resolução 648 x 488 (Intelbras) registrando dois andares, ou quatro animais simultaneamente. Os suportes das câmeras foram desenhados e impressos em impressora 3D no próprio laboratório. Os animais foram registrados por 12 h diariamente (todo o período claro), quatro animais por câmera de vídeo, com o registro durando até o 15º dia após a primeira injeção. O período claro foi escolhido pois, como o período de inatividade dos animais, é quando ocorre a maioria das SRS do modelo de KA (HELLIER; DUDEK, 1999). Como o período silente após SE no modelo de KA dura, em média, 12 dias, registrando os animais do 9º ao 17º dia é possível determinar se houve redução ou aumento da latência para início das SRS entre os grupos.

A Figura 1 a seguir traz um exemplo de imagem registrada.



Figura 1. Representação dos registros em vídeo crônicos. Data e horário do registro no canto superior direito. Identificação das caixas sob as mesmas. É possível ver três animais em repouso (41, 44 e 45) e um animal sobre as patas traseiras (43).

Os vídeos foram analisados em busca de SRS. Os parâmetros observados foram: latência para a primeira crise, duração das crises, intervalo entre crises, número de crises no período observado e intensidade de acordo com a escala de reatividade convulsiva de Racine modificada (1975): Estágio 0 — nenhuma alteração comportamental; estágio 1 — contração das orelhas e face; estágio 2 — espasmos mioclônicos isolados; estágio 3 — clonias das patas anteriores, pescoço e/ou cabeça; estágio 4 — clonias das patas anteriores, pescoço e/ou cabeça com comportamento de levantar e queda; estágio 5 — crise clônica convulsiva (sem a extensão tônica das patas posteriores) iniciando com corrida, seguido da perda do reflexo de endireitamento. O índice de severidade foi considerado a maior pontuação alcançada na escala por cada animal.

Testes Comportamentais

Após o 17º dia após a primeira injeção, os animais foram submetidos a quatro testes comportamentais selecionados para avaliar parâmetros relacionados com comorbidades da epilepsia, realizados na seguinte ordem: teste de preferência por sacarose (*sucrose preference test*, SPT) para o comportamento hedônico; teste de enterrar esferas (*marble burying test*, MBT) para o comportamento tipo-ansioso; teste de reconhecimento de objeto (*object recognition test*, ORT) para memória de curta e de longa duração; e teste de nado forçado (*forced swim test*, FST), para comportamento tipo-depressivo de desamparo. Esta sequência de testes foi escolhida para que testes mais estressantes ao animal (e. g. FST) não interferissem nos outros. A seguir, os detalhes de cada um dos testes comportamentais.

Teste de Preferência por Sacarose

O SPT é um paradigma de escolha entre duas garrafas, uma contendo água e a outra, solução de sacarose (DEKEYNE *et al*, 2012). Esse teste é amplamente utilizado para avaliar a anedonia induzida por estresse, e tanto o SE induzido por KA quanto as SRS podem ser consideradas estressores.

Nesse teste, os animais foram inicialmente habituados a beber de duas garrafas, ambas contendo água, por 24 h antes do teste. No dia do teste, a água de uma das garrafas foi substituída por uma solução de 1% de sacarose. As garrafas foram pesadas e deixadas nas gaiolas por 30 min para o consumo dos animais, então foram removidas, pesadas novamente e recolocadas com a posição invertida — a garrafa da esquerda foi colocada na direita e vice-versa. As garrafas foram pesadas a cada 30 min pelas primeiras 3 h e então novamente 12, 24 e 48 h após o início do teste, invertendo a posição das garrafas a cada pesagem.

A preferência dos animais por sacarose foi calculada como

$$P = S/(S+A)$$

, em que S é o consumo de sacarose acumulado até o período avaliado e A, o consumo de água acumulado até o período avaliado.

Teste de Enterrar Esferas

Este teste, desenvolvido por Treit e colaboradores (1981), tem como fundamento a tendência dos roedores a esconder objetos potencialmente “perigosos”. Drogas ansiolíticas reduzem ou suprimem este comportamento (NICOLAS *et al*, 2006). Os animais são colocados em caixas grandes (414 mm X 344 mm X 174 mm) — padrão para cinco ratos — contendo serragem e 15 esferas de vidro distribuídas regularmente pela superfície, formando três fileiras de cinco esferas. Após 15 min de teste, os animais são removidos cuidadosamente para não perturbar a disposição das esferas e a caixa é fotografada para contagem. Contabiliza-se como esfera enterrada quando aproximadamente $\frac{2}{3}$ da superfície estiver sob a serragem.

Teste de Reconhecimento de Objeto

Neste teste, avalia-se a capacidade do animal de recordar objetos vistos e diferenciá-los de objetos novos. Animais com deficiências na memória de curto ou longo prazo, como ratos com lesão hipocampal, são incapazes de discernir entre objetos novos e objetos já vistos, uma vez que esses tipos de memória possuem grande dependência hipocampal (ENNACEUR *et al*, 1997. BROADBENT *et al*, 2004. MOSES *et al*, 2005).

O experimento é dividido em uma sessão de habituação e três sessões de teste (T1, T2 e T3). Na habituação, o animal foi colocado em um campo aberto por 15 min. Ao fim desse período, o animal foi removido do campo e acrescentou-se dois objetos idênticos (O1 e O2) e equidistantes das paredes (LUINE *et al*, 2003. WALLACE *et al*, 2006), dando início ao T1. O animal foi deixado para explorar os objetos por 5 min, período no qual foi registrado em vídeo. Após 90 min, iniciou-se o T2, no qual o O2 do T1 foi substituído por um objeto novo e o animal foi deixado para explorá-los novamente por 5 min. 24 h após o início de T1 iniciou-se o T3, em que o O2 foi substituído novamente por outro objeto novo, diferente do objeto utilizado em T2. Mais uma vez, o animal foi deixado para explorar os objetos por 5 min.

Na análise dos registros em vídeo, o programa *Xplorat 3.3* foi utilizado para contabilizar o tempo de exploração de cada objeto. Em cada teste (T1, T2 e T3), a preferência por um objeto em relação ao outro foi calculada como:

$$P = O2/(O2+O1)$$

em que O1 e O2 são os tempos de exploração dos respectivos objetos. Uma preferência maior por O2 em T2 e T3 indica que o animal o reconhece como um objeto novo.

Teste de Nado Forçado

O FST avalia o comportamento tipo-depressivo de desamparo, em que o animal colocado em uma situação aversiva e inescapável desiste de nadar ou fugir e assume um comportamento de flutuação, passivo e com o objetivo de conservar energia (KLOET & MOLENDIJK, 2015). O teste consiste em uma sessão de treino, de 15 min, e uma sessão de teste, de 5 min (SLATTERY & CRYAN, 2012). No treino, os animais foram colocados em um cilindro plástico contendo uma coluna de água de 15 cm e coberto por uma grade de acrílico transparente para evitar fugas. Após 15 min, os animais foram removidos e secados para aliviar seu desconforto. 24 h mais tarde, os animais foram colocados no cilindro nas mesmas condições por 5 min e registrados em vídeo por uma câmera posicionada acima do cilindro.

A partir do vídeo, contabilizou-se a latência para o primeiro episódio de imobilidade, bem como a frequência e o tempo total dos episódios de imobilidade, nado, mergulho e tentativas de escalada (PORSOLT *et al*, 1990).

Eutanásia e Perfusão

Após o término dos testes comportamentais (aproximadamente 26 dias após a 1ª injeção), os animais foram eutanasiados e perfundidos para a remoção dos cérebros. Os ratos foram anestesiados por injeção i.p. de cetamina e xilazina e submetidos a perfusão transcardíaca com 100 mL de tampão fosfato-salino (PBS) 0,1 M seguido de 100 mL de paraformaldeído (PFA) a 4%. Uma vez removidos, os cérebros foram armazenados por 72 h em tubos de centrifuga de 50 mL contendo 25 mL de solução de PFA 4% e, após 48 h, transferidos para outro tubo contendo 25 mL de solução de sacarose a 30%. Os cérebros foram cortados em fatias de 40 µm por um micrótomo criostato e armazenados em placas de 96 poços contendo solução crioprotetora até a realização dos métodos imuno-histoquímicos.

A solução crioprotetora foi preparada de acordo com o procedimento a seguir, ajustando as quantias absolutas conforme o necessário para uso: adicionou-se 300 g de sacarose e 10g de polivinilpirrolidona (PVP) a 500 mL de PBS a 0,1 M. Após a solubilização completa com o auxílio de um agitador magnético e placa aquecedora e resfriamento da solução, adicionou-se 300 mL de etilenoglicol. Após nova solubilização, completou-se o volume até 1L com água destilada.

Fluoro-Jade C

Parte das fatias foi selecionada para a marcação por Fluoro-Jade C (FJC), específica para neurônios em degeneração (Ehara e Ueda, 2009).

Inicialmente, as fatias foram removidas da solução crioprotetora, lavadas 3 vezes em PBS a 0,1 M, dispostas em conjuntos de 4 sobre lâminas de vidro magnetizadas e deixadas secar à temperatura ambiente *overnight*.

Para o início do procedimento de marcação, as lâminas foram mergulhadas em solução básica de etanol 80% em NaOH 1% durante 5 min. As lâminas foram transferidas para solução de etanol 70% durante 2 min, então para água destilada, também por 2 min. Em seguida, permaneceram por 20 min em solução de KMnO_4 0,06%, foram lavadas por 2 min em água destilada e transferidas para solução de FJC 0,001% diluída em solução de ácido acético 0,1%, onde ficaram por 20 min.

Após a marcação com FJC, as fatias foram marcadas com solução de 4',6'-diamino-2-fenilindol (DAPI), lavadas em água destilada 2 vezes por 1 min e deixadas para secar em estufa a 37 °C.

Após a secagem, as lâminas foram mergulhadas em xilol por 1 min e montadas com lamínula e meio de montagem DPX. As lâminas prontas foram armazenadas ao abrigo de luz até o momento da microscopia. No microscópio de fluorescência, as lâminas foram observadas com o filtro FITC e fotografadas.

Imunofluorescência

Parte das fatias hipocâmpais foi selecionada para a análise das células da glia, nomeadamente astrócitos e microglia. Estas fatias foram marcadas com GFAP e Iba-1 por meio dos seguintes procedimentos:

Inicialmente, as fatias foram lavadas em água destilada 3 vezes por 30 min em uma placa de 24 poços. Em seguida, foram incubadas com tampão citrato por 1 h em estufa a 70 °C. Após a retirada da estufa e o retorno à temperatura ambiente, os cortes foram lavados 3 vezes com TBS por 10 min. Na sequência, adicionou-se aos poços a solução de bloqueio (BSA 4% e Triton X 0,5% diluídos em TBS) e as placas foram mantidas em agitação por 1 h. Posteriormente, adicionou-se aos poços uma diluição do respectivo anticorpo primário na solução de bloqueio: *rabbit* anti-Iba-1 (1:1500, Wako) ou *mouse* anti-GFAP (1:1000, Cell Signaling). As placas foram incubadas *overnight*. Depois deste período, as fatias foram lavadas por 3 vezes de 10 min com TBS e incubadas no escuro e em agitação por 1 h com o respectivo anticorpo secundário diluído na solução de bloqueio: *anti-rabbit* 647 (para Iba-1) ou *anti-mouse* 488 (para GFAP). Então, as fatias foram lavadas com TBS por 3 vezes por 10 min, incubadas por 30 min com solução de DAPI e lavadas por mais 3 vezes. A microscopia em fluorescência foi realizada com filtros de 488 para GFAP e 647 para Iba-1.

Estatística

Os dados de peso foram avaliados utilizando Two-way ANOVA e correção de Bonferroni.

Os dados das crises espontâneas recorrentes e dos comportamentos atípicos foram avaliados através do teste de Kruskal-Wallis e teste de múltiplas comparações de Dunn.

Os dados dos testes de preferência por sacarose e reconhecimento de objetos foram avaliados por meio de Teste t para Uma Amostra em relação à preferência de 50% e correção de Bonferroni.

Os dados dos testes de enterrar esferas e nado forçado foram analisados utilizando One-Way ANOVA e Correção de Bonferroni.

Resultados

Crises Recorrentes

Todos animais dos quatro grupos experimentais (Sal+Sal, KA+Sal, Sal+LPS e KA+LPS) foram registrados em vídeo a partir do 9º dia após a primeira injeção (Sal ou KA). O registro foi realizado pelas 12 h diurnas (06:00 até 18:00) mas, a fim de tornar a análise viável, somente as 6 h matutinas (06:00 até 12:00) foram analisadas.

Os vídeos foram analisados por um único observador, cego ao grupo do qual cada animal pertencia, em busca de comportamentos indicativos de crises recorrentes espontâneas e presentes na Escala de Racine Modificada, bem como outros comportamentos atípicos não necessariamente relacionado às SRS.

O primeiro parâmetro avaliado foi o número de crises dos quatro grupos, apresentado na Figura 2. As SRS foram observadas majoritariamente em animais dos grupos que receberam KA, com exceção de um único animal do grupo Sal+LPS, que consideramos como um *outlier*. Contudo, animais dos grupos Sal apresentaram comportamento atípico, que será discutido na próxima seção do trabalho.

Dentre os animais que tiveram SRS, a média de ocorrência das SRS foi similar entre os grupos KA+Sal e KA+LPS, sem diferença estatisticamente significativa entre eles.

Em seguida, os grupos foram comparados pela intensidade das crises de acordo com a Escala de Racine Modificada. A análise dos vídeos não foi precisa o suficiente para determinar crises com pontuação 1, uma vez que a qualidade da gravação não foi suficiente para evidenciar comportamentos discretos como contrações da face. Contudo, comportamentos mais evidentes, como automatismos de cabeça e membros, foram claramente verificados. Estes resultados estão expostos na Figura 3.

Total de SRS

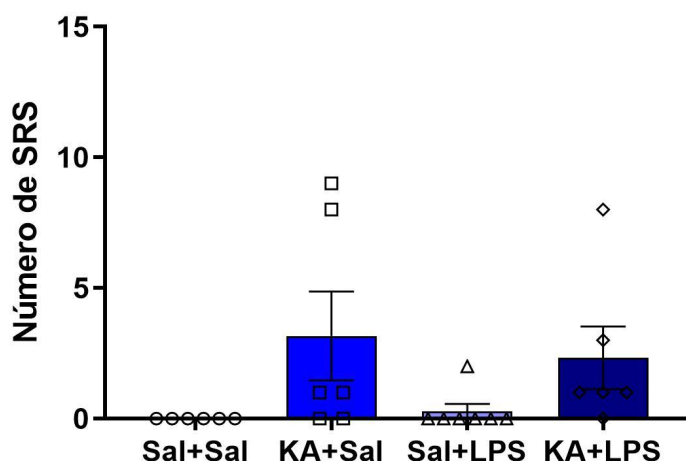


Figura 2. Número total de crises espontâneas recorrentes observadas em animais Sal+Sal, KA+Sal, Sal+LPS e KA+LPS. Valores representam a média \pm SEM. Sal+Sal n = 6; KA+Sal n = 6; Sal+LPS n = 7; KA+LPS n = 6. Comparações entre grupos com teste de Kruskal-Wallis com teste de múltiplas comparações de Dunn.

Pontuação máxima das SRS

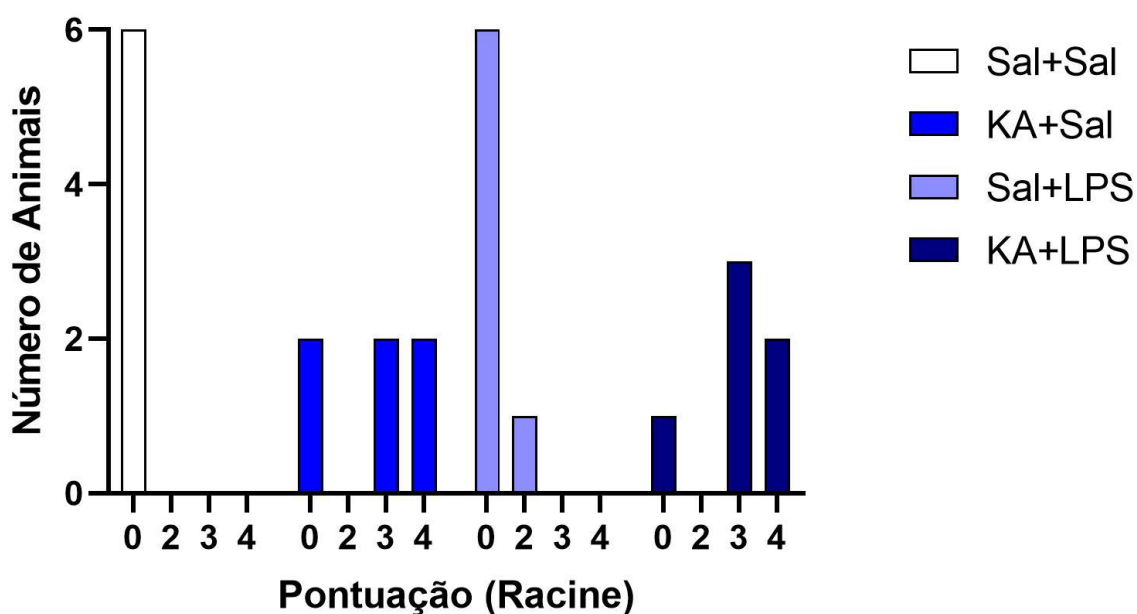


Figura 3. Número de animais com crises e pontuação máxima das crises espontâneas recorrentes (SRS) na Escala de Racine Modificada. Sal+Sal n = 6; KA+Sal n = 6; Sal+LPS n = 7; KA+LPS n = 6.

Nenhum animal do grupo Sal+Sal apresentou SRS, e apenas um animal do grupo Sal+LPS. É possível que, em meio aos outros comportamentos atípicos — discutidos na próxima seção —, este tenha sido confundido pelo analista dos registros em vídeo com uma crise convulsiva. Alternativamente, este animal pode ter sofrido uma infecção oriunda da cirurgia que provocou uma inflamação e lesão suficiente para provocar comportamento similar às SRS (ZHAO *et al*, 2018).

Os animais dos grupos KA+Sal e KA+LPS tiveram quantidades similares de SRS — 4 e 5, respectivamente —, e ambos os grupos têm dois animais com crises no estágio quatro da escala de Racine, a maior pontuação verificada neste trabalho. Apesar do reduzido número de animais experimentais não ser ideal, a baixa variabilidade destes dados sugere que o tratamento com LPS não altera a intensidade das crises neste modelo animal, seja as intensificando ou abrandando. Na sequência, avaliou-se o tempo total de SRS dos grupos KA e a média de duração das crises para estes grupos. Os resultados podem ser encontrados na Figura 4.

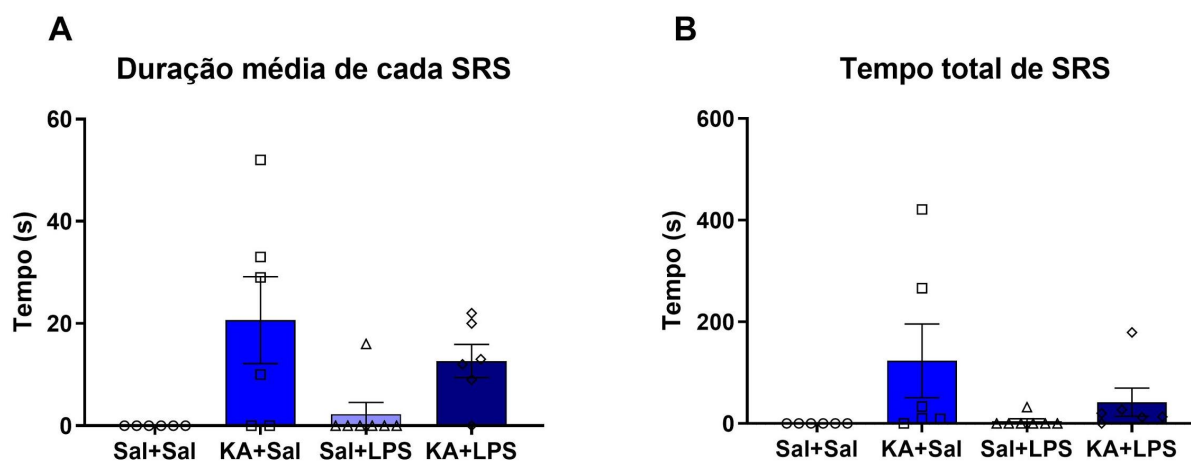


Figura 4. Duração média (A) e tempo total (B) despendido em crises espontâneas recorrentes (SRS). Valores representam a média de tempo (em segundos) \pm SEM. Sal+Sal n = 6; KA+Sal n = 6; Sal+LPS n = 7; KA+LPS n = 6. Comparações entre grupos com teste de Kruskal-Wallis com teste de múltiplas comparações de Dunn.

Não houve diferença estatisticamente significativa na duração média das crises ou no tempo total de crises. Contudo, três animais do grupo KA+Sal apresentaram uma duração média das crises maior do que qualquer animal do grupo KA+LPS. Também, dois animais do grupo KA+Sal tiveram um tempo total de SRS maior que 200 s — mais elevados do que o animal com maior tempo total de crises no grupo KA+LPS.

A fim de esclarecer a diferença entre as crises dos grupos KA+Sal e KA+LPS, foi realizada a análise da área sob a curva do tempo cumulativo de SRS. Estes resultados estão expostos na Figura 5.

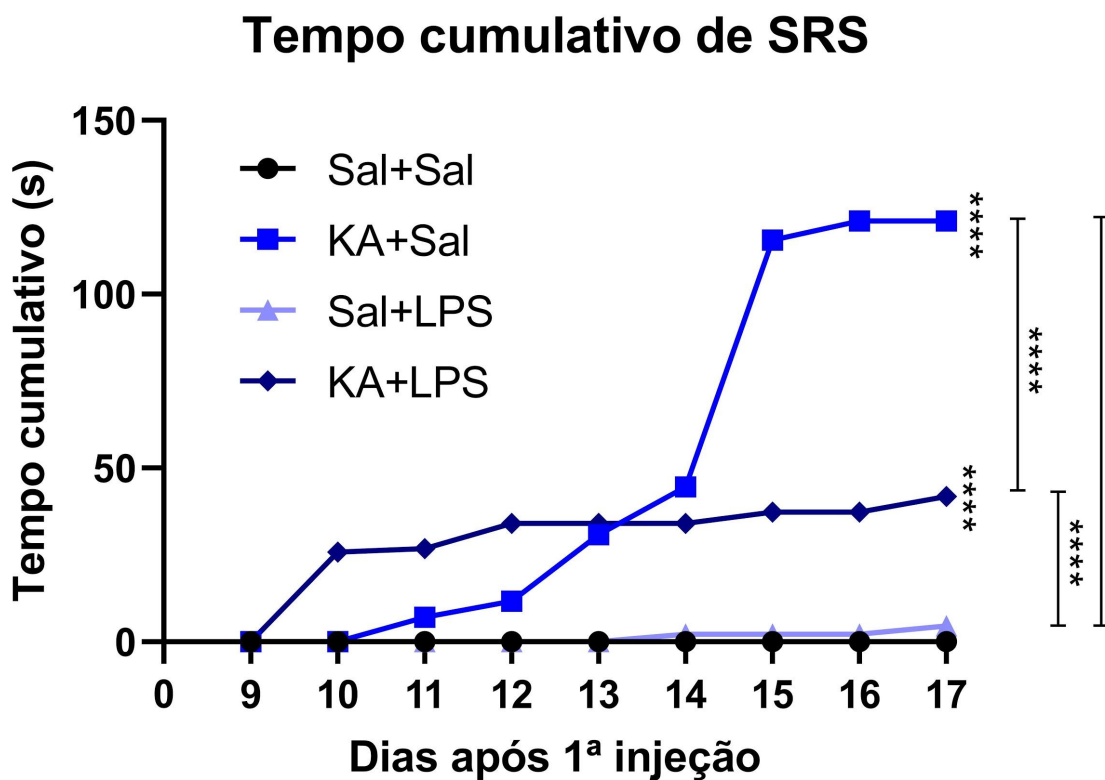


Figura 5. Tempo cumulativo despendido em crises espontâneas recorrentes (SRS). Valores representam a média de tempo (em segundos) de cada grupo. Sal+Sal n = 6; KA+Sal n = 6; Sal+LPS n = 7; KA+LPS n = 6. Área sob a curva, ANOVA de uma via. **** p < 0,0001.

A área sob a curva foi significativamente maior nos grupos KA do que nos controles, e maior no grupo KA+Sal do que no KA+LPS. Portanto, o tempo despendido em

SRS mostrou-se significativamente diminuído pelo pós-condicionamento. Esses resultados sugerem que as crises recorrentes nos animais KA+LPS foram contidas antes das crises nos animais KA+Sal, e este resultado pode indicar que o pós-condicionamento com LPS tornou o sistema nervoso mais capaz de interromper as crises, mesmo que não consiga evitar que ocorram. Contudo, uma avaliação mais extensa, com mais animais, seria necessária para uma conclusão definitiva.

Por fim, o dia de início das SRS foi comparado entre os grupos. A figura 6 apresenta a porcentagem cumulativa de animais de cada grupo que apresentou SRS até o dia respectivo, enquanto a Figura 6 apresenta o número de animais com SRS a cada dia de registro..

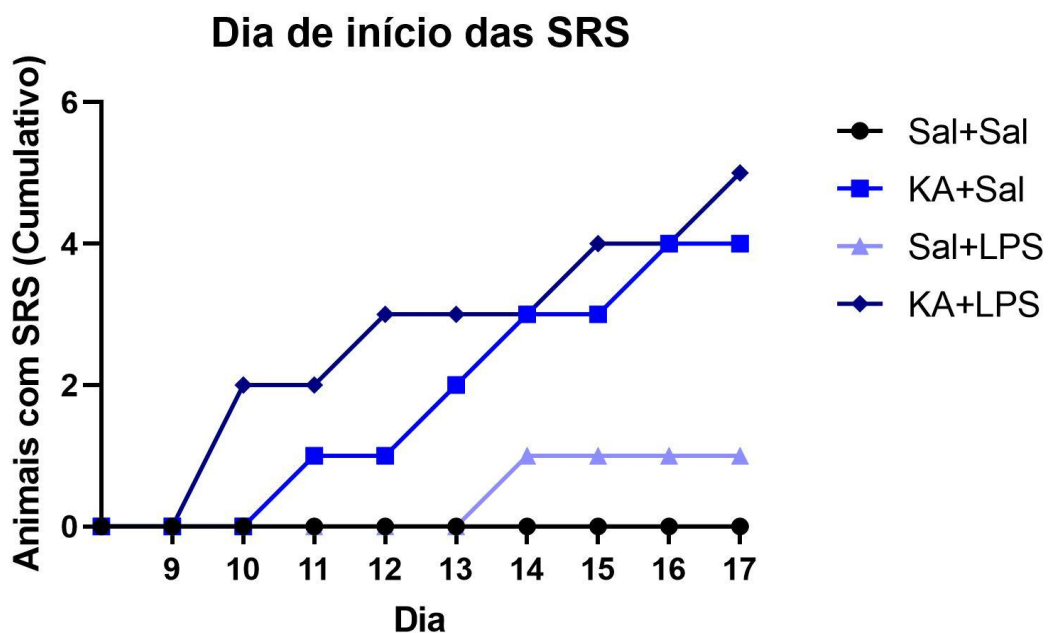


Figura 6. Dia de início das crises espontâneas recorrentes (SRS) após a primeira injeção intra-hipocampal. As linhas representam o número cumulativo de animais que apresentaram crise até o dia correspondente. Registros iniciam no 9º dia após a injeção de ácido caínico (KA) e encerram no 17º dia. Sal+Sal n = 6; KA+Sal n = 6; Sal+LPS n = 7; KA+LPS n = 6.

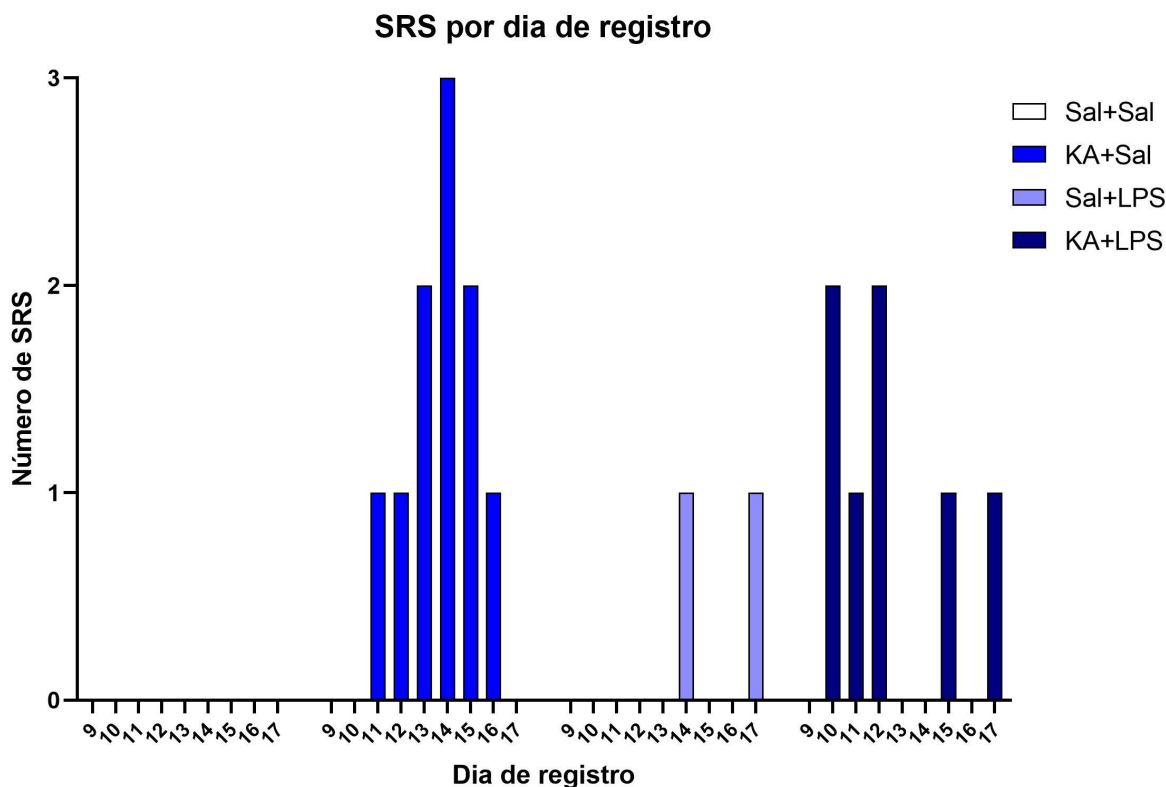


Figura 7. Número de animais com crises recorrentes (SRS) a cada dia de registro em vídeo. Os registros se iniciam no 9º dia após a injeção de ácido caínico (KA) e encerram no 17º dia. Sal+Sal n = 6; KA+Sal n = 6; Sal+LPS n = 7; KA+LPS n = 6.

O primeiro grupo a apresentar crises espontâneas foi o grupo KA+LPS, com dois animais no 10º dia após a 1ª injeção (2º dia de registro). A partir do décimo primeiro, animais do grupo KA+Sal também apresentaram SRS, e ambos os grupos tiveram alta incidência de animais com SRS: 5 (83%) dos animais KA+LPS e 4 (66%) dos animais KA+Sal. Novamente, o grupo KA+LPS não se mostrou mais protegido das crises recorrentes do que seu controle, mas um número maior de animais experimentais seria necessário para demonstrar um início antecipado das crises.

Um único animal do grupo Sal+LPS apresentou SRS, que iniciaram no 14º dia após a 1ª injeção. Em contrapartida, nenhum animal do grupo Sal+Sal apresentou SRS.

Comportamentos Atípicos

Além das crises espontâneas recorrentes, outros comportamentos atípicos foram verificados nos animais de todos os grupos e analisados. Os dois principais

comportamentos notados foram a perseguição à própria cauda e eventos de sobressalto, isolados ou sucessivos.

Eventos de perseguição à cauda foram caracterizados como movimento em torno do próprio eixo com ou sem corrida, apreensão da cauda com a boca ou com os membros anteriores. O número total de eventos de perseguição à cauda de cada grupo e a duração média desses eventos estão expostos na Figura 8.

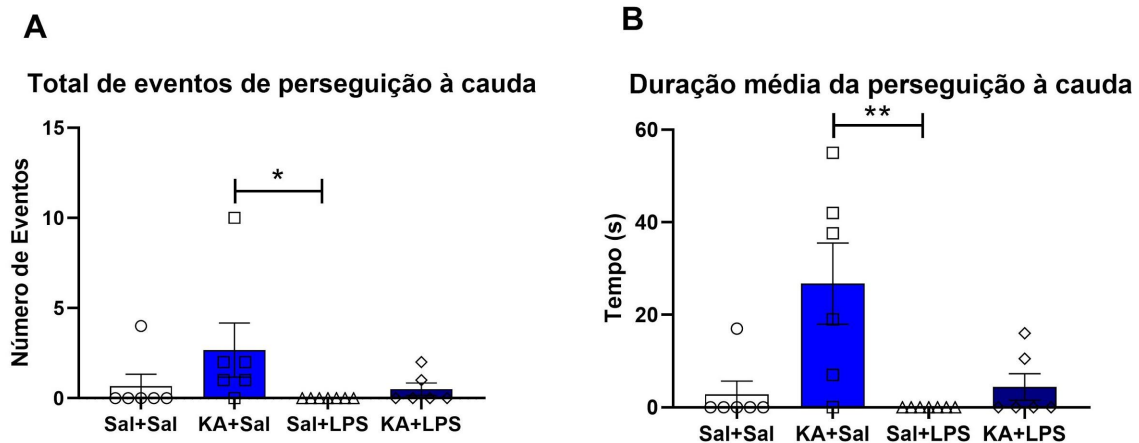


Figura 8. Total de eventos do comportamento atípico de perseguição à cauda (A) e duração média dos eventos (B) em segundos. Valores representam a média \pm SEM. Sal+Sal n = 6; KA+Sal n = 6; Sal+LPS n = 7; KA+LPS n = 6. * p < 0,05; ** p < 0,005. Teste de Kruskal-Wallis com teste de comparações múltiplas de Dunn.

O grupo com maior prevalência deste comportamento foi o KA+Sal, em que cinco animais o realizaram e um deles o fez mais de dez vezes. O tempo médio de perseguição à cauda também foi elevado, próximo ou acima de 40 s para três animais.

Em comparação, apenas dois animais do grupo KA+LPS demonstraram esse comportamento atípico, um do grupo Sal+Sal e nenhum do Sal+LPS. A duração destes eventos também foi reduzida, ficando abaixo de 20 s para os animais destes grupos. Portanto, a administração de ácido caínico parece propiciar a ocorrência deste comportamento em conjunto às SRS, enquanto o LPS aparenta reduzir sua frequência e duração. Este e outros comportamentos motores atípicos podem advir de uma lesão estriatal ocasionada pela injeção de ácido caínico, porém não realizamos marcações no estriado neste trabalho.

Eventos de sobressalto atípicos também foram registrados e contabilizados. Estes eventos foram caracterizados por movimentos bruscos de membros ou de cabeça, sobressaltos e outros movimentos súbitos incompatíveis com outros animais registrados no mesmo instante — diferentes, por exemplo, de sobressaltos ocasionados por ruídos altos no ambiente. O número total destes eventos e sua duração média estão expostos na Figura 9.

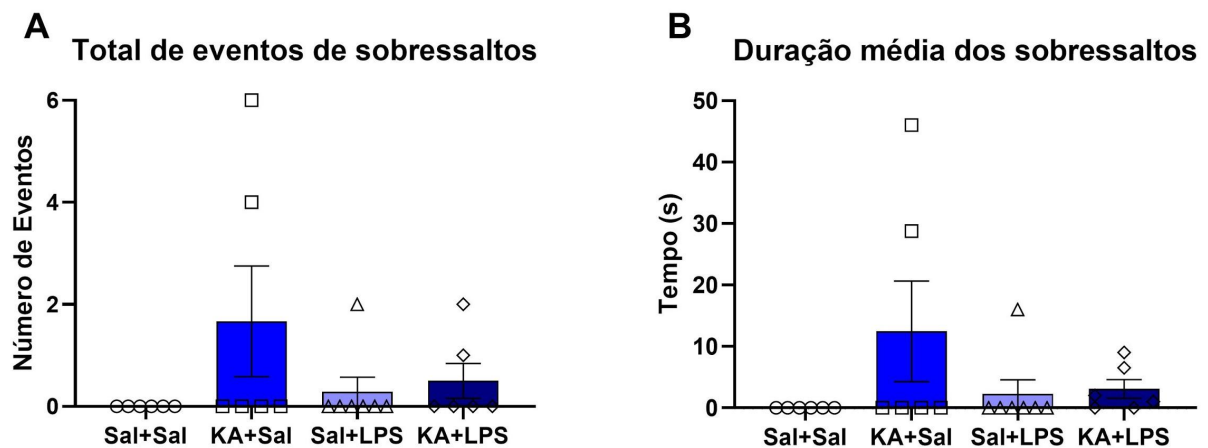


Figura 9. Total de eventos do comportamento atípico de sobressalto (A) e duração média dos eventos (B) em segundos. Valores representam a média \pm SEM. Sal+Sal n = 6; KA+Sal n = 6; Sal+LPS n = 7; KA+LPS n = 6. Teste de Kruskal-Wallis com teste de comparações múltiplas de Dunn.

Novamente, os animais do grupo KA+Sal apresentaram o maior número total de eventos (6 e 4), enquanto um animal do grupo Sal+LPS apresentou 2 eventos e dois animais do grupo KA+LPS apresentaram 2 e 1 ocorrências, respectivamente. Portanto, esse comportamento também aparenta ser desencadeado pelo ácido caínico, apesar de mostrar-se menos frequente do que a perseguição à cauda, e também foi reduzido em frequência e duração pelo LPS. Contudo, o baixo número de animais que apresentou este comportamento impede uma análise estatística robusta e a demonstração de uma diferença significativa entre os grupos nos parâmetros analisados.

A Figura 10 apresenta os dias de início destes comportamentos nos animais dos quatro grupos experimentais, e as figuras 11 e 12 mostram, respectivamente, o

número de animais que apresentaram os comportamentos de perseguição à cauda e de sobressalto a cada dia de registro.

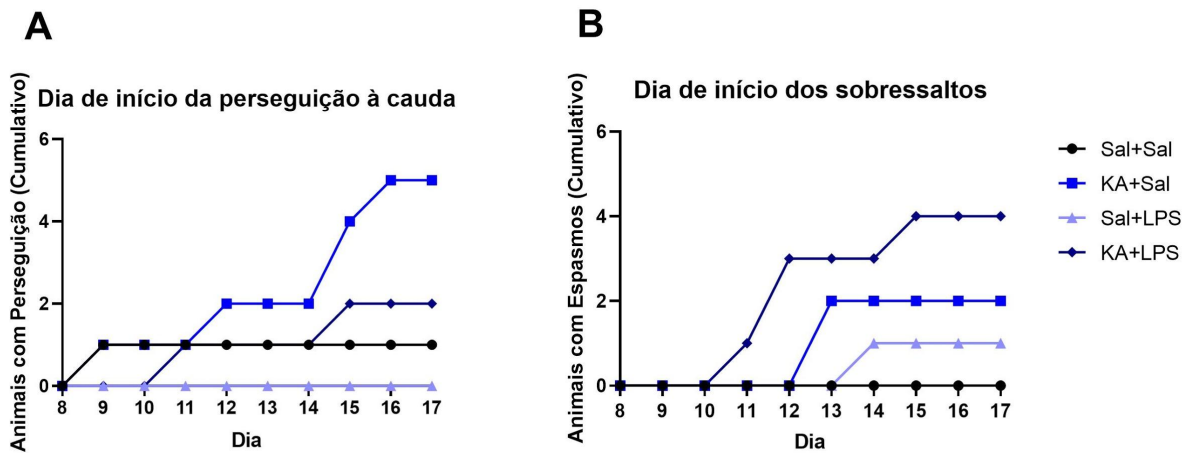


Figura 10. Dia de início de comportamentos atípicos de perseguição à cauda (A) e sobressaltos (B) após a primeira injeção intra-hipocampal. Linhas representam o número cumulativo de animais que apresentaram crise até o dia correspondente. Sal+Sal n = 6; KA+Sal n = 6; Sal+LPS n = 7; KA+LPS n = 6.

Em geral, os eventos de perseguição à cauda iniciaram cedo nos registros, entre o 9º e 10º dia, enquanto os de sobressaltos tiveram início entre o 10º e o 13º. O único animal Sal+Sal a apresentar um comportamento atípico realizou a perseguição à cauda, mas não teve sobressaltos, sugerindo que o primeiro comportamento está relacionado à lesão causada pela própria cânula ou pela injeção, enquanto o segundo deve-se a um estresse inflamatório mais intenso.

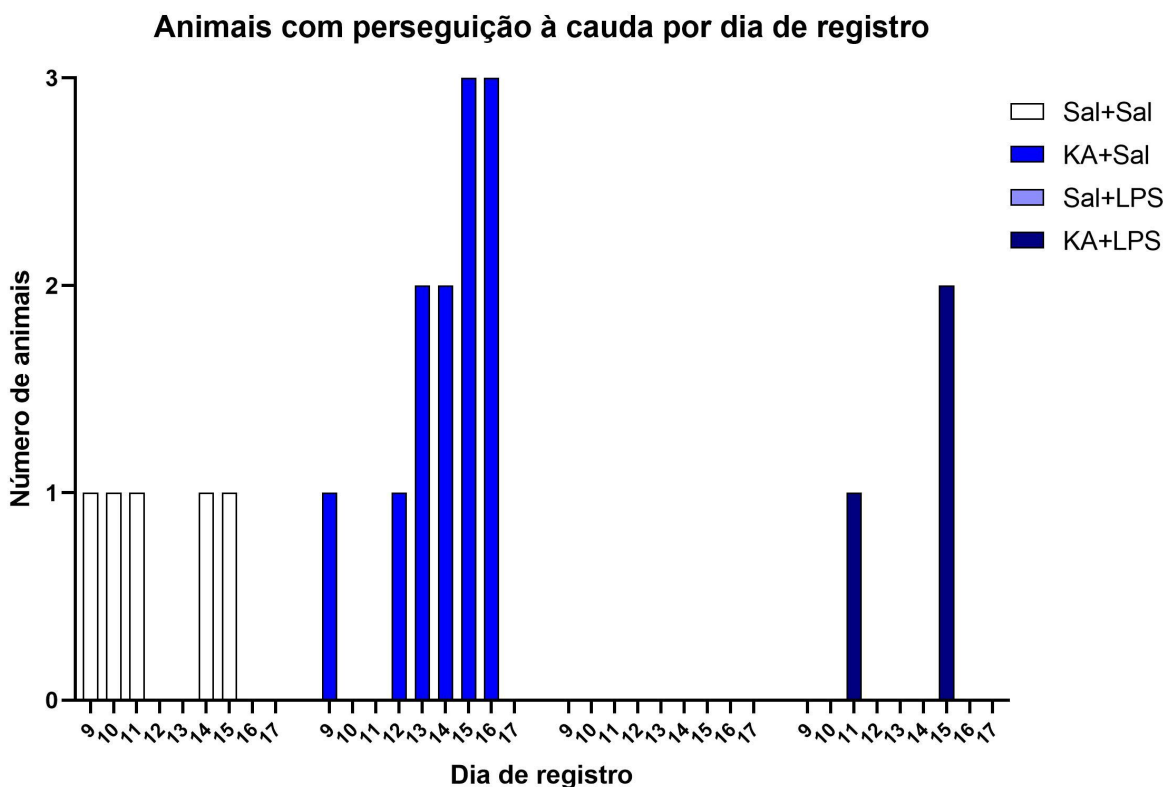


Figura 11. Número de animais com eventos de perseguição à própria cauda a cada dia de registro em vídeo. Os registros se iniciam no 9º dia após a injeção de ácido caínico (KA) e encerram no 17º dia. Sal+Sal n = 6; KA+Sal n = 6; Sal+LPS n = 7; KA+LPS n = 6.

Os animais dos grupos KA apresentaram mais eventos de ambos os comportamentos. Quase todos os animais do grupo KA+Sal apresentaram perseguição à própria cauda (5 animais, ou 83 %), enquanto apenas 2 (33 %) do grupo KA+LPS o fizeram. Já os sobressaltos atípicos tiveram essa relação invertida, com 2 (33 %) dos animais do grupo KA+Sal apresentando este comportamento, enquanto 4 (66 %) do grupo KA+LPS os teve.

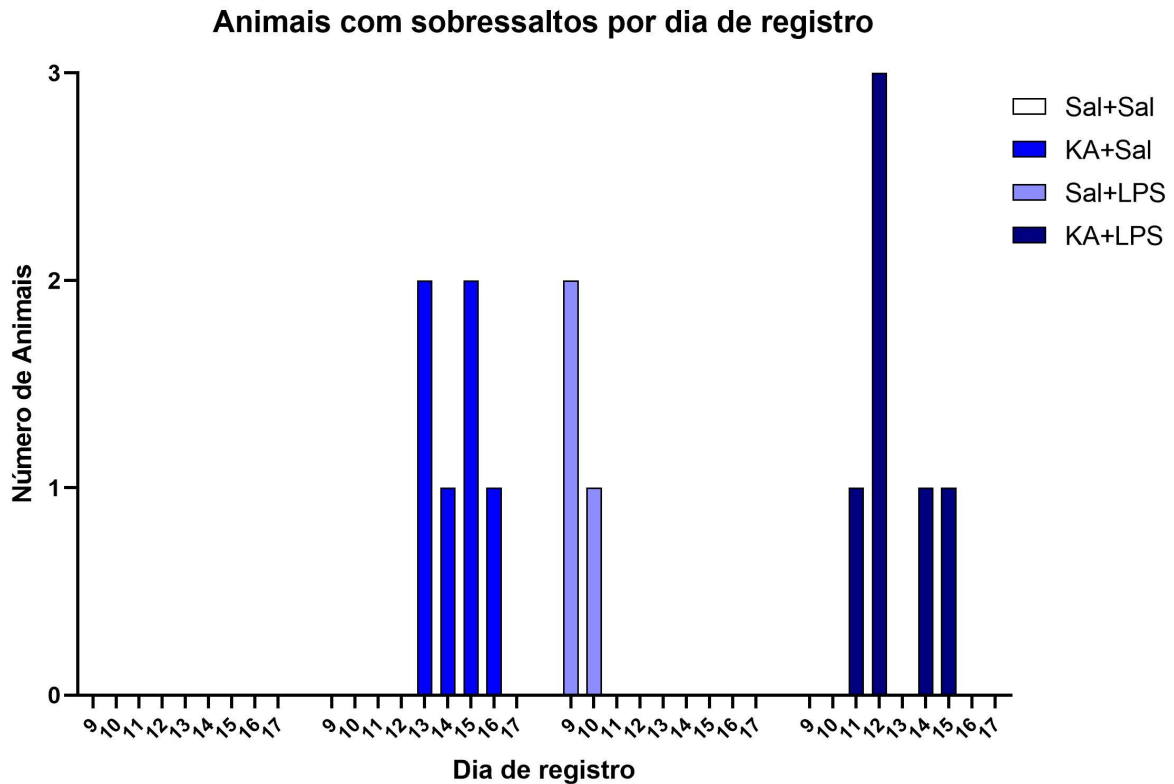


Figura 12. Número de animais com eventos de sobressalto a cada dia de registro em vídeo. Os registros se iniciam no 9º dia após a injeção de ácido caínico (KA) e encerram no 17º dia. Sal+Sal n = 6; KA+Sal n = 6; Sal+LPS n = 7; KA+LPS n = 6.

Finalmente, vale notar que um animal do grupo KA+Sal apresentou um comportamento atípico que não foi verificado em outros: este animal retirava constantemente a serragem de sua gaiola ao ponto de esvaziá-la ao longo do dia. Nota-se que as condições de alojamento e alimentação eram idênticas às dos outros animais experimentais, então consideramos que a origem do comportamento foi sua interação com o tratamento recebido. Esse comportamento aparentemente compulsivo foi a motivação para a inclusão de um dos testes comportamentais: o teste de enterrar esferas.

Testes Comportamentais

Teste de Preferência por Sacarose

Neste teste, os animais foram expostos a garrafas contendo água e sacarose, e foi realizada a medida do seu consumo por meio de pesagem das garrafas. Aqui, o grupo KA+LPS apresenta um número maior de animais experimentais, que receberam o mesmo tratamento farmacológico, porém, por dificuldade logística na inclusão destes animais nos registros em vídeos e outros experimentos, não estão contabilizados nos outros testes.

Primeiramente avaliamos o consumo de água dos quatro grupos experimentais. Estes resultados estão demonstrados na Figura 13.

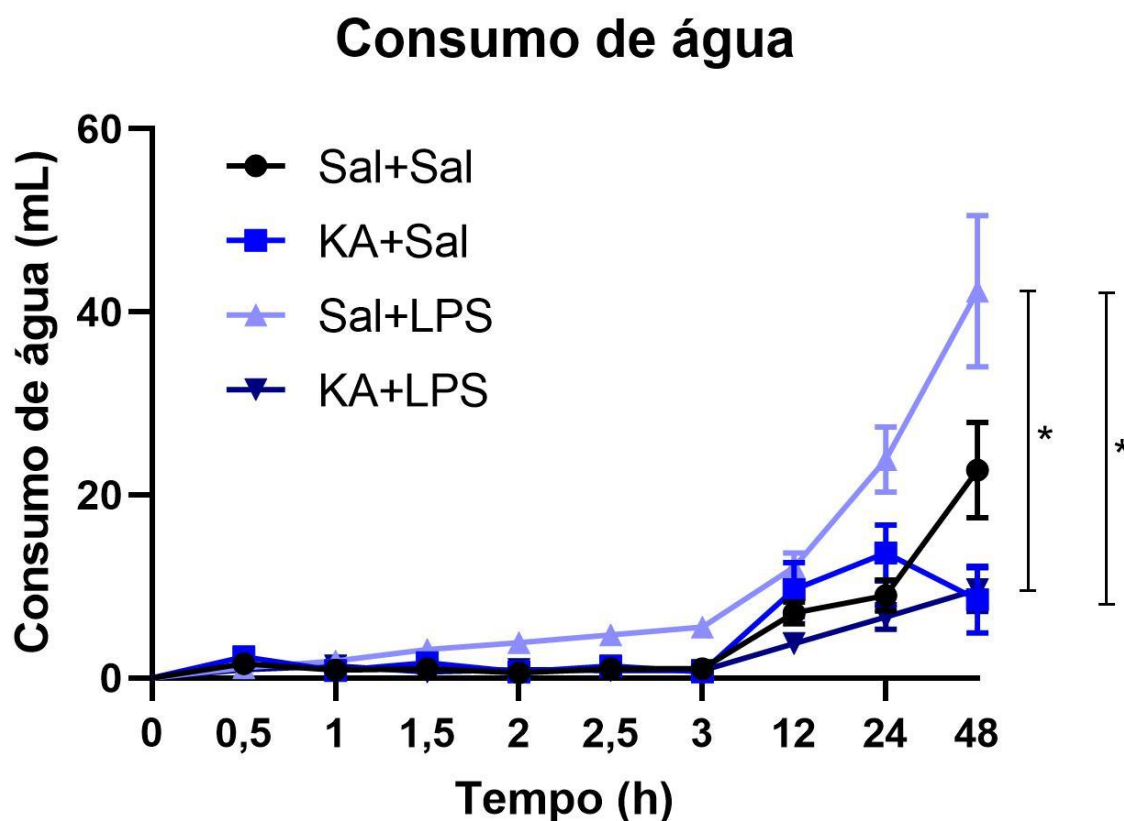


Figura 13. Consumo cumulativo de água (em mL) ao longo do teste de preferência por sacarose em ratos Wistar administrados com salina (Sal) ou ácido caínico (KA), e, posteriormente, Sal ou LPS. Valores representam a média \pm SEM. Sal+Sal n = 6; KA+Sal n = 6; Sal+LPS n = 7; KA+LPS n = 16.

O grupo Sal+LPS apresentou um consumo de água significativamente maior em relação aos dois grupos KA, mas não em relação ao Sal+Sal. O grupo Sal+Sal também não apresentou diferença em relação aos grupos KA, portanto não houve uma menor diminuição de líquidos nestes grupos. Este consumo maior de água por parte do grupo Sal+LPS pode ser a contraparte da menor ingestão de sacarose no teste de preferência, como será mostrado a seguir na Figura 14.

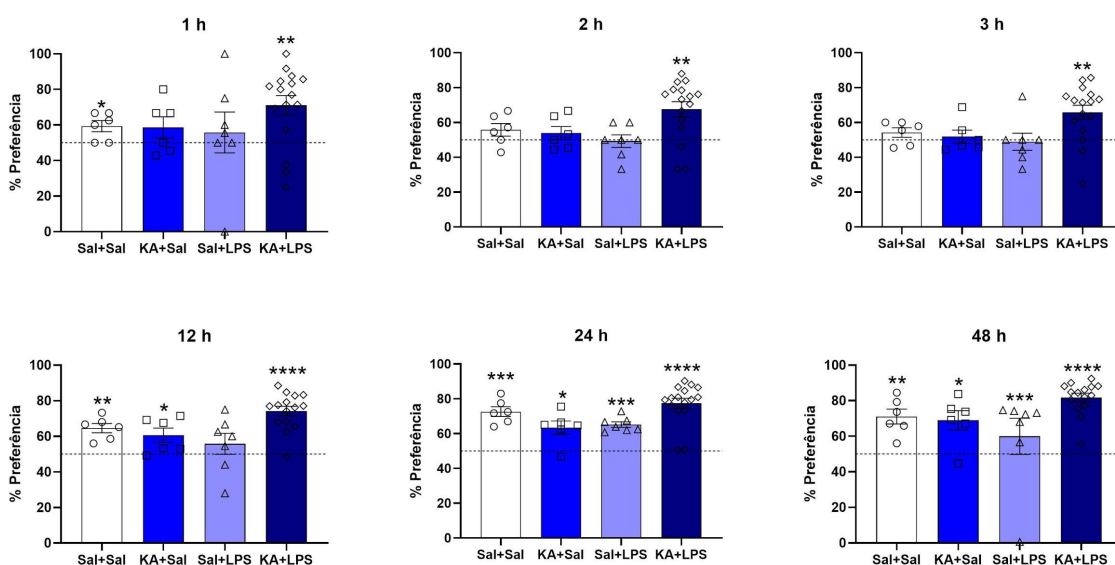


Figura 14. Teste de Preferência por Sacarose. Janelas de 1 h, 2 h, 3 h, 12 h, 24 h e 48 h após o início do teste. Valores representam a preferência média \pm SEM. A linha central representa 50% de preferência. Sal+Sal n = 6; KA+Sal n = 6; Sal+LPS n = 7; KA+LPS n = 16. * p < 0,05; ** p < 0,005; *** p < 0,0005. Teste T para Uma Amostra com Correção de Bonferroni.

Nas três primeiras horas de teste, a preferência por sacarose é um parâmetro que indica um comportamento favorável à exploração da novidade. Em roedores, a tendência é de aversão à sacarose neste período (DOMJAN & GILLAN, 1975). Também, a maior manipulação das garrafas pelo experimentador durante as pesagens de 30 em 30 minutos pode ser um fator estressante aos animais e inibir o consumo.

Nesse período, somente os animais do grupo Sal+Sal e KA+LPS apresentaram preferência pela sacarose, indicando a preservação do comportamento normal dos

animais em relação à hedonia e a fatores estressantes. Esses dados são condizentes com os resultados do teste de nado forçado, discutido posteriormente. Nas medições de 12, 24 e 48 h, todos os grupos — com exceção dos animais Sal+LPS na janela de 12 h — apresentaram preferência por sacarose. O efeito das SRS e alterações causadas pelo LPS, portanto, não foram suficientes para desencadear a anedonia e inibir a preferência por sacarose. Contudo, podemos supor que o LPS tenha um efeito pró-hedônico, fazendo com que os animais do grupo KA+LPS consumam mais sacarose, assim como os ratos WAR (CASTRO *et al*, 2017).

Portanto, esses resultados sugerem que, no teste de preferência de sacarose, o efeito principal da administração de KA ou de LPS isolados está na aversão à novidade, e, em animais KA tratados com LPS, em que há interação das duas administrações, este efeito não ocorre.

Teste de Enterrar Esferas

No primeiro dos testes comportamentais, os animais foram expostos por 15 min a 15 esferas de vidro dispostas de maneira equidistante em uma caixa contendo serragem como substrato para enterrar as esferas. Neste teste e nos outros realizados a seguir, o grupo Sal+LPS apresenta um animal experimental a menos, que morreu após a realização do teste de preferência por sacarose e, portanto, este grupo estará desfalcado deste teste em diante. O total de esferas enterradas de cada grupo encontra-se na Figura 15 abaixo.

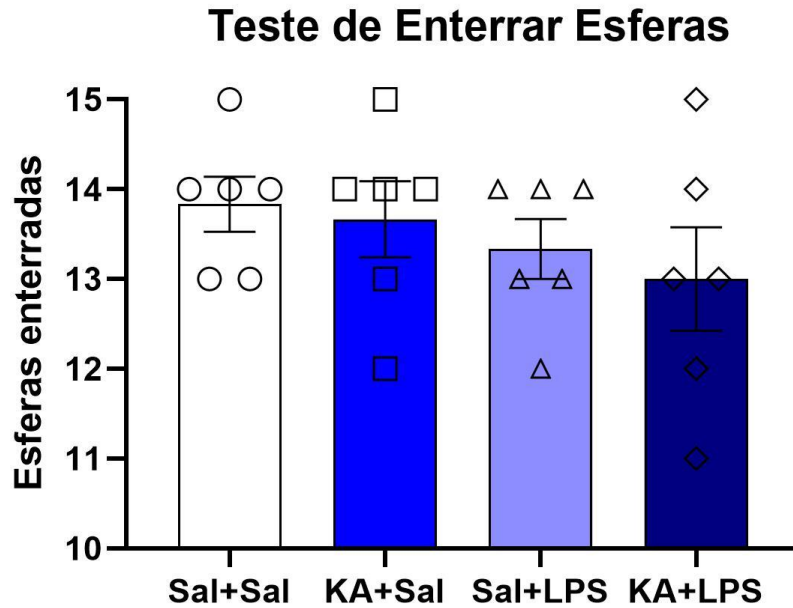


Figura 15. Número total de esferas enterradas no teste de Enterrar Esferas. Valores representam a média \pm SEM. SAL+SAL n = 6; SAL+LPS n=6; KA+SAL n=6; KA+LPS n=6.

Não houve diferença estatisticamente significativa no número de esferas enterradas, cuja média, para todos os grupos, ficou entre 13 e 14 esferas. Contudo, houve uma leve tendência decrescente nos grupos Sal+LPS e KA+LPS em relação aos grupos Sal+Sal e KA+Sal. Caso essa tendência se confirmasse em um número maior de animais, poderia indicar que o LPS reduz a aversão a objetos “perigosos”, como são consideradas as esferas.

Existe uma grande variabilidade de protocolos deste teste, e é possível que o protocolo escolhido para este trabalho seja menos sensível do que o necessário para este tamanho de efeito do tratamento com KA e LPS.

Estudos sugerem duas maneiras de aumentar a sensibilidade do teste de enterrar esferas: a primeira é trocar o substrato para um particulado mais fino e pesado, como areia (DE BROUWER & WOLMARANS, 2018). Dessa forma, a mera movimentação do animal pela caixa não deslocaria partículas suficientes para cobrirem uma esfera e evitaria falso-positivos, ou pelo menos diminuiria sua ocorrência.

A segunda maneira é dispor esferas apenas em metade da caixa e, no início do teste, posicionar o animal na metade livre (NJUNG'E & HANDLEY, 1990; DE BROUWER & WOLMARANS, 2018). De acordo com os estudos que sugerem esse protocolo, essa disposição faz com que os animais tenham a oportunidade de escolher entre enterrar as esferas ou meramente evitá-las, ficando do lado oposto da caixa e, portanto, tornando o comportamento de enterrá-las mais ativo. A combinação desses dois métodos pode ter uma sensibilidade maior e poderia, caso exista um efeito do tratamento realizado neste trabalho sobre o comportamento tipo-compulsivo, evidenciá-lo.

Essas alterações, contudo, requerem uma validação metodológica que não era o escopo deste trabalho, portanto o protocolo experimental não as abrangeu. Considerando os resultados obtidos como válidos, a administração de LPS, KA ou a combinação dos dois não exacerba o comportamento tipo-ansioso de esconder esferas.

Teste de Reconhecimento de Objetos

Os animais realizaram a tarefa de reconhecimento de objeto em três blocos distintos de apresentação. Na primeira, o treino, os dois objetos eram idênticos. Na segunda, um dos objetos foi substituído por outro facilmente discernível. Na terceira, o mesmo objeto anteriormente trocado foi novamente substituído por outro, diferente do primeiro e do segundo.

Neste teste, o grupo Sal+LPS consta com um animal experimental a menos, conforme foi mencionado no teste de enterrar esferas. Além disso, outras diferenças no número de animais de cada grupo devem-se a uma remoção dos *outliers*.

O tempo de exploração de cada objeto foi medido e a preferência pelo objeto novo foi calculada. A avaliação de significância foi realizada em relação à 50% de preferência, que corresponde a nenhum objeto se sobressaindo ao outro.

Os resultados do treino estão expostos na Figura 16. Nenhum dos quatro grupos apresentou diferença significativa em relação ao índice de 50%, indicando que não houve preferência pelos objetos idênticos do treino.

Treino

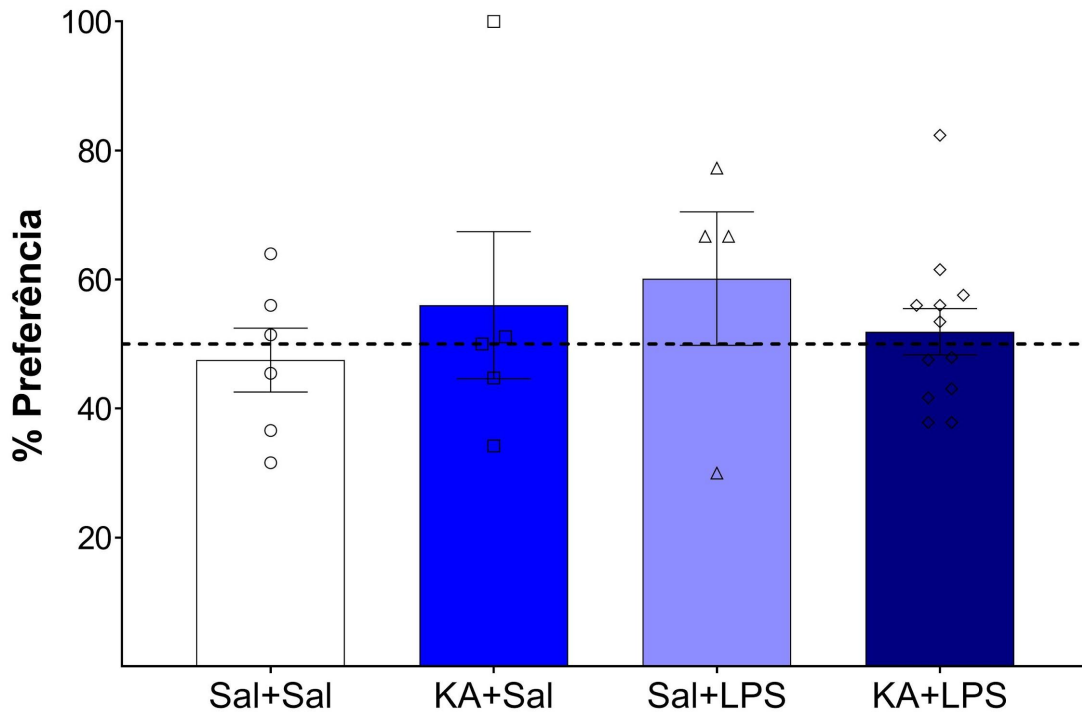


Figura 16. Treino do teste de Reconhecimento de Objetos. Valores representam a preferência média (em porcentagem) \pm SEM. A linha central representa 50% de preferência. Sal+Sal n = 6; KA+Sal n = 5; Sal+LPS n = 4; KA+LPS n = 12. Teste de Wilcoxon para Uma Amostra.

No primeiro teste, realizado 90 min após o treino com o intuito de avaliar a memória de curta duração (Figura 17), nenhum dos quatro grupos apresentou preferência pelo objeto novo. Contudo, isso pode ser devido à grande variabilidade nos resultados, visto que as médias dos grupos SAL+SAL, SAL+LPS e KA+SAL apresentaram uma tendência para a preferência. Seria esperado que os animais Sal+Sal, com a memória intacta, apresentassem preferência, então aumentar o número de animais experimentais poderia resolver este problema.

Porém, é notável que os animais do grupo KA+LPS apresentaram uma distribuição bimodal: um subgrupo (5 animais) com preferência pelo objeto novo, enquanto outro subgrupo (6 animais) com preferência pelo objeto velho, aproximando-se de 70% de preferência no caso de 3 dos animais. Isto poderia indicar uma aversão à novidade, mas o teste de preferência por sacarose demonstrou que estes animais não

apresentam esta aversão. Isso nos leva a crer que houve um problema na seleção de objetos utilizados.

Memória de curta duração (1h30)

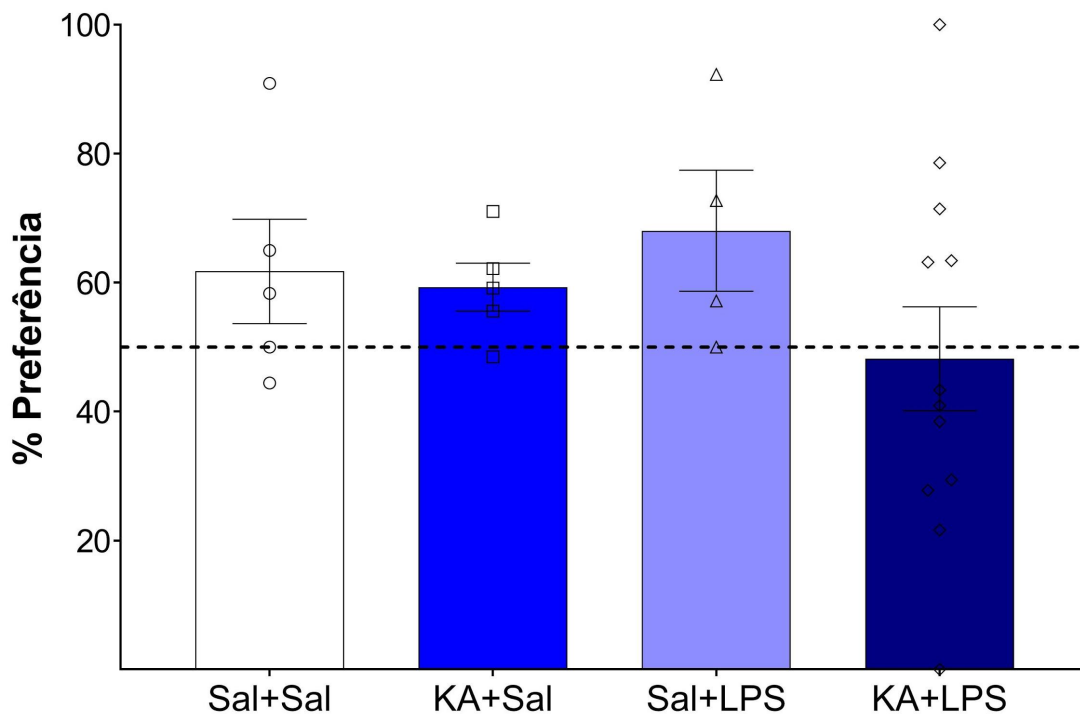


Figura 17. Memória de curta duração (90 min) no teste de Reconhecimento de Objetos. Valores representam a preferência média (em porcentagem) \pm SEM. Linha central representa 50% de preferência. Sal+Sal n = 6; KA+Sal n = 5; Sal+LPS n = 4; KA+LPS n = 12. Teste de Wilcoxon para Uma Amostra.

Por fim, o teste de memória de longa duração foi realizado 24 horas após o treino e está representado na Figura 18.

Memória de longa duração (24h)

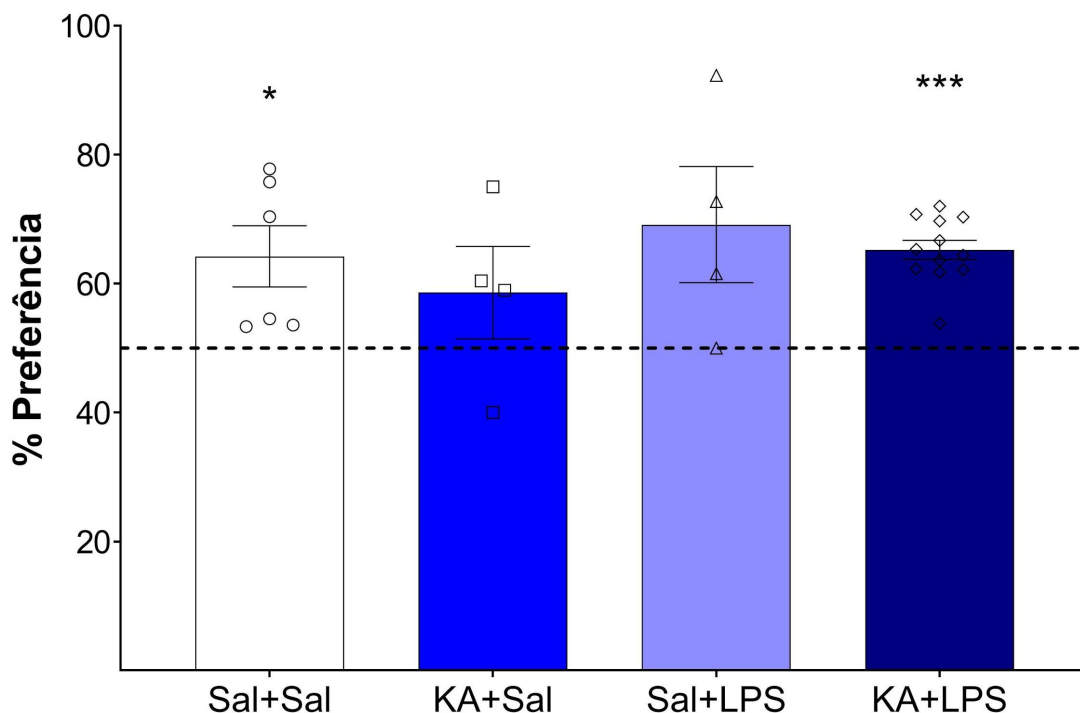


Figura 18. Memória de longa duração (24 h) no teste de Reconhecimento de Objetos. Valores representam a preferência média (em porcentagem) \pm SEM. Linha central representa 50% de preferência. Sal+Sal n = 6; KA+Sal n = 5; Sal+LPS n = 4; KA+LPS n = 12. * $p < 0,05$; *** $p < 0,0005$. Teste de Wilcoxon para Uma Amostra.

Após esse período, os animais dos grupos Sal+Sal e KA+LPS demonstraram uma preferência significativa pelo objeto novo em relação ao já conhecido. Esse resultado demonstra que a memória de longa duração estava funcional nesses animais, preservada em relação aos animais que receberam KA+Sal ou Sal+LPS.

Os animais do grupo Sal+LPS também apresentaram uma tendência à preferência pelo objeto novo, mas a alta variabilidade pode ter mascarado este resultado.

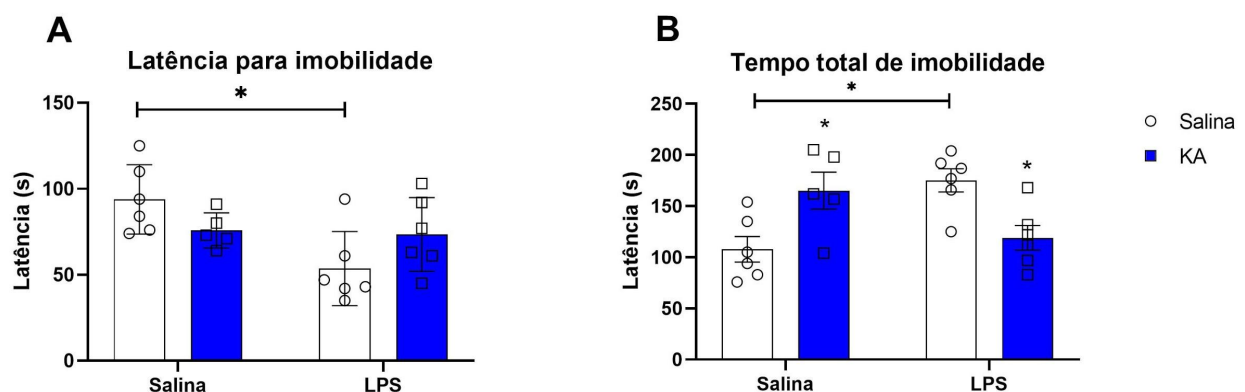
Em geral, os resultados do teste de reconhecimento de objetos apresentaram uma grande variabilidade, e resultados esperados — o grupo SAL+SAL tendo preferência pelo objeto novo no teste de memória de curta duração — não foram encontrados. Essa grande variabilidade pode ser devido a uma escolha de objetos que não favoreceu a diferenciação por parte dos animais ou desestimulava interações. Para elucidar esses dados, seriam necessários mais testes com novos

animais e outros objetos. Contudo, os resultados presentes já demonstram que o pós-condicionamento com LPS preserva a memória de longa duração após injeção de KA.

Teste de Nado Forçado

Como último teste comportamental, os animais foram submetidos ao teste de nado forçado. Após o treino no dia anterior, foram colocados na água por 5 min e registrados em vídeo, que posteriormente foi avaliado por um observador alheio aos grupos experimentais. Os vídeos foram analisados para os seguintes parâmetros: latência para o primeiro episódio de imobilidade, tempo médio de nado, tempo médio de escalada e tempo médio de imobilidade.

Novamente, o grupo Sal+LPS está diminuído pela morte de um animal após o teste de preferência por sacarose, conforme descrito acima. Além disso, diferenças de número de animais entre os grupos se devem a *outliers* que foram removidos.



Os resultados da avaliação da imobilidade estão expostos na Figura 19.

Figura 19. Latência para imobilidade (A) e tempo de imobilidade (B) no teste de Nado Forçado. Os símbolos e cores indicam a primeira administração (círculos e cor branca para salina, quadrados e cor azul para KA), enquanto a legenda sob as colunas indica a segunda administração. Valores representam a latência e tempo médios (em segundos) \pm SEM. Sal+Sal n = 6; KA+Sal n = 5; Sal+LPS n = 6; KA+LPS n = 6. * p < 0,05. One-Way ANOVA com Correção de Bonferroni.

Não houve diferença significativa na latência até o primeiro episódio de imobilidade entre os grupos, com exceção dos grupos Sal+Sal e Sal+LPS. Portanto, o LPS sozinho teve um efeito no comportamento de desamparo. Contudo, ambos os grupos KA demonstraram uma tendência à redução no tempo de latência.

Na análise do tempo total de imobilidade, não só houve diferença entre os grupos Sal+Sal e Sal+LPS como entre Sal+Sal e KA+Sal e também Sal+LPS e KA+LPS. Tanto o KA quanto o LPS isolados aumentaram significativamente o tempo total de imobilidade, porém a administração de LPS em animais que receberam KA foi capaz de retornar esse parâmetro ao nível do controle Sal+Sal.

A seguir, os resultados dos comportamentos de nado (Figura 20) e escalada e mergulho (Figura 21) no FST.

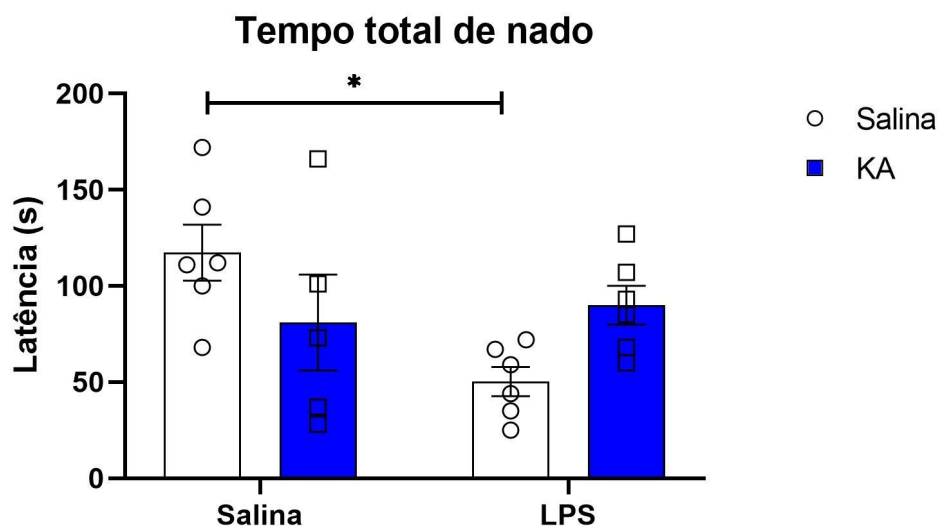


Figura 20. Tempo de comportamento de nado no teste de Nado Forçado. Os símbolos e cores indicam a primeira administração (círculos e cor branca para salina, quadrados e cor azul para KA), enquanto a legenda sob as colunas indica a segunda administração. Valores representam o tempo médio (em segundos) \pm SEM. Sal+Sal n = 6; KA+Sal n = 5; Sal+LPS n = 6; KA+LPS n = 6. * $p < 0,05$. One-Way ANOVA com Correção de Bonferroni.

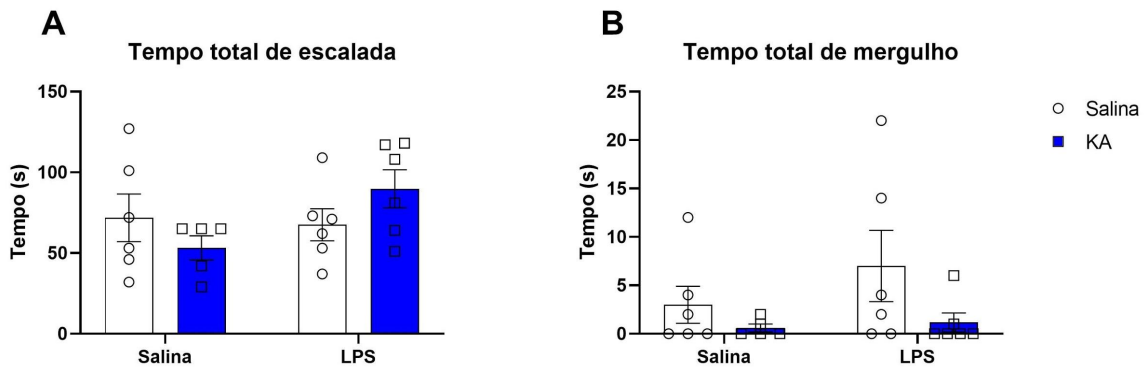


Figura 21. Tempo de comportamentos de escalada (A) e mergulho (B) no teste de Nado Forçado. Os símbolos e cores indicam a primeira administração (círculos e cor branca para salina, quadrados e cor azul para KA), enquanto a legenda sob as colunas indica a segunda administração. Valores representam o tempo médio (em segundos) \pm SEM. Sal+Sal n = 6; KA+Sal n = 5; Sal+LPS n = 6; KA+LPS n = 6. One-Way ANOVA com Correção de Bonferroni.

Quanto aos demais comportamentos avaliados no teste de nado forçado, somente o tempo total de natação dos animais apresentou diferença significativa entre grupos: os animais Sal+LPS apresentaram um total significativamente menor quando comparado ao Sal+Sal, o que condiz com o maior tempo que passaram em imobilidade. Nos outros grupos, a média de tempo de nado foi menor, porém não apresentou diferença significativa.

Para o tempo total de escalada, nenhum grupo apresentou diferença nas comparações, e o mesmo é válido para o tempo total de mergulho. Contudo, neste último parâmetro, dois animais do grupo Sal+LPS tiveram um tempo total bastante elevado, acima de 15 s. Nos outros grupos, o tempo de nado de todos os animais ficaram abaixo desse valor.

Morte Neuronal

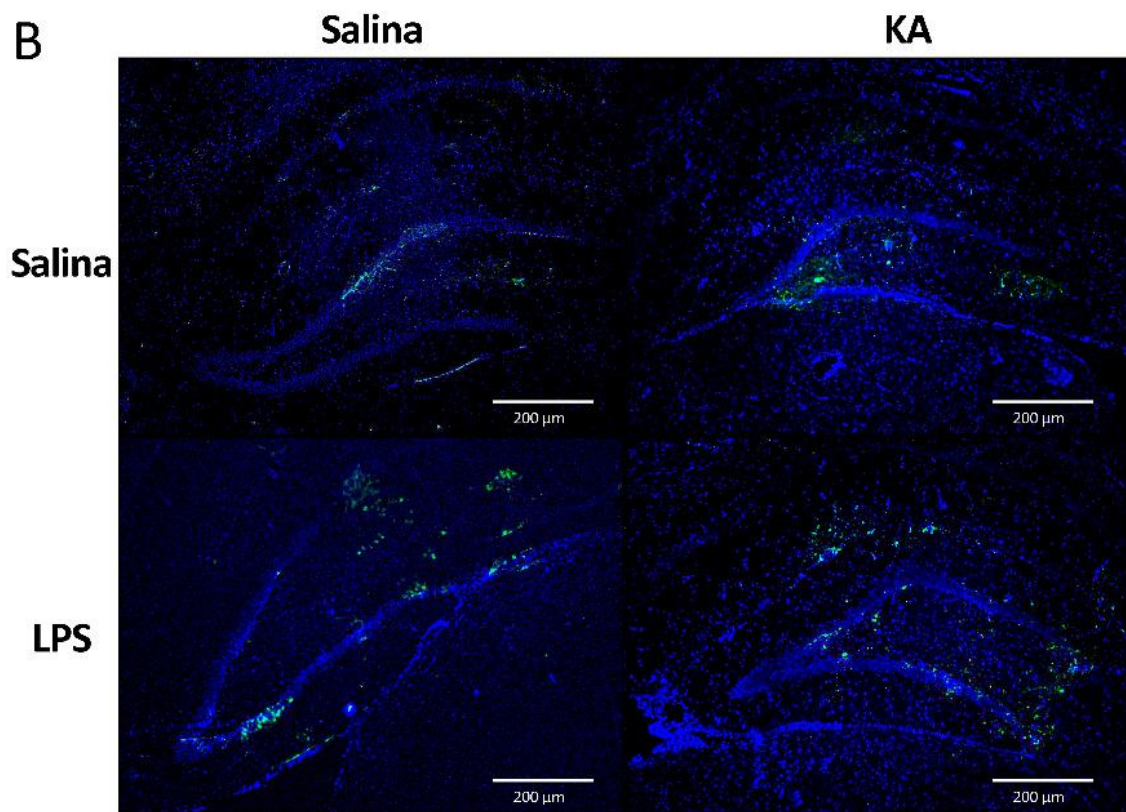
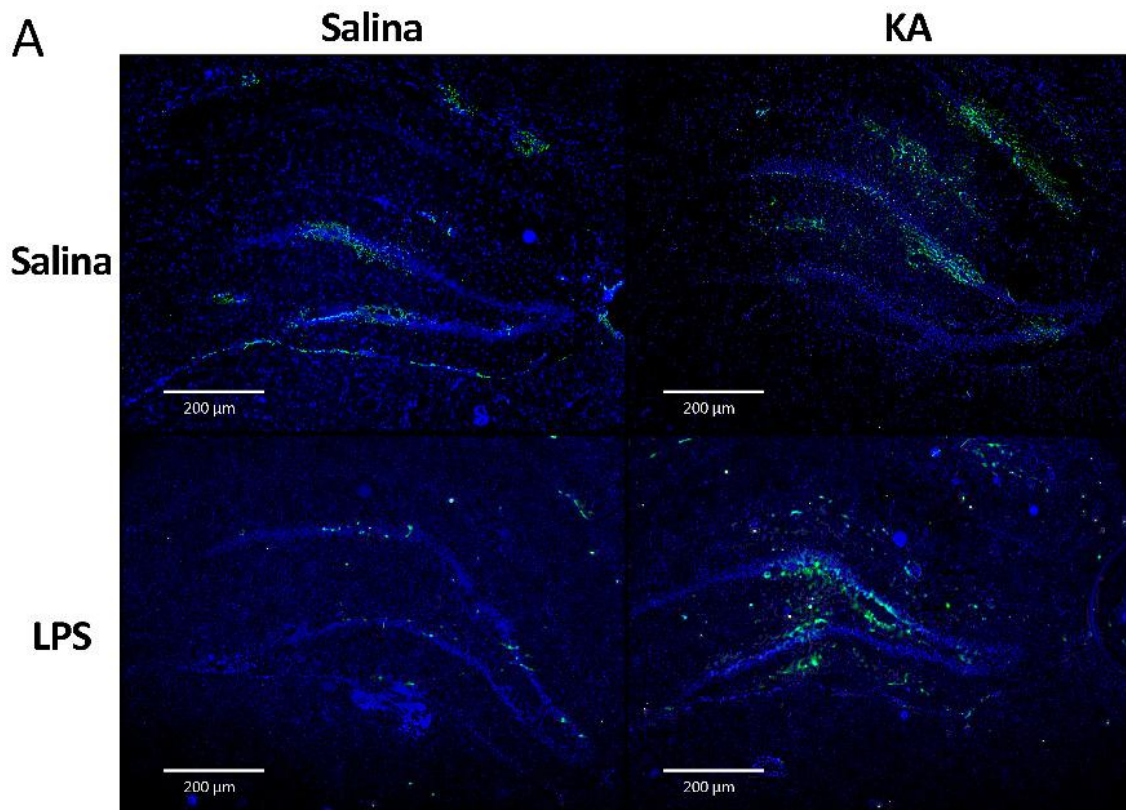


Figura 22. Imagens representativas da marcação por DAPI (núcleos, azul) e Fluoro Jade C (neurônios em degeneração, verde) no hipocampo ipsilateral (A) e contralateral (B) de ratos Wistar dos grupos Sal+Sal (esquerda, acima), KA+Sal (direita, acima), Sal+LPS (esquerda, abaixo) e KA+LPS (direita, abaixo). Aumento da microscopia de 100x.

Após os testes comportamentais, os animais foram submetidos aos procedimentos de perfusão para fixação e marcação para microscopia. Através da marcação por Fluoro Jade C, foram visualizados neurônios em degeneração (Figura 22, acima). Três regiões foram avaliadas: CA1, CA3 e DG por inteiro. Nelas, a densidade celular (células/mm²) foi determinada e comparada entre grupos e entre hemisférios. Diferenças entre os números de animais experimentais entre grupos e hemisférios se devem a *outliers* removidos e disponibilidade de fatias adequadas para realizar as marcações.

Os resultados da marcação por FJC em CA1, CA3 e DG estão expostos, respectivamente, nas figuras 23, 24 e 25, apresentadas a seguir.

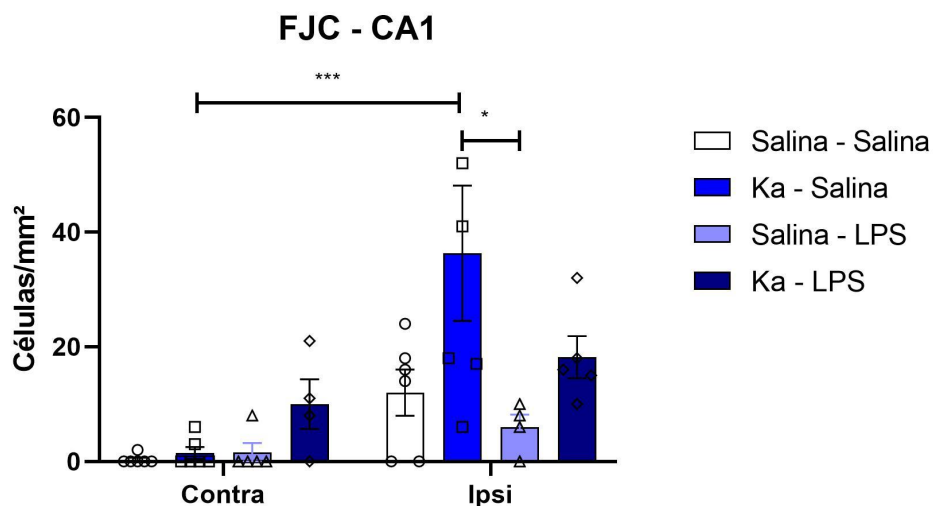


Figura 23. Células marcadas por Fluoro Jade C por mm² em CA1 do hipocampo ventral. Valores representam a densidade média (em células/mm²) \pm SEM. CA1 Ipsilateral: Sal+Sal n = 6; KA+Sal n = 6; Sal+LPS n = 4; KA+LPS n = 5. CA1 Contralateral: Sal+Sal n = 6; KA+Sal n = 6; Sal+LPS n = 5; KA+LPS n = 4. * p < 0,05; *** p < 0,0005. Two-Way ANOVA com Correção de Bonferroni.

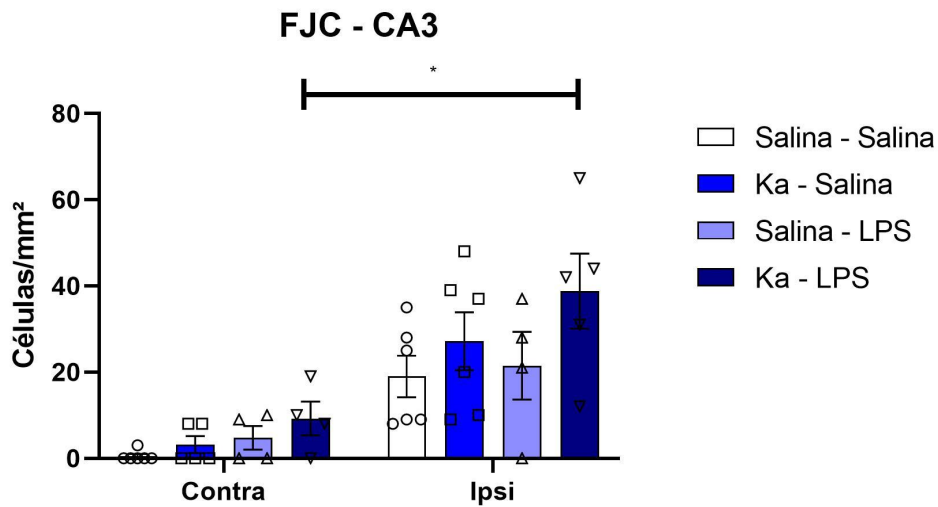


Figura 24. Células marcadas por Fluoro Jade C por mm² em CA3 do hipocampo ventral. Valores representam a densidade média (em células/mm²) \pm SEM. CA3 Ipsilateral: Sal+Sal n = 6; KA+Sal n = 6; Sal+LPS n = 4; KA+LPS n = 4. CA3 Contralateral: Sal+Sal n = 6; KA+Sal n = 5; Sal+LPS n = 4; KA+LPS n = 5. * $p < 0,05$. Two-Way ANOVA com Correção de Bonferroni.

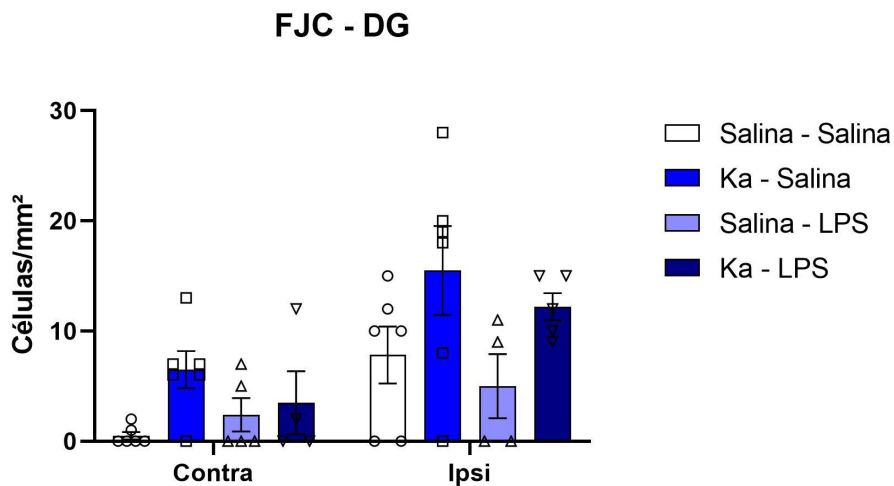


Figura 25. Células marcadas por Fluoro Jade C por mm² em DG do hipocampo ventral. Valores representam a densidade média (em células/mm²) \pm SEM. DG Ipsilateral: Sal+Sal n = 6; KA+Sal n = 6; Sal+LPS n = 4; KA+LPS n = 5. DG Contralateral: Sal+Sal n = 6; KA+Sal n = 6; Sal+LPS n = 5; KA+LPS n = 4. Two-Way ANOVA com Correção de Bonferroni.

Houve diferença significativa na densidade de células marcadas entre CA1 ipsilateral e contralateral dos animais do grupo KA+Sal, demonstrando que o efeito neurodegenerativo da injeção unilateral de KA se restringe ao lado da aplicação. O hemisfério ipsilateral à injeção apresentou uma densidade de neurônios em degeneração significativamente maior do que o do grupo Sal+LPS. E, enquanto em CA3 não houve diferença estatisticamente significativa entre os hemisférios do grupo KA+Sal ($p = 0,06$), uma clara tendência de morte neuronal se fez presente no hemisfério ipsilateral à lesão. Portanto, o ácido caínico mostrou-se como um causador de morte neuronal em CA1 ipsilateral à injeção.

Em CA3, a única diferença estatisticamente significativa foi entre os hemisférios ipsilateral e contralateral do grupo KA+LPS. Nesta região, o hemisfério ipsilateral apresentou uma maior densidade de neurônios marcados por FJC em relação ao contralateral. Em CA3, portanto, o LPS não foi capaz de proteger o hipocampo dos danos causados pelo KA. Contudo, em CA1 não houve esse aumento de densidade, e o LPS pode ter tido um papel protetor.

Na análise do DG, não houve aumento significativo da morte neuronal entre qualquer um dos grupos ou entre hemisférios. Este resultado é condizente com a literatura científica, uma vez que o DG é, dentre as três regiões analisadas, a que menos apresenta alterações nos modelos animais de epilepsia (NIRWAN *et al*, 2018). Mesmo assim, essa região seguiu a tendência dos outros grupos de maior densidade de células marcadas no hemisfério ipsilateral à injeção. É possível que, aumentando o número de animais experimentais, mais grupos apresentassem um aumento significativo na densidade ipsilateral de neurônios em degeneração em relação à contralateral.

Microglia

A marcação da microglia por imunofluorescência foi realizada com anticorpos anti-Iba-1. Os hipocampus foram avaliados por meio de microscopia de fluorescência e a densidade de células marcadas foi analisada. Diferenças entre os números de animais experimentais entre grupos e hemisférios se devem a *outliers* removidos e disponibilidade de fatias adequadas para realizar as marcações.

Figuras representativas são apresentadas a seguir na Figura 26 e os resultados estão expressos na Figura 27.

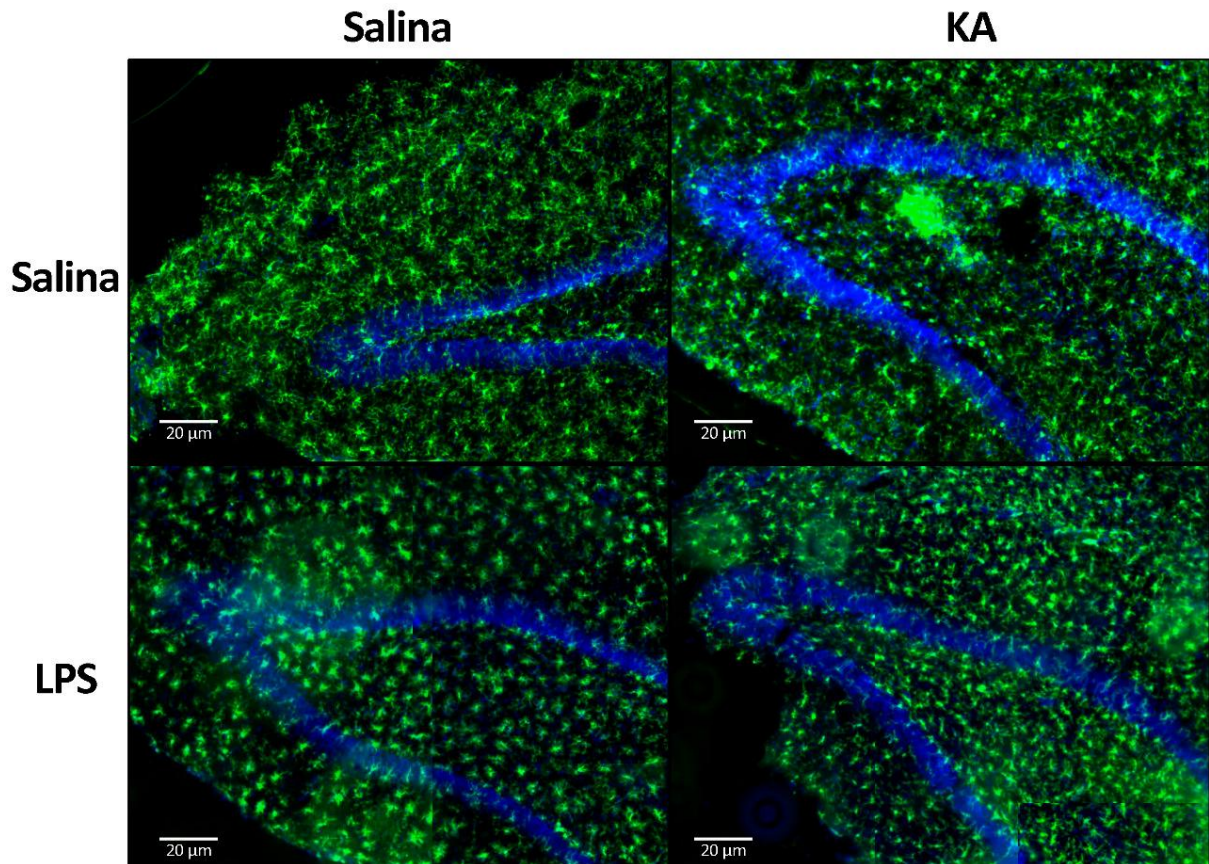


Figura 26. Imagens representativas da marcação por DAPI (núcleos, azul) e Iba-1 (microglia, verde) no hipocampo de ratos Wistar dos grupos Sal+Sal (esquerda, acima), KA+Sal (direita, acima), Sal+LPS (esquerda, abaixo) e KA+LPS (direita, abaixo). Aumento da microscopia de 100x.

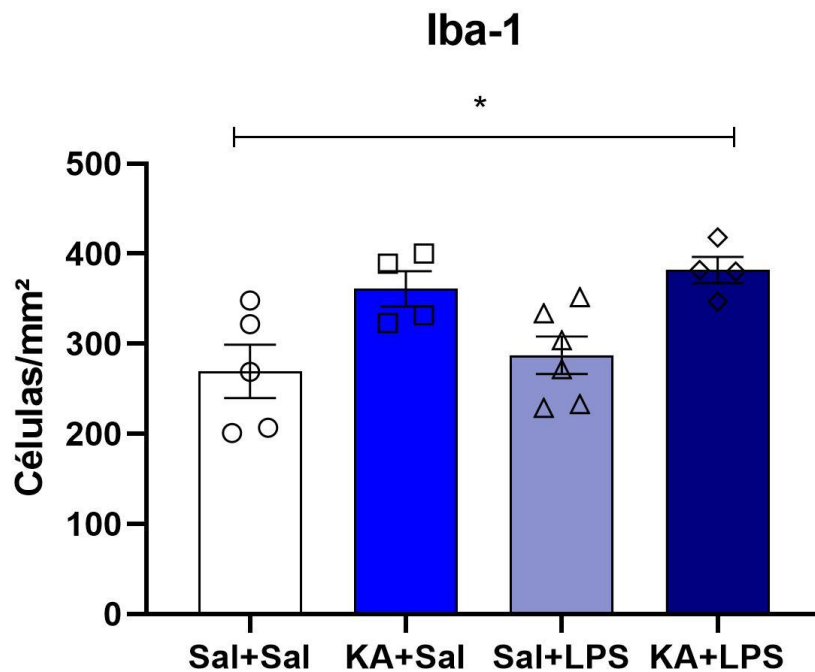


Figura 27. Células marcadas por Iba-1 por mm² no hipocampo ventral. Valores representam a densidade média (em células/mm²) \pm SEM. Sal+Sal n = 5; KA+Sal n = 4; Sal+LPS n = 6; KA+LPS n = 4. * p < 0,05. Two-Way ANOVA com Correção de Bonferroni.

Não houve diferença significativa na densidade de células marcadas entre os grupos Sal, nem entre estes e o grupo KA+Sal. Contudo, o grupo KA+LPS apresentou um aumento significativo quando comparado ao Sal+Sal. Essa tendência a aumento também está presente no KA+Sal, e é possível que um número amostral maior elucidasse essa diferença também para este grupo experimental.

Como não houve diferença significativa entre os grupos KA+Sal e KA+LPS, não é possível afirmar que o LPS provoque um aumento de fagócitos no hipocampo. O efeito observado, portanto, é o aumento do infiltrado fagocitário e de micróglia causado pelo ácido caínico.

Considerando que os animais do grupo KA+LPS apresentam um maior infiltrado leucocitário no tecido hipocampal, a combinação de ácido caínico com LPS pode exacerbar a resposta inflamatória celular, promovendo a multiplicação e ativação da microglia e maior infiltrado celular. As implicações desta hipótese serão discutidas adiante.

Astrócitos

Por fim, os astrócitos foram marcados por anticorpos anti-GFAP e sua densidade no hipocampo foi contabilizada. Diferenças entre os números de animais experimentais entre grupos e hemisférios se devem a *outliers* removidos e disponibilidade de fatias adequadas para realizar as marcações. A Figura 28 traz imagens representativas da marcação de GFAP nos quatro grupos experimentais.

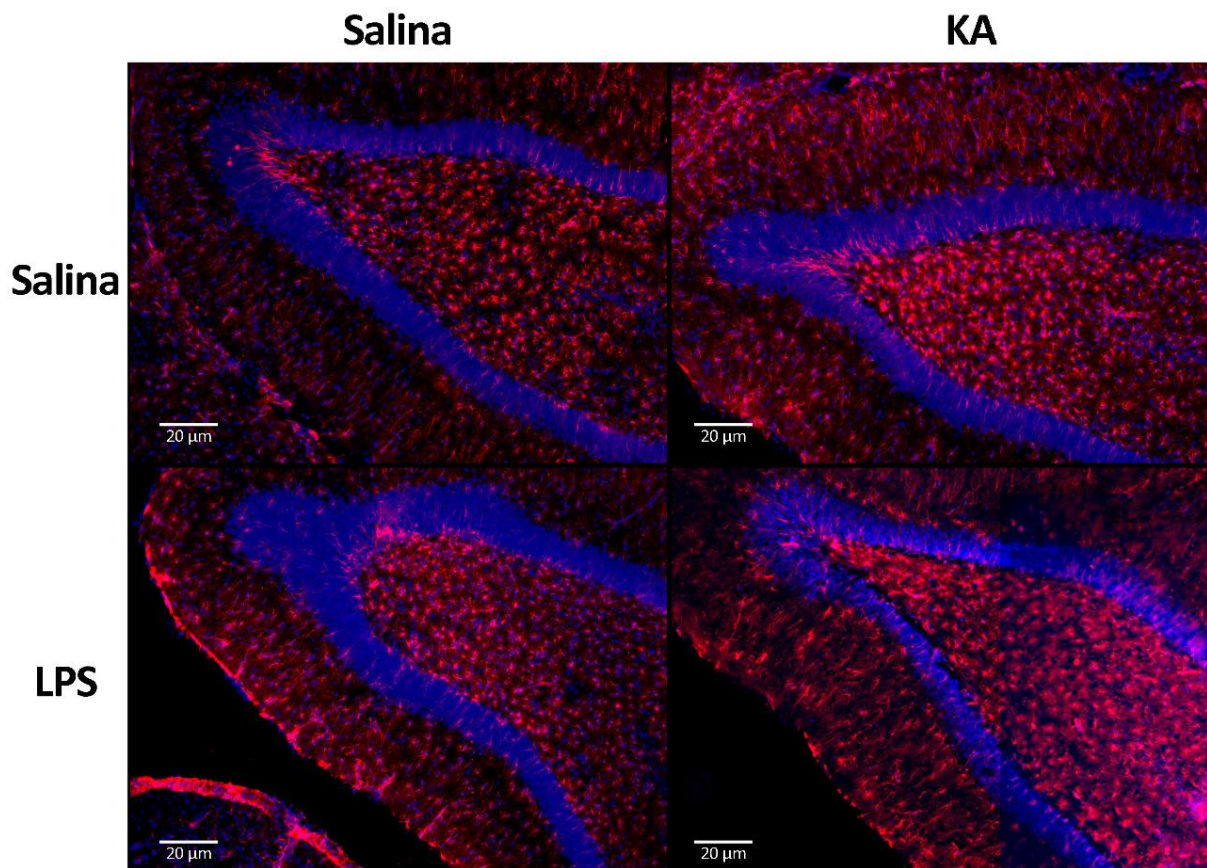


Figura 28. Imagens representativas da marcação por DAPI (núcleos, azul) e GFAP (astrócitos, vermelho) no hipocampo de ratos Wistar dos grupos Sal+Sal (esquerda, acima), KA+Sal (direita, acima), Sal+LPS (esquerda, abaixo) e KA+LPS (direita, abaixo). Aumento da microscopia de 100x.

A Figura 29, a seguir, traz os resultados da análise da marcação por GFAP.

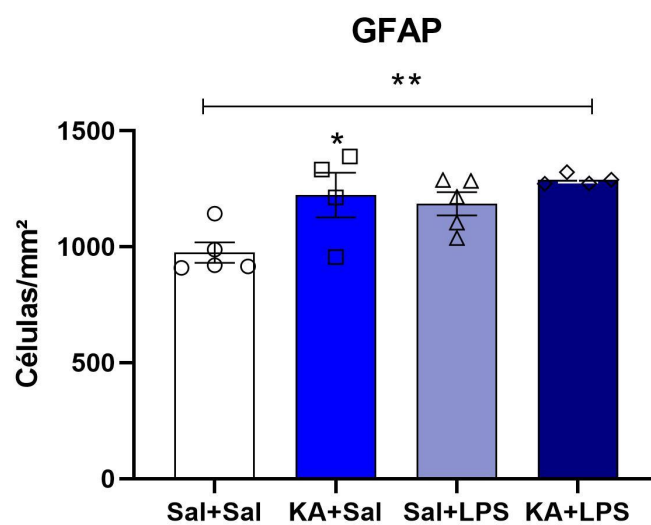


Figura 29. Células marcadas por GFAP por mm² no hipocampo ventral. Valores representam a densidade média (em células/mm²) \pm SEM. Sal+Sal n = 5; KA+Sal n = 5; Sal+LPS n = 5; KA+LPS n = 4. * p < 0,05; ** p < 0,005. Two-Way ANOVA com Correção de Bonferroni.

Ambos os grupos injetados com ácido caínico apresentaram diferença significativa em relação ao grupo Sal+Sal. O KA, portanto, se mostrou um potente ativador da astrogliose, condizente com os resultados da literatura.

O LPS também mostrou uma tendência de aumento do número de astrócitos. Esse aumento, contudo, não se mostrou estatisticamente significativo. É importante frisar que, no 21º dia após a administração de KA — e 18º dia após o LPS —, momento em que os animais foram eutanasiados, os efeitos agudos das injeções não são mais observáveis, o que explica uma ausência de marcação elevada também no grupo Sal+LPS.

Discussão

Limitações do Trabalho

O objetivo deste trabalho foi elucidar as alterações provocadas pelo pós-condicionamento com LPS, tendo em vista a prorrogação do período agudo da inflamação no protocolo realizado. Para isso, realizamos quatro testes comportamentais junto com três marcações histológicas, além da análise das crises espontâneas recorrentes. Essa variedade de análises tornou mais difícil o aprofundamento em cada uma delas, mas condiz com o escopo do trabalho.

Uma das escolhas feitas durante o início do projeto — e para a qual voltamos no seu decorrer — foi a janela de tempo do condicionamento com LPS. Estudos com pré-condicionamento demonstraram que o momento da injeção é relevante para o seu resultado. Por exemplo, a administração de LPS 30 min ou 1 h antes do insulto é de pouco efeito benéfico, enquanto a administração com 24 h de antecedência mostrou resultados promissores (AHMADI *et al*, 2013). Durante a elaboração dos experimentos, nós consideramos a variação de resultados caso escolhêssemos um momento poucas horas após o KA para administrar o LPS, ou com 24 h ou mais. Optamos, portanto, por uma janela temporal de 72 h após o KA para o condicionamento, condizente com o período de declínio do processo inflamatório agudo e, dessa forma, estendendo efetivamente este período inflamatório. Portanto, os resultados deste trabalho são válidos para esta janela experimental escolhida, e certamente estudos que avaliem os efeitos do pós-condicionamento a 1 h, 6 h ou 12 h após o KA encontrariam diferentes resultados.

Outro fator relevante foi o momento em que realizamos a eutanásia. Como um dos fatores mais importantes do estudo são as SRS, seria imprescindível realizar os testes comportamentais e as técnicas de imunofluorescência somente após o período em que as crises fossem registradas. Porém, a janela temporal imediatamente após as injeções — 24 a 72 h após a administração de LPS — também é de grande interesse para elucidar o transcorrer das alterações verificadas neste trabalho. Esta janela temporal antecipada poderia, por exemplo, elucidar como se dá o processo de morte neuronal aguda ou a ativação da microglia e a

infiltração de células imunes periféricas neste protocolo experimental de pós-condicionamento.

A janela de análise mais tardia também limita de certa forma a técnica de Fluoro Jade C. Como esta marcação é específica para neurônios em processo de degeneração, é possível que, no momento da perfusão dos animais — 21 dias após a primeira injeção —, a maior parte da neurodegeneração já tenha ocorrido, e que as maiores diferenças entre os grupos já tenham passado. Este caso é discutido de forma aprofundada mais adiante.

Outros parâmetros que não foram avaliados são o *grooming* (auto limpeza), a locomoção em campo aberto e a expressão de fatores como IL-1 β e TNF α , frequentemente investigados em estudos que tratam de pré-condicionamento com LPS. Sobre estes, podemos inferir baseados nos resultados de trabalhos similares.

Outro fator deixado de lado neste estudo foi a influência do sexo do animal nos resultados do protocolo experimental. Sabe-se que o ciclo estral em ratos fêmeas modifica sua susceptibilidade aos insultos dos modelos animais de crises convulsivas, portanto esta influência no modelo de pós-condicionamento com LPS também é de grande interesse científico. Contudo, este seria um fator de complexidade adicional para o estudo, logo não pôde ser incluído no desenho experimental.

Também, a eletrofisiologia seria de grande valor para avaliar sob uma lente mais refinada a ocorrência, duração e espalhamento das crises recorrentes através de diferentes áreas — por exemplo, para o hipocampo do hemisfério contralateral da lesão, para a amígdala e córtex pré-frontal. Reiteramos que todas essas opções foram consideradas, e as avaliações realizadas no presente trabalho são as que foram consideradas essenciais para obter uma visão geral das alterações neste primeiro estudo do protocolo de pós-condicionamento com LPS.

Nosso desejo com este trabalho é que ele estimule futuras investigações nesta área, revisando e expandindo os resultados com os experimentos mencionados e ainda outros de interesse científico que fugiram do nosso escopo.

Crises Recorrentes na Literatura

O modelo animal de epilepsia de lobo temporal escolhido — injeção intra-hipocampal unilateral de ácido caínico — é robusto na geração de SRS e possui uma extensa literatura (para uma revisão, ver LÉVESQUE & AVOLI, 2013). Para validar as conclusões acerca das crises e comorbidades, primeiramente comparamos os resultados obtidos com a literatura científica.

Aproximadamente 66% dos animais do grupo KA+Sal apresentaram crises recorrentes dentro de duas semanas após a injeção de KA, índice próximo ao encontrado na literatura. Enquanto estudos que avaliaram as crises por períodos mais longos encontram índices maiores de SRS — 86% (RAEDT *et al*, 2009) e 91% (RATTKA *et al*, 2013) após 8 semanas —, avaliações em períodos mais curtos apresentaram índices ainda menores: 60% de ocorrência de SRS após 2 semanas (LADO, 2006) e 58% de ocorrência de SRS após 4 semanas (RATTKA *et al*, 2013). Em outro estudo, 50% dos animais apresentaram SRS após 12 dias, ou 17 dias para crises motoras como as avaliadas no presente trabalho (DREXEL *et al*, 2012). Considerando estes resultados, o protocolo de crises espontâneas recorrentes através da injeção i.h. de ácido caínico foi realizado corretamente e com sucesso.

Este resultado condizente é importante para validar os achados do grupo KA+LPS de alterações nas SRS bem como outras alterações comportamentais. Contudo, a literatura científica carece de dados sobre o que, neste trabalho, chamamos de comportamentos atípicos. Frequentemente, os parâmetros avaliados resumem-se à duração, frequência e intensidade das crises recorrentes, enquanto testes comportamentais analisam a mobilidade e comportamento exploratório e memória por meio de Reconhecimento de Objeto ou Localização de Objeto. Outros parâmetros de interesse, como ciclo de sono, limpeza, agressividade e outros comportamentos atípicos, são investigados com menor frequência.

Isto pode esconder alterações mais sutis do que a lesão hipocampal e déficits de memória. Considerando que nosso modelo foi efetivo em desencadear SRSs, podemos inferir que outros trabalhos que se utilizam do mesmo modelo ignoraram os comportamentos que registramos. Estes comportamentos possivelmente estão

relacionados com a intensidade das SRS e podem ser parâmetros para avaliar na prospecção por novos tratamentos.

Perfil Temporal de Alterações Celulares

Os animais experimentais foram perfundidos aproximadamente no 26º dia após a 1ª injeção. Neste momento, a marcação de neurodegeneração por Fluoro Jade C está diminuída, uma vez que o pico de marcação no hipocampo se dá no período agudo da administração de KA (até 48 h) e, depois, em 2 semanas e, passados dois meses, nenhuma marcação é verificada (HOPKINS *et al*, 2000). Portanto, podemos inferir que, se a eutanásia tivesse sido realizada após 14 dias, haveria mais células marcadas nos grupos com neurodegeneração, o que poderia evidenciar diferenças entre grupos que, na janela de perfusão realizada no presente trabalho, ficaram mascaradas.

Já em relação à astrogliose, o pico se dá em torno de 28 dias após a administração de KA (SHARMA *et al*, 2008). É, portanto, seguro afirmar que os resultados obtidos no trabalho correspondem ao pico de astrogliose pela janela temporal de perfusão se aproximar da ideal. Logo, a ausência de diferença entre os grupos KA+Sal e KA+LPS na astrogliose e seu significativo aumento em relação aos grupos Sal+Sal e Sal+LPS são resultados confiáveis, mas que poderiam ser melhor definidos aumentando o número de animais experimentais.

Mesmo que a astrogliose verificada pela marcação com GFAP seja igual entre os dois grupos KA, seu perfil em fatores não avaliados neste trabalho pode ser diferente. Por exemplo, o perfil de expressão de citocinas pró-inflamatórias ou de fatores de crescimento pode ser diferente, como já discutido acima.

Alterações Comportamentais

Em harmonia com os estudos do pré-condicionamento com LPS, o pós-condicionamento foi capaz de preservar alguns dos parâmetros comportamentais que, em animais tratados com KA, apresentaram-se alterados.

Uma frequente comorbidade na epilepsia é o transtorno depressivo maior, cujas características podem ser parcialmente reproduzidas em modelos animais. Em

roedores, o comportamento tipo-depressivo pode ser avaliado por parâmetros como a anedonia no SPT ou a reduzida latência para imobilidade no FST.

Em modelos animais de epilepsia — pilocarpina sistêmica e ácido caínico intra-hipocampal — existe uma redução no consumo de sacarose, mesmo que não haja uma menor preferência (KLEIN *et al*, 2014). Nos nossos experimentos, os animais KA+Sal de fato não apresentaram preferência pela sacarose, porém apenas nas três primeiras horas de teste. Neste mesmo período, os animais KA+LPS demonstraram uma preferência pela solução de sacarose a 1% desde a primeira medição, além de maior consumo de sacarose nas janelas de tempo em que os animais Sal+Sal não tiveram preferência. Logo, o pós-condicionamento com LPS reduziu a aversão à novidade, efeito não observado no grupo Sal+LPS.

O comportamento anedônico tem suas bases no circuito envolvendo principalmente a área tegmental ventral (VTA) e núcleo accumbens (HÖFLICH *et al*, 2018). O aumento da atividade na VTA acompanhado de estresse ambiental são apontados como causadores de comportamento tipo-depressivo de anedonia (HESHMATI & RUSSO, 2015). Outras áreas, como o córtex pré-frontal ventromedial, a amígdala basolateral e o hipocampo ventral também têm importantes papéis, com esta última sendo mais relevante para o presente trabalho visto que a injeção de ácido caínico realizada foi intra-hipocampal, limitando os efeitos da droga ao sítio de administração.

O hipocampo ventral tem um papel nos transtornos depressivos por sua projeção direta para neurônios do núcleo accumbens. Uma maior força nessa projeção está relacionada com piora na susceptibilidade a estresse e no comportamento tipo-depressivo (BAGOT *et al*, 2015). Considerando que os grupos KA sofreram neurodegeneração, é razoável inferir que as projeções hipocampo-accumbens estejam prejudicadas. Dessa forma, estes animais mostrariam-se mais resilientes à anedonia, explicando o porquê de ambos os grupos KA demonstrarem preferência por sacarose.

Já no FST, apesar de os animais KA+Sal apresentaram um maior tempo total de imobilidade, a latência para o primeiro evento de imobilidade não foi significativamente distinta desta nos animais Sal+Sal. Isto pode ocorrer por um déficit na memória destes animais, que, devido à maior lesão hipocampal e piora na

memória, são incapazes de reconhecer, baseado no treino prévio, que estão em uma situação inescapável (KLEIN *et al*, 2014). Este resultado é compatível com testes em camundongos que receberam KA (GRÖTICKE *et al*, 2008) ou pilocarpina (GRÖTICKE *et al*, 2007), que também têm uma latência maior para imobilidade tanto no FST quanto no teste de suspensão pela cauda. Este déficit de memória pode ser suficiente para invalidar o uso do FST como avaliador de comportamento tipo-depressivo em modelos animais de epilepsia, por exemplo, em testes farmacológicos que busquem determinar a eficácia de drogas antidepressivas. Contudo, como neste trabalho nós comparamos os grupos KA+Sal com KA+LPS, mesmo este resultado incompleto do KA+Sal é relevante para critério de comparação, já que os animais KA+LPS não diferiram do controle Sal+Sal.

Isto demonstra que o LPS nos animais KA foi capaz de resgatar os parâmetros avaliados no FST aos níveis normais, preservando o circuito responsável pelo aprendizado desta tarefa, além de torná-los menos susceptíveis ao comportamento de desamparo.

Esta hipótese é reforçada pelo resultado obtido com o teste de reconhecimento de objeto: os animais administrados com LPS não sofreram déficit de memória a longo prazo — necessária para o aprendizado da tarefa do FST —, enquanto o grupo KA+Sal teve esta capacidade prejudicada, além de uma morte neuronal mais intensa, conforme verificado pela marcação com Fluoro Jade C. O córtex perirrinal é fortemente implicado em tarefas de reconhecimento visual e diferenciação entre estímulos novos e outros já conhecidos (WARBURTON & BROWN, 2018), enquanto o hipocampo é principalmente relacionado a outro teste de memória em roedores, o teste de localização de objeto (ou *object placement test*). Apesar de lesões hipocâmpais poderem provocar um déficit de memória, este déficit é compensado pelo córtex perirrinal, que permanece funcional após remoção hipocâmpal (BROADBENT *et al*, 2010). Contudo, após injeção de pilocarpina, houve neurodegeneração e aumento de excitabilidade neste córtex (BIAGINI *et al*, 2013), sugerindo que, em modelo animal de ELT, esta região também fica prejudicada, justificando a piora na memória verificada no ORT.

A neurodegeneração no hipocampo, amígdala, hipotálamo e córtex entorrinal são associados ao comportamento tipo-depressivo e anedonia. Enquanto nos modelos

animais de epilepsia em que a administração é sistêmica o dano nessas áreas é justificado, em um modelo focal como o deste trabalho é improvável que uma lesão generalizada ocorra. Portanto, o comportamento hedônico que foi verificado como reduzido neste estudo não só deve ter um forte componente hipocampal, como também pode ser devido a uma modulação do foco epilético sobre as outras áreas envolvidas no comportamento. Uma avaliação eletrofisiológica seria de grande valor para elucidar este caso, aferindo essas estruturas em relação ao hipocampo lesado bem como em relação ao hemisfério que não recebeu o ácido caínico.

Por fim, os comportamentos atípicos aqui verificados são de mais difícil análise, uma vez que são pouco reportados na literatura. A perseguição à cauda, por exemplo, foi registrada em *Ihara Epileptic Rats* (IER) após 3 meses de vida (TSUJI *et al*, 2000). Esse comportamento foi similar ao descrito por Wallace (1976) como *tail-hoarding* (ou acumulação compulsiva), em que os animais perseguem a cauda em círculos e a agarravam com as patas ou boca, posteriormente carregando-a para dentro da gaiola ou ninho. Ainda de acordo com esse trabalho, este comportamento sofreu redução durante a privação de comida, porém apresentou um aumento após o retorno da alimentação *ad libitum*, da mesma forma que acontece com o acúmulo de *pellets* de comida e outros objetos.

A administração de LPS é capaz de reduzir o comportamento de acúmulo de alimento (AUBERT *et al*, 1997) e, considerando o comportamento de perseguição da cauda como similar a este, o nosso resultado de ausência deste comportamento nos animais Sal+LPS é condizente com a literatura.

Enquanto em camundongos, o comportamento de acúmulo compulsivo é prejudicado após lesão hipocampal citotóxica (DEACON *et al* 2002), em ratos essa diferença não ocorre (WALLACE & TIGNER, 1971). Porém, no presente trabalho, o comportamento de perseguição à cauda aumentou nos animais com lesão hipocampal (tratados com KA), principalmente em animais KA+Sal. Logo, a perseguição à cauda aqui verificada não está relacionada com o acúmulo compulsivo, e sim com a lesão e o processo epileptogênico. Portanto, este é mais um comportamento de interesse para estudos comportamentais com administração de KA em ratos.

Crises Recorrentes e Inflamação

A ocorrência de crises espontâneas recorrentes nos modelos animais de epilepsia está intimamente ligada à inflamação hipocampal (VEZZANI *et al*, 2019). Os achados apontam para papéis desempenhados por astrócitos (JAWORSKA-ADAMU *et al*, 2011; LIDDELOW *et al*, 2017), microglia (MIRRIONE *et al*, 2010; BENSON *et al*, 2015; ZHAO *et al*, 2018), leucócitos infiltrantes (VARVEL *et al*, 2016) e dos próprios neurônios (FABENE *et al*, 2008; VAN VLIET *et al*, 2018, ver Figura 30) neste processo.

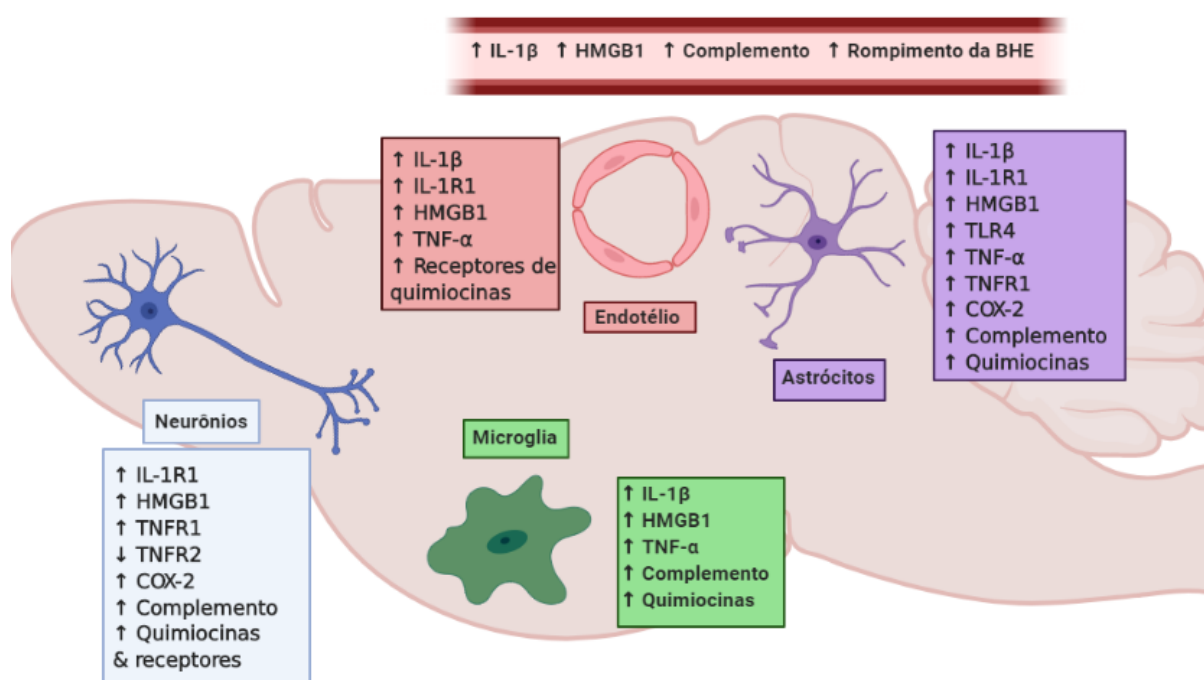


Figura 30. Mediadores inflamatórios envolvidos no processo de epileptogênese. Estas moléculas são liberadas tanto por neurônios quanto por células da glia durante crises epilépticas ou no período latente que se segue. Os fatores liberados envolvem inflamação, crescimento e proliferação, mas também promovem mudanças rápidas de excitabilidade em canais iônicos e receptores. Adaptado de Van Vliet *et al*, 2018.

Por exemplo, a ativação de astrócitos por citocinas liberadas pela atividade epileptiforme de neurônios altera sua capacidade de recaptação de glutamato, aumentando a disponibilidade deste neurotransmissor na fenda sináptica e,

portanto, aumentando a excitabilidade neuronal (DEL ARCO *et al*, 2003; PÁL, 2018). Este fator pode propiciar a ocorrência dos paroxismos e, eventualmente, através dos mecanismos da epileptogênese, levar às SRS. Ao mesmo tempo, em ratos tratados com KA, a cobertura de sinapses por processos astrocitários apresenta-se aumentada (CLARKSON *et al*, 2020), compensando parcialmente a recaptação de glutamato pelo aumento da área de recaptação (KLAFT & DULLA, 2020).

Outro fator importante para a epileptogênese é a reorganização do circuito fisiológico em uma rede neural epileptogênica. Esta reorganização depende da neurodegeneração de certas populações neuronais, como os interneurônios inibitórios, e do posterior brotamento e formação de novas sinapses entre as células piramidais remanescentes (PITKÄNEN *et al*, 2015). A circuitaria resultante é um sistema epileptogênico, com as novas sinapses da camada molecular interna tendo a característica excitatória para a geração das crises recorrentes (SCHARFMAN *et al*, 2003). Portanto, a reorganização do circuito após a lesão é o fator de origem do foco epiléptico nos modelos animais.

Considerando o LPS como um estímulo inflamatório, seria intuitivo pensar em sua administração como absolutamente prejudicial, potencialmente aumentando a lesão em uma patologia como a epilepsia, em que a inflamação possui um papel central. Contudo, os estudos sobre pré-condicionamento com LPS demonstram que a interação com essa molécula é mais complexa e, sob certos protocolos experimentais, conduz a uma resposta protetiva: nos protocolos de pré-condicionamento, a inflamação pode (HOSSEINZADEH *et al*, 2019; AMINI *et al*, 2018; AUVIN *et al*, 2011) ou não (DMOWSKA *et al*, 2010; SAYYAH *et al*, 2003) diminuir a intensidade das crises, sua frequência ou duração, porém alivia outras comorbidades, como a neurogênese aberrante (MATSUDA *et al*, 2015), neurodegeneração (TURNER *et al*, 2017) e déficit de memória (LIN *et al*, 2009).

Estes resultados por vezes conflitantes sugerem que meramente verificar a ocorrência ou ausência de inflamação não é suficiente para prever o resultado do pré (ou pós) condicionamento. O perfil de ativação da glia, de secreção de citocinas e fatores de crescimento ou inibitórios secretados são importantes para a resolução.

Um mecanismo para esta diferenciação de respostas inflamatórias está contido dentro da cascata do TLR4: as vias MyD88-dependente e independente, que culminam em respostas pró-inflamatórias ou pró-resolutivas (AMINI *et al*, 2018; LAROCHELLE *et al*, 2015; FITZGERALD *et al*, 2003). Uma diferenciação entre respostas deletérias e benéficas também foi feita por Liddelow e colaboradores (2017) no estudo de perfis de ativação de astrócitos, que, em culturas celulares, auxiliam ou prejudicam a proliferação celular de acordo com as citocinas e outras moléculas responsáveis por sua ativação. Portanto, o presente estudo e outras investigações sobre os efeitos de pré e pós-condicionamento na epilepsia seriam grandemente beneficiados por uma análise diferencial dos produtos secretados pela glia e seu perfil de ativação.

Conclusão

O presente estudo demonstrou que o pós-condicionamento com LPS 72 h é capaz de preservar certos aspectos neurológicos a despeito da neurodegeneração e inflamação ocasionados pela injeção de KA. Verificamos a ocorrência de crises epiléticas recorrentes tanto em animais controle quanto nos tratados com LPS, porém mais curtas nos animais tratados com LPS. Já nos testes comportamentais e nas marcações por imunofluorescência, os animais tratados com LPS mostraram-se diferentes daqueles que receberam somente o KA, aproximando-se frequentemente do grupo salina.

Isto demonstra que alguns dos benefícios encontrados no pré-condicionamento são também verificados no pós-condicionamento, e possivelmente tem suas raízes no processo inflamatório que inicia com o insulto com ácido caínico, estende-se pelo período latente e permanece mesmo depois da ocorrência das SRS. Nossos resultados apontam para um mecanismo protetor do processo inflamatório desencadeado.

A importância da inflamação no desenvolvimento da epilepsia é amplamente reconhecida na literatura científica, mas suas nuances ainda não foram elucidadas. Usar o próprio processo inflamatório como uma forma de tratamento para evitar o desenvolvimento da patologia ao invés de meramente combatê-lo seria uma grande quebra de paradigma, e o pós-condicionamento está mais próximo de ser factível do que o pré-condicionamento.

Mesmo assim, este trabalho não propõe o pós-condicionamento com LPS como uma terapia para impedir a epileptogênese. Se o conhecimento científico futuramente apontar para esta direção, é provável que o alvo do tratamento seja um ponto específico na intrincada cadeia de reações e interações da resposta imune, não um alvo tão inespecífico e com resultados tão amplos quanto os receptores TLR4 e seus ligantes.

Contudo, o que nossos resultados de fato propõem é que intervir no processo de epileptogênese é possível e promissor como uma maneira de diminuir a severidade da epilepsia ou, eventualmente, impedir completamente seu desenvolvimento ao

intervir em momentos específicos da epileptogênese. Os modelos animais já propiciaram inúmeros avanços na compreensão e tratamento das síndromes epiléticas e novos tratamentos, farmacológicos ou não, pouco a pouco diminuem o número de casos ditos “intratáveis”. Se este trabalho contribuir para que menos pessoas precisem conviver com crises epiléticas, teremos sido muito bem-sucedidos.

Referências

ABBAS, Abdul K.; LICHTMAN, Andrew H.; PILLAI, Shiv. *Imunologia Celular e Molecular*. v. 9, 2019.

AHMADI, Amin; SAYYAH, Mohammad; KHOSHKHOLGH-SIMA, Baharak; *et al.* Intra-hippocampal injection of lipopolysaccharide inhibits kindled seizures and retards kindling rate in adult rats. **Experimental Brain Research**, v. 226, n. 1, p. 107–120, 2013.

AMINI, Elham; GOLPICH, Mojtaba; FARJAM, Abdoreza S; *et al.* Brain Lipopolysaccharide Preconditioning-Induced Gene Reprogramming Mediates a Tolerance State in Electroconvulsive Shock Model of Epilepsy. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p. 416, 2018. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2018.00416/full>>.

ARENA, Andrea; ZIMMER, Till S.; VAN SCHEPPINGEN, Jackelien; *et al.* Oxidative stress and inflammation in a spectrum of epileptogenic cortical malformations: molecular insights into their interdependence. **Brain Pathology**, v. 29, n. 3, p. 351–365, 2019.

AUBERT, A.; KELLEY, K. W.; DANTZER, R. Differential effect of lipopolysaccharide on food hoarding behavior and food consumption in rats. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 11, n. 3, p. 229–238, 1997.

AUVIN, Stéphane; MAZARATI, Andrey; SHIN, Don; *et al.* INFLAMMATION ENHANCES EPILEPTOGENESIS IN THE DEVELOPING RAT BRAIN. **Neurobiology of Disease**, v. 40, n. 1, p. 303–310, 2011.

AUVIN, Stéphane; SHIN, Don; MAZARATI, Andrey; *et al.* Inflammation induced by LPS enhances epileptogenesis in immature rat and may be partially reversed by IL1RA. **Epilepsia**, v. 51, n. Suppl 3, p. 34–38, 2011.

BAGOT, Rosemary C.; PARISE, Eric M.; PEÑA, Catherine J.; *et al.* Ventral hippocampal afferents to the nucleus accumbens regulate susceptibility to depression. **Nature Communications**, v. 6, n. May, 2015.

BEN-ARI, Y.; LAGOWSKA, J.; TREMBLAY, E.; *et al.* A new model of focal status epilepticus: intra-amygdaloid application of kainic acid elicits repetitive secondarily generalized convulsive seizures. **Brain Research**, v. 163, n. 1, p. 176–179, 1979.

BENSON, Melissa J.; MANZANERO, Silvia; BORGES, Karin. Complex alterations in microglial M1/M2 markers during the development of epilepsy in two mouse models. **Epilepsia**, v. 56, n. 6, p. 895–905, 2015.

BERG, Anne T.; LANGFITT, John T.; TESTA, Francine M.; *et al.* Global cognitive function in children with epilepsy: A community-based study. **Epilepsia**, v. 49, n. 4, p. 608–614, 2008.

BERG, Anne T.; VICKREY, Barbara G; LANGFITT, John T; *et al.* The Multicenter Study of Epilepsy Surgery : Recruitment and Selection for Surgery. **Epilepsia**, v. 44, n. 11, p. 1425–1433, 2003.

BERTOGLIO, Daniele; AMHAOUL, Halima; VAN EETVELDT, Annemie; *et al.* Kainic acid-induced post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy with diverging seizure phenotype and neuropathology. **Frontiers in Neurology**, v. 8, n. NOV, p. 1–13, 2017.

BHATIA, Tarun N.; PANT, Deepti B.; ECKHOFF, Elizabeth A.; *et al.* Astrocytes do not forfeit their neuroprotective roles after surviving intense oxidative stress. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 12, n. April, p. 1–12, 2019.

BIAGINI, Giuseppe; D'ANTUONO, Margherita; BENINI, Ruba; *et al.* Perirhinal cortex and temporal lobe epilepsy. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 7, n. AUG, p. 1–10, 2013.

BINGHAM, Deborah; JOHN, Constance M.; LEVIN, Jack; *et al.* Post-injury conditioning with lipopolysaccharide or lipooligosaccharide reduces inflammation in the brain. **Journal of Neuroimmunology**, v. 256, n. 1–2, p. 28–37, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jneuroim.2012.12.009>>.

BINGHAM, Deborah; JOHN, Constance M.; PANTER, S. Scott; *et al.* Post-injury treatment with lipopolysaccharide or lipooligosaccharide protects rat neuronal and glial cell cultures. **Brain Research Bulletin**, v. 85, n. 6, p. 403–409, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresbull.2011.04.007>>.

BRAGIN, A.; AZIZYAN, A.; ALMAJANO, J.; *et al.* The Cause of the Imbalance in the Neuronal Network Leading to Seizure Activity Can Be Predicted by the Electrographic Pattern of the Seizure Onset. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 11, p. 3660–3671, 2009. Disponível em: <<http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.5309-08.2009>>.

BROADBENT, N. J.; SQUIRE, L. R.; CLARK, R. E. Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. **Proceedings of the National Academy of**

Sciences, v. 101, n. 40, p. 14515–14520, 2004. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0406344101>>.

BROADBENT, Nicola J.; GASKIN, Stephane; SQUIRE, Larry R.; *et al.* Object recognition memory and the rodent hippocampus. **Learning and Memory**, v. 17, n. 1, p. 794–800, 2010.

CARBALLOSA-GONZALEZ, Melissa M.; MUÑOZ, Luis J.; LÓPEZ-ALBURQUERQUE, Tomás; *et al.* EEG characterization of audiogenic seizures in the hamster strain GASH: Sal. **Epilepsy Research**, v. 106, n. 3, p. 318–325, 2013.

CASTRO, Gabriel Perfeito; MEDEIROS, Daniel de Castro; GUARNIERI, Leonardo de Oliveira; *et al.* Wistar audiogenic rats display abnormal behavioral traits associated with artificial selection for seizure susceptibility. **Epilepsy and Behavior**, v. 71, p. 243–249, 2017.

CHONG, Seon-ah; BALOSSO, Silvia; VANDENPLAS, Catherine; *et al.* Intrinsic Inflammation Is a Potential Anti-Epileptogenic Target in the Organotypic Hippocampal Slice Model. **Neurotherapeutics**, v. 15, p. 470–488, 2018.

CONZ, Livia; MORITA, Marcia Elisabete; COAN, Ana Carolina; *et al.* Longitudinal MRI volumetric evaluation in patients with familial mesial temporal lobe epilepsy. **Frontiers in Neurology**, v. FEB, n. February, p. 1–5, 2011.

DAVIS, Andrew E M; CAMPBELL, Sandra J.; WILAINAM, Panop; *et al.* Post-conditioning with lipopolysaccharide reduces the inflammatory infiltrate to the injured brain and spinal cord: A potential neuroprotective treatment. **European Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 10, p. 2441–2450, 2005.

DE BROUWER, Geoffrey; WOLMARANS, De Wet. Back to basics: A methodological perspective on marble-burying behavior as a screening test for psychiatric illness. **Behavioural Processes**, v. 157, n. October 2017, p. 590–600, 2018.

DE KLOET, E. R.; MOLENDIJK, M. L. Coping with the Forced Swim Stressor: Towards Understanding an Adaptive Mechanism. **Neural Plasticity**, v. 2016, 2016.

DE OLIVEIRA, Jasiara Carla; MEDEIROS, Daniel de Castro; REZENDE, Gustavo; *et al.* Epilepsy & Behavior Temporally unstructured electrical stimulation to the amygdala suppresses behavioral chronic seizures of the pilocarpine animal model. **Epilepsy & Behavior**, v. 36, p. 159–164, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.yebeh.2014.05.005>>.

DEACON, Robert M.J.; CROUCHER, Adam; RAWLINS, J. Nicholas P. Hippocampal cytotoxic lesion effects on species-typical behaviours in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 132, n. 2, p. 203–213, 2002.

DEKEYNE, Anne; BROCCO, Mauricette; LOISEAU, Florence; *et al.* S32212, a novel serotonin type 2C receptor inverse agonist/ α 2- adrenoceptor antagonist and potential antidepressant: II. A behavioral, neurochemical, and electrophysiological characterization. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 340, n. 3, p. 765–780, 2012.

DEL ARCO, A.; SEGOVIA, G.; FUXE, K.; *et al.* Changes in dialysate concentrations of glutamate and GABA in the brain: An index of volume transmission mediated actions? **Journal of Neurochemistry**, v. 85, n. 1, p. 23–33, 2003.

DHIR, Ashish. Pentylentetrazol (PTZ) kindling model of epilepsy. **Current Protocols in Neuroscience**, v. 1, n. SUPPL.58, p. 1–12, 2012.

DMOWSKA, Mirosława; CYBULSKA, Æ Regina; GAWRON, Jadwiga Jaworska-adamu Æ Antoni. Behavioural and Histological Effects of Preconditioning with Lipopolysaccharide in Epileptic Rats. **Neurochemistry Research**, v. 35, p. 262–272, 2010.

DOMJAN, Michael; GILLAN, Douglas. Role of novelty in the aversion for increasingly concentrated saccharin solutions. **Physiology and Behavior**, v. 16, n. 5, p. 537–542, 1976.

DREXEL, Meinrad; PREIDT, Adrian Patrick; SPERK, Günther. Sequel of spontaneous seizures after kainic acid-induced status epilepticus and associated neuropathological changes in the subiculum and entorhinal cortex. **Neuropharmacology**, v. 63, n. 5, p. 806–817, 2012.

DUPUIS, Nina; MAZARATI, Andrey; DESNOUS, Béatrice; *et al.* Pro-epileptogenic effects of viral-like inflammation in both mature and immature brains. **Journal of Neuroinflammation**, v. 13, n. 1, p. 8–10, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12974-016-0773-6>>.

EHARA, Ayuka; UEDA, Shuichi. Application of Fluoro-Jade C in Acute and Chronic Neurodegeneration Models: Utilities and Staining Differences. **Acta Histochemica Et Cytochemica**, v. 42, n. 6, p. 171–179, 2009. Disponível em: <<http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/ahc/09018?from=CrossRef>>.

ENGEL, Jerome. Progress in epilepsy: Reducing the treatment gap and the promise of biomarkers. **Current Opinion in Neurology**, v. 21, n. 2, p. 150–154, 2008.

ENNACEUR, Abdelkader; NEAVE, Nick; AGGLETON, John P. Spontaneous object recognition and object location memory in rats: The effects of lesions in the cingulate cortices, the medial prefrontal cortex, the cingulum bundle and the fornix. **Experimental Brain Research**, v. 113, n. 3, p. 509–519, 1997.

ESLAMI, Mansoureh; SAYYAH, Mohammad; SOLEIMANI, Mansoureh; *et al.* Lipopolysaccharide preconditioning prevents acceleration of kindling epileptogenesis induced by traumatic brain injury. **Journal of Neuroimmunology**, v. 289, p. 143–151, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jneuroim.2015.11.003>>.

EVERETT, G. M.; RICHARDS, R. K. Comparative Anticonvulsive Action of 3,5,5-trimethyloxazolidine-2,4-dione (Tridione), Dilantin and Phenobarbital. **Journal of Pharmacology & Experimental Therapy**, v. 81, p. 402–407, 1944.

FABENE, Paolo F.; MORA, Graciela Navarro; MARTINELLO, Marianna; *et al.* A role for leukocyte-endothelial adhesion mechanisms in epilepsy. **Nature Medicine**, v. 14, n. 12, p. 1377–1383, 2008.

FALCO-WALTER, Jessica J.; SCHEFFER, Ingrid E.; FISHER, Robert S. The new definition and classification of seizures and epilepsy. **Epilepsy Research**, v. 139, n. July 2017, p. 73–79, 2018.

ILAE; FISHER, Robert S.; ACEVEDO, Carlos; ARZIMANOGLOU, Alexis; *et al.* ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. **Epilepsia**, v. 55, n. 4, p. 475–482, 2014.

ILAE; FISHER, Robert S.; CROSS, J. Helen; FRENCH, Jacqueline A.; *et al.* Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. **Epilepsia**, v. 58, n. 4, p. 522–530, 2017.

FITZGERALD, Katherine A.; ROWE, Daniel C.; BARNES, Betsy J.; *et al.* LPS-TLR4 Signaling to IRF-3/7 and NF- κ B Involves the Toll Adapters TRAM and TRIF. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 198, n. 7, p. 1043–1055, 2003. Disponível em: <<http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20031023>>.

GAITATZIS, Athanasios; CARROLL, Kevin; MAJEED, Azeem; *et al.* The epidemiology of the comorbidity of epilepsy in the general population. **Epilepsia**, v. 45, n. 12, p. 1613–1622, 2004.

GODDARD, Graham V.; MCINTYRE, Dan C.; LEECH, Curtis K. A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. **Experimental Neurology**, v. 25, n. 3, p. 295–330, 1969.

GOLDEN, Gregory T; SMITH, George G; FERRARO, Thomas N; *et al.* Rat strain and age differences in kainic acid induced seizures. **Epilepsy Research**, v. 1211, n. 94, 1995.

GRÖTICKE, Ina; HOFFMANN, Katrin; LÖSCHER, Wolfgang. Behavioral alterations in a mouse model of temporal lobe epilepsy induced by intrahippocampal injection of kainate. **Experimental Neurology**, v. 213, n. 1, p. 71–83, 2008.

GRÖTICKE, Ina; HOFFMANN, Katrin; LÖSCHER, Wolfgang. Behavioral alterations in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in mice. **Experimental Neurology**, v. 207, n. 2, p. 329–349, 2007.

HELLIER, Jennifer L.; DUDEK, F. Edward. Spontaneous motor seizures of rats with kainate-induced epilepsy: Effect of time of day and activity state. **Epilepsy Research**, v. 35, n. 1, p. 47–57, 1999.

HESDORFFER, Dale C.; LOGROSCINO, Giancarlo; CASCINO, Gregory; *et al.* Risk of unprovoked seizure after acute symptomatic seizure: Effect of status epilepticus. **Annals of Neurology**, v. 44, n. 6, p. 908–912, 1998.

HESHMATI, Mitra; RUSSO, Scott J. Anhedonia and the Brain Reward Circuitry in Depression. **Current Behavioral Neuroscience Reports**, v. 2, n. 3, p. 146–153, 2015.

HÖFLICH, Anna; MICHENTHALER, Paul; KASPER, Siegfried; *et al.* Circuit mechanisms of reward, anhedonia, and depression. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 22, n. 2, p. 105–118, 2018.

HOPKINS, Keri J.; WANG, Guang Jian; SCHMUED, Larry C. Temporal progression of kainic acid induced neuronal and myelin degeneration in the rat forebrain. **Brain Research**, v. 864, n. 1, p. 69–80, 2000.

HOSSEINZADEH, Mahshid; POURBADIE, Hamid Gholami; KHODAGHOLI, Fariba; *et al.* Preconditioning with toll-like receptor agonists attenuates seizure activity and neuronal hyperexcitability in the pilocarpine rat model of epilepsy. **Neuroscience**, v. 408, p. 388–399, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.04.020>>.

HUANG, W. S.; ZHU, L. MiR-134 expression and changes in inflammatory cytokines of rats with epileptic seizures. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 22, n. 11, p. 3479–3484, 2018.

JAWORSKA-ADAMU, Jadwiga; DMOWSKA, Mirosława; CYBULSKA, Regina; *et al.* Investigations of hippocampal astrocytes in lipopolysaccharide-preconditioned rats in the pilocarpine model of epilepsy. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v. 49, n. 2, p. 219–224, 2011.

JOPE, Richard S.; MORRISETT, Richard A.; SNEAD, O. Carter. Characterization of lithium potentiation of pilocarpine-induced status epilepticus in rats. **Experimental Neurology**, v. 91, n. 3, p. 471–480, 1986.

KAWAI, Taro; AKIRA, Shizuo. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on toll-like receptors. **Nature Immunology**, v. 11, n. 5, p. 373–384, 2010.

KEHNE, John H.; KLEIN, Brian D.; RAEISSI, Shamsi; *et al.* The National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS) Epilepsy Therapy Screening Program (ETSP). **Neurochemical Research**, v. 42, n. 7, p. 1894–1903, 2017.

KIM, Yun Hee; YOON, Dae Wui; KIM, Je Hyeong; *et al.* Effect of remote ischemic post-conditioning on systemic inflammatory response and survival rate in lipopolysaccharide-induced systemic inflammation model. **Journal of Inflammation (United Kingdom)**, v. 11, n. 1, p. 1–9, 2014.

KLAFT, Zin Juan; DULLA, Chris. Astrocytes Keep It Under Wraps: Reconstructing Synapses in the Latent Phase of Epileptogenesis. **Epilepsy Currents**, v. 20, n. 4, p. 230–232, 2020.

KLEIN, Sabine; BANKSTAHL, Jens P.; LÖSCHER, Wolfgang; *et al.* Sucrose consumption test reveals pharmacoresistant depression-associated behavior in two mouse models of temporal lobe epilepsy. **Experimental Neurology**, v. 263, p. 263–271, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.09.004>>.

KONDRATYEV, Alexei; GALE, Karen. Intracerebral injection of caspase-3 inhibitor prevents neuronal apoptosis after kainic acid-evoked status epilepticus. **Molecular Brain Research**, v. 75, n. 2, p. 216–224, 2000.

KOSTOULA, C.; SHAKER, T.; CEROVIC, M.; *et al.* TLR3 preconditioning induces anti-inflammatory and anti-ictogenic effects in mice mediated by the IRF3/IFN- β axis.

Brain, Behavior, and Immunity, v. 81, n. April, p. 598–607, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.07.021>>.

KOVÁCS, Zsolt; DOBOLYI, Árpád; JUHÁSZ, Gábor; *et al.* Lipopolysaccharide induced increase in seizure activity in two animal models of absence epilepsy WAG/Rij and GAERS rats and Long Evans rats. **Brain Research Bulletin**, v. 104, p. 7–18, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresbull.2014.03.003>>.

KUMRAL, Abdullah; TUZUN, Funda; OZBAL, Seda; *et al.* Lipopolysaccharide-preconditioning protects against endotoxin-induced white matter injury in the neonatal rat brain. **Brain Research**, v. 1489, p. 81–89, 2012.

LADO, Fred A. Chronic bilateral stimulation of the anterior thalamus of kainate-treated rats increases seizure frequency. **Epilepsia**, v. 47, n. 1, p. 27–32, 2006.

LAROCHELLE, Antoine; BELLAVANCE, Marc André; RIVEST, Serge. Role of adaptor protein MyD88 in TLR-mediated preconditioning and neuroprotection after acute excitotoxicity. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 46, p. 221–231, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2015.02.019>>.

LAXER, Kenneth D; TRINKA, Eugen; HIRSCH, Lawrence J; *et al.* The consequences of refractory epilepsy and its treatment. **Epilepsy & Behavior**, v. 37, p. 59–70, 2014.

LEE, Sung-hyun; HAN, Seol-heui; LEE, Kwang-woo. Kainic acid-induced seizures cause neuronal death in infant rats pretreated with lipopolysaccharide. **NeuroReport**, v. 11, n. 3, p. 507–510, 2000.

LEMOS, Luisa De; JUNYENT, Felix; CAMINS, Antoni; *et al.* Neuroprotective Effects of the Absence of JNK1 or JNK3 Isoforms on Kainic Acid-Induced Temporal Lobe Epilepsy-Like Symptoms. **Mol Neurobiol**, v. 55, n. 5, p. 4437–4452, 2017.

LÉVESQUE, Maxime; AVOLI, Massimo; LÉVESQUE, Maxime; *et al.* The kainic acid model of temporal lobe epilepsy. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 37, n. 10 Pt 2, p. 2887–2899, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.10.011><http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0149763413002352><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24184743><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4878897>>.

LIDDELOW, Shane A; BARRES, Ben A. Review Reactive Astrocytes : Production, Function, and Therapeutic Potential. **Immunity**, v. 46, n. 6, p. 957–967, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.006>>.

LIN, Hsiang Yin; HUANG, Chao Ching; CHANG, Kang Fan. Lipopolysaccharide preconditioning reduces neuroinflammation against hypoxic ischemia and provides long-term outcome of neuroprotection in neonatal rat. **Pediatric Research**, v. 66, n. 3, p. 254–259, 2009.

LIU, Lige; ZHENG, Thomas; MORRIS, Margaret J.; et al. The mechanism of carbamazepine aggravation of absence seizures. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 319, n. 2, p. 790–798, 2006.

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

LU, Cheng Wei; HSIEH, Hsi Lung; LIN, Tzu Yu; et al. Echinacoside, an Active Constituent of Cistanche Herba, Exerts a Neuroprotective Effect in a Kainic Acid Rat Model by Inhibiting Inflammatory Processes and Activating the Akt/ GSK 3B Pathway. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 41, n. 11, p. 1685–1693, 2018.

LUINE, Victoria N.; JACOME, Luis F.; MACLUSKY, Neil J. Rapid enhancement of visual and place memory by estrogens in rats. **Endocrinology**, v. 144, n. 7, p. 2836–2844, 2003.

MAGIORKINIS, Emmanouil; SIDIROPOULOU, Kalliopi; DIAMANTIS, Aristidis. Hallmarks in the history of epilepsy: Epilepsy in antiquity. **Epilepsy and Behavior**, v. 17, n. 1, p. 103–108, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.yebeh.2009.10.023>>.

MARESCAUX, C; RIBAN, V; BOUILLERET, V; et al. EVOLUTION OF HIPPOCAMPAL EPILEPTIC ACTIVITY DURING THE DEVELOPMENT OF HIPPOCAMPAL SCLEROSIS IN A MOUSE MODEL OF TEMPORAL LOBE EPILEPSY. **Neuroscience**, v. 112, n. 1, p. 101–111, 2002.

MARTIN, Kirsty; JACKSON, Cerian F.; LEVY, Robert G.; et al. Ketogenic diet and other dietary treatments for epilepsy. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2016, n. 2, 2016.

MATSUDA, Taito; MURAO, Naoya; KATANO, Yuki; et al. TLR9 signalling in microglia attenuates seizure-induced aberrant neurogenesis in the adult hippocampus. **Nature**

Communications, v. 6, p. 1–10, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ncomms7514>>.

MERRIT, H. H.; PUTNAM, T. J.; SCHWAB, D. M. Experimental Determination of the anticonvulsant properties of some phenyl derivatives. **Science**, v. 85, n. 2213, p. 525–526, 1937.

MIRRIONE, Martine M.; KONOMOS, Dorothy K.; GRAVANIS, Iordanis; *et al.* Microglial ablation and lipopolysaccharide preconditioning affects pilocarpine-induced seizures in mice. **Neurobiology of Disease**, v. 39, n. 1, p. 85–97, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2010.04.001>>.

MORAES, Márcio Flávio Dutra; GALVIS-ALONSO, Orfa Yineth; GARCIA-CAIRASCO, Norberto. Audiogenic kindling in the Wistar rat: a potential model for recruitment of limbic structures. **Epilepsy Research**, v. 39, p. 251–259, 2000. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/epilepsyres>.

MOSES, Sandra N.; COLE, Carrie; RYAN, Jennifer D. Relational memory for object identity and spatial location in rats with lesions of perirhinal cortex, amygdala and hippocampus. **Brain Research Bulletin**, v. 65, n. 6, p. 501–512, 2005.

MOURÃO, Flávio Afonso Gonçalves; LOCKMANN, André Luiz Vieira; CASTRO, Gabriel Perfeito; *et al.* Triggering Different Brain States Using Asynchronous Serial Communication to the Rat Amygdala. **Cerebral Cortex**, v. 26, n. 5, p. 1866–1877, 2016.

MUSTO, Alberto E.; WALKER, Chelsey P.; PETASIS, Nicos A.; *et al.* Hippocampal neuro-networks and dendritic spine perturbations in epileptogenesis are attenuated by neuroprotectin D1. **PLoS ONE**, v. 10, n. 1, p. 1–19, 2015.

NGUGI, Anthony K.; BOTTOMLEY, Christian; KLEINSCHMIDT, Immo; *et al.* Estimation of the burden of active and life-time epilepsy: A meta-analytic approach. **Epilepsia**, v. 51, n. 5, p. 883–890, 2010.

NICE. Epilepsies: diagnosis and management. *In*: **NICE Clinical guideline 137**. [s.l.: s.n.], 2012, p. 1–110. Disponível em: <<http://www.nice.org.uk/guidance/cg137/chapter/guidance#ketogenic-diet>>.

NICOLAS, Laurent B.; KOLB, Yeter; PRINSSEN, Eric P.M. A combined marble burying-locomotor activity test in mice: A practical screening test with sensitivity to different classes of anxiolytics and antidepressants. **European Journal of Pharmacology**, v. 547, n. 1–3, p. 106–115, 2006.

NIRWAN, Nikita; VYAS, Preeti; VOHORA, Divya. Animal models of status epilepticus and temporal lobe epilepsy: a narrative review. **Rev .Neurosci.**, v. 29, n. 7, p. 757–770, 2018.

NJUNG'E, Kung'u; HANDLEY, Sheila L. Evaluation of marble-burying behavior as a model of anxiety. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 38, n. 1, p. 63–67, 1991.

NORONHA, Ana L.A.; BORGES, Moacir A.; MARQUES, Lucia H.N.; *et al.* Prevalence and pattern of epilepsy treatment in different socioeconomic classes in Brazil. **Epilepsia**, v. 48, n. 5, p. 880–885, 2007.

PÁL, Balázs. **Involvement of extrasynaptic glutamate in physiological and pathophysiological changes of neuronal excitability.** [s.l.]: Springer International Publishing, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00018-018-2837-5>>.

PAUDEL, Yam Nath; SHAIKH, Mohd Farooq; SHAH, Sadia; *et al.* Role of inflammation in epilepsy and neurobehavioral comorbidities: Implication for therapy. **European Journal of Pharmacology**, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.08.020>>.

PAXINOS, GEORGE; FRANKLIN, Keith B. J. **The Mouse Brain in Sterotaxic Coordinates.** 2. ed. [s.l.]: Academic Press, 2001.

PENG, Anjiao; QIU, Xiangmiao; LAI, Wanlin; *et al.* Altered composition of the gut microbiome in patients with drug-resistant epilepsy. **Epilepsy Research**, v. 147, n. 37, p. 102–107, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2018.09.013>>.

PENG, Wei Feng; FAN, Fan; LI, Xin; *et al.* Different behavioral and pathological changes between epilepsy-associated depression and primary depression models. **Epilepsy and Behavior**, v. 83, p. 212–218, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2017.12.038>>.

PITKÄNEN, Asla; LUKASIUK, Katarzyna; DUDEK, F Edward; *et al.* Epileptogenesis. **Cold Spring Harb Perspect Med**, p. 196–199, 2015.

PLAMONDON, Hélène; BLONDEAU, Nicolas; HEURTEAUX, Catherine; *et al.* Mutually protective actions of kainic acid epileptic preconditioning and sublethal global ischemia on hippocampal neuronal death: Involvement of adenosine A1 receptors and K(ATP) channels. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 19, n. 12, p. 1296–1308, 1999.

PORSOLT, Roger D.; MARTIN, Patrick; LENÈGRE, Antoine; *et al.* Effects of an extract of Ginkgo Biloba (EGB 761) on “learned helplessness” and other models of stress in rodents. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 36, n. 4, p. 963–971, 1990.

RACINE, Ronald J. Modification of seizure activity by electrical stimulation: Cortical areas. **Electroencephalography and Clinical Neurophysiology**, v. 38, n. 1, p. 1–12, 1975.

RAEDT, Robrecht; VAN DYCKE, A.; VAN MELKEBEKE, D.; *et al.* Seizures in the intrahippocampal kainic acid epilepsy model: Characterization using long-term video-EEG monitoring in the rat. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 119, n. 5, p. 293–303, 2009.

RANA, Amna; MUSTO, Alberto E. The role of inflammation in the development of epilepsy. **Journal of Neuroinflammation**, v. 15, n. 144, p. 1–12, 2018.

RATTKA, Marta; BRANDT, Claudia; LÖSCHER, Wolfgang. The intrahippocampal kainate model of temporal lobe epilepsy revisited: Epileptogenesis, behavioral and cognitive alterations, pharmacological response, and hippocampal damage in epileptic rats. **Epilepsy Research**, v. 103, n. 2–3, p. 135–152, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2012.09.015>>.

ROSENOW, Felix; KLEIN, Karl Martin; HAMER, Hajo M. Non-invasive EEG evaluation in epilepsy diagnosis. **Expert Review of Neurotherapeutics**, v. 15, n. 4, p. 425–444, 2015.

SANKARANENI, Ram; LACHHWANI, Deepak. Antiepileptic drugs - A review. **Pediatric Annals**, v. 44, n. 2, p. e36–e42, 2015.

SARKISOVA, Karine; VAN LUIJTELAAR, Gilles. The WAG/Rij strain: A genetic animal model of absence epilepsy with comorbidity of depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 35, n. 4, p. 854–876, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.11.010>>.

SAYYAH, M; JAVAD-POUR, M; GHAZI-KHANSARI, M. The Bacterial Endotoxin Lipopolysaccharide Enhances Seizure Susceptibility in Mice: Involvement of Proinflammatory Factors: Nitric Oxide and Prostaglandins. **Neuroscience**, v. 122, p. 1073–1080, 2003.

SCARLATELLI-LIMA, A. V.; MAGALHÃES, L. H M; DORETTO, M. C.; *et al.* Assessment of the seizure susceptibility of Wistar Audiogenic rat to electroshock,

pentylentetrazole and pilocarpine. **Brain Research**, v. 960, n. 1–2, p. 184–189, 2003.

SCHARFMAN, Helen E.; SOLLAS, Anne L.; BERGER, Russell E.; *et al.* Electrophysiological evidence of monosynaptic excitatory transmission between granule cells after seizure-induced mossy fiber sprouting. **Journal of Neurophysiology**, v. 90, n. 4, p. 2536–2547, 2003.

SCHEFFER, Ingrid E.; BERKOVIC, Samuel; CAPOVILLA, Giuseppe; *et al.* ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. **Epilepsia**, v. 58, n. 4, p. 512–521, 2017.

SERHAN, Charles N; BRAIN, Sue D; BUCKLEY, Christopher D; *et al.* Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. **Europe PMC Funders Group**, v. 21, n. 2, p. 325–332, 2011.

SHANE A. LIDDELOW, KEVIN A. GUTTENPLAN, LAURA E. CLARKE, FREDERICK C. BENNETT, CHRISTOPHER J. BOHLEN, LUCAS SCHIRMER, MARIKO L. BENNETT, ALEXANDRA E. MÜNCH, WON-SUK CHUNG, TODD C. PETERSON, DANIEL K. WILTON, ARNAUD FROUIN, BROOKE A. NAPIER, NIKHIL PANICKE, Beth Stevens & Ben A. Barres. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. **Nature**, v. 541, p. 481–487, 2017.

SHARMA, Alok K.; JORDAN, William H.; REAMS, Rachel Y.; *et al.* Temporal profile of clinical signs and histopathologic changes in an F-344 rat model of kainic acid-induced mesial temporal lobe epilepsy. **Toxicologic Pathology**, v. 36, n. 7, p. 932–943, 2008.

SHIMADA, Tadayuki; YAMAGATA, Kanato. Pentylentetrazole-induced kindling mouse model. **Journal of Visualized Experiments**, v. 2018, n. 136, p. 1–10, 2018.

SIMONI, Maria Grazia De; PEREGO, Carlo; RAVIZZA, Teresa; *et al.* Inflammatory cytokines and related genes are induced in the rat hippocampus by limbic status epilepticus. **European Journal of Neuroscience**, v. 12, p. 2623–2633, 2000.

SINGH, Anuradha; TREVICK, Stephen. The Epidemiology of Global Epilepsy. **Neurologic Clinics**, v. 34, n. 4, p. 837–847, 2016.

SLATTERY, David A.; CRYAN, John F. Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. **Nature Protocols**, v. 7, n. 6, p. 1009–1014, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2012.044>>.

SQUIRES, Richard F; SAEDERUP, Else; CRAWLEY, Jacqueline N; *et al.* Convulsant Potencies of Tetrazoles are Highly Correlated with Actions on GABA/Benzodiazepine/Picrotoxin Receptor Complexes in Brain. **Life Sci.**, v. 35, n. c, p. 1439–1444, 1984.

TANG, Minke; ALEXANDER, Henry; CLARK, Robert S.B.; *et al.* Minocycline reduces neuronal death and attenuates microglial response after pediatric asphyxial cardiac arrest. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 30, n. 1, p. 119–129, 2010.

TANIMURA, Natsuko; SAITOH, Shinichiroh; MATSUMOTO, Fumi; *et al.* Roles for LPS-dependent interaction and relocation of TLR4 and TRAM in TRIF-signaling. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 368, n. 1, p. 94–99, 2008.

TERRONE, Gaetano; BALOSSO, Silvia; PAULETTI, Alberto; *et al.* Inflammation and reactive oxygen species as disease modifiers in epilepsy. **Neuropharmacology**, p. 107742, 2019.

TIAN, Guo-Feng; AZMI, Hooman; TAKANO, Takahiro; *et al.* An astrocytic basis of epilepsy. **Nature Medicine**, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>>.

TSUJI, Atsushi; AMANO, Shigeru; YOKOYAMA, Masao; *et al.* Hereditary Neuronal Microdysgenesis and Acquired Lesions in the Hippocampal Formation of Ihara Epileptic Rat. **Epilepsia**, v. 41, n. 9, p. 52, 2000.

TURNER, Ryan C; NASER, Zachary J; LUCKE-WOLD, Brandon P; *et al.* Single low-dose lipopolysaccharide preconditioning: neuroprotective against axonal injury and modulates glial cells. **Neuroimmunol Neuroinflamm.**, v. 90, n. 3, p. 609–621, 2017.

TURSKI, Waldemar A.; CAVALHEIRO, Esper A.; SCHWARZ, Michael; *et al.* Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: Behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. **Behavioural Brain Research**, v. 9, n. 3, p. 315–335, 1983.

VAN VLIET, E. A.; ARONICA, E.; VEZZANI, A.; *et al.* Review: Neuroinflammatory pathways as treatment targets and biomarker candidates in epilepsy: emerging evidence from preclinical and clinical studies. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 44, n. 1, p. 91–111, 2018.

VARVEL, Nicholas H.; NEHER, Jonas J.; BOSCH, Andrea; *et al.* Infiltrating monocytes promote brain inflammation and exacerbate neuronal damage after

status epilepticus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 38, p. E5665–E5674, 2016.

VERGNES, M.; MARESCAUX, Ch; MICHELETTI, G.; *et al.* Spontaneous paroxysmal electroclinical patterns in rat: A model of generalized non-convulsive epilepsy. **Neuroscience Letters**, v. 33, n. 1, p. 97–101, 1982.

VEZZANI, A; MONETA, D; CONTI, M; *et al.* Powerful anticonvulsant action of IL-1 receptor antagonist on intracerebral injection and astrocytic overexpression in mice. **PNAS**, v. 97, n. 21, p. 11534–11539, 2000.

VEZZANI, Annamaria. Brain Inflammation and Seizures: Evolving Concepts and New Findings in the Last 2 Decades. **Epilepsy Currents**, p. 4–7, 2020.

VEZZANI, Annamaria; BALOSSO, Silvia; RAVIZZA, Teresa. Neuroinflammatory pathways as treatment targets and biomarkers in epilepsy. **Nature Reviews Neurology**, v. 15, n. 8, p. 459–472, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41582-019-0217-x>>.

VEZZANI, Annamaria; FRENCH, Jacqueline; BARTFAI, Tamas; *et al.* The role of inflammation in epilepsy. **Nature Reviews Neurology**, v. 7, n. 1, p. 31–40, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2010.178>>.

VEZZANI, Annamaria; FRIEDMAN, Alon. Brain Inflammation as a Biomarker in Epilepsy. **Biomarkers Med**, v. 5, n. 5, p. 607–614, 2011.

VEZZANI, Annamaria; VIVIANI, Barbara. Neuromodulatory properties of inflammatory cytokines and their impact on neuronal excitability. **Neuropharmacology**, v. 96, n. PA, p. 70–82, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.10.027>>.

VINCENT, P.; MULLE, C. Kainate receptors in epilepsy and excitotoxicity. **Neuroscience**, v. 158, n. 1, p. 309–323, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.02.066>>.

VINTEN-JOHANSEN, Jakob; SHI, Weiwei. Preconditioning and postconditioning: Current knowledge, knowledge gaps, barriers to adoption, and future directions. **Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics**, v. 16, n. 3–4, p. 260–266, 2011.

WALLACE, M.; LUINE, V.; ARELLANOS, A.; *et al.* Ovariectomized rats show decreased recognition memory and spine density in the hippocampus and prefrontal cortex. **Brain Research**, v. 1126, n. 1, p. 176–182, 2006.

WALLACE, Richard J. Tail-hoarding in the albino rat. **Animal Behaviour**, v. 24, n. 1, 1976.

WALLACE, Richard J.; TIGNER, Joseph C. Effect of cortical and hippocampal lesions on hoarding behavior in the albino rat. **Physiology and Behavior**, v. 8, n. 5, p. 937–942, 1972.

WARBURTON, E. C.; BROWN, M. W. Neural circuitry for rat recognition memory. **Behavioural Brain Research**, v. 285, p. 131–139, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2014.09.050>>.

ZACK, Matthew M; KOBAYASHI, Rosemarie. National and state estimates of the numbers of adults and children with active epilepsy - United States, 2015. **Morbidity And Mortality Weekly Report**, v. 66, n. 31, p. 821–825, 2017.

ZHANG, Liang; GUO, Yi; HU, Haitao; *et al.* FDG-PET and NeuN-GFAP immunohistochemistry of hippocampus at different phases of the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. **International Journal of Medical Sciences**, v. 12, n. 3, p. 288–294, 2015.

ZHAO, Xiaofeng; LIAO, Yuan; MORGAN, Shannon; *et al.* Noninflammatory Changes of Microglia Are Sufficient to Cause Epilepsy. **HHS Public Access**, v. 22, n. 8, p. 2080–2093, 2018.

ZHU, Furong; ZHENG, Yingjun; DING, Yu-qiang; *et al.* Minocycline and Risperidone Prevent Microglia Activation and Rescue Behavioral Deficits Induced by Neonatal Intrahippocampal Injection of Lipopolysaccharide in Rats. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, 2014.