

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia

Gabriela Machado Parreira

**EPILEPSIAS E NEUROTRANSMISSÃO DOPAMINÉRGICA: expressão de
receptores, efeito de moduladores e avaliação do comportamento animal no
modelo Wistar Audiogenic Rats (WAR)**

Belo Horizonte
2023

Gabriela Machado Parreira

EPILEPSIAS E NEUROTRANSMISSÃO DOPAMINÉRGICA: expressão de receptores, efeito de moduladores e avaliação do comportamento animal no modelo Wistar Audiogenic Rats (WAR)

Versão final

Tese submetida ao Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Bioquímica e Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Rafael Pinto Vieira

Co-Orientador: Dr. Leonardo de Oliveira Guarnieri

Belo Horizonte
2023

043

Parreira, Gabriela Machado.

Epilepsias e neurotransmissão dopaminérgica: expressão de receptores, efeito de moduladores e avaliação do comportamento animal no modelo Wistar Audiogenic Rats (WAR) [manuscrito] / Gabriela Machado Parreira. – 2023. 93 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Pinto Vieira. Co-Orientador: Dr. Leonardo de Oliveira Guarnieri.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Epilepsia. 3. Dopamina. 4. Comorbidade. 5. Ratos Wistar. I. Vieira, Rafael Pinto. II. Guarnieri, Leonardo de Oliveira. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
 31270-901 – Belo Horizonte – MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615




ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE GABRIELA MACHADO PARREIRA.
 Aos doze dias do mês de setembro de 2023 às 08:30 horas, reuniu-se de forma “on line” utilizando a plataforma “Zoom”, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Epilepsias e neurotransmissão dopaminérgica: expressão de receptores, efeito de moduladores e avaliação do comportamento animal no modelo Wistar Audiogenic Rats (WAR)", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Bioquímica. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Rafael Pinto Vieira, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Maria Elisa Calcagnotto (Universidade Federal do Rio Grande do Sul), aprovada; Dra. Luciana Estefani Drumond de Carvalho (Universidade Federal de São João del Rei), aprovada; Dra. Miriam Chaves Schultz (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Rita Gomes Wanderley Pires (Universidade Federal do Espírito Santo), aprovada; Dr. Leonardo de Oliveira Guarnieri - Coorientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Rafael Pinto Vieira - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:


APROVADA

REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 12 de setembro de 2023.


Documento assinado digitalmente
 MARIA ELISA CALCAGNOTTO
 Data: 12/09/2023 12:39:30-0300
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Maria Elisa Calcagnotto (Universidade Federal do Rio Grande do Sul)


Documento assinado digitalmente
 LUCIANA ESTEFANI DRUMOND DE CARVALHO
 Data: 12/09/2023 12:54:06-0300
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Luciana Estefani Drumond de Carvalho (Universidade Federal de São João del Rei)


Dra. Miriam Chaves Schultz (Universidade Federal de Minas Gerais)

Documento assinado digitalmente
 **RITA GOMES WANDERLEY PIRES**
Data: 12/09/2023 15:46:48-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>


Dra. Rita Gomes Wanderley Pires (Universidade Federal do Espírito Santo)

Documento assinado digitalmente
 **LEONARDO DE OLIVEIRA GUARNIERI**
Data: 12/09/2023 13:15:55-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Dr. Leonardo de Oliveira Guarnieri - Coordenador (Universidade Federal de Minas Gerais)

Documento assinado digitalmente
 **RAFAEL PINTO VIEIRA**
Data: 12/09/2023 13:21:38-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Dr. Rafael Pinto Vieira - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais)

Documento assinado digitalmente
 **MIRIAM CHAVES SCHULTZ**
Data: 12/09/2023 13:04:51-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Agradecimentos

Agradeço minha mãe, Adriana, meu pai, Eduardo e minha irmã, Bárbara, por toda paciência que tiveram comigo, pelas palavras de incentivo em momentos de desespero, por nunca duvidarem da minha capacidade e por todo o amor que me deram.

Ao prof. Dr Rafael Pinto Vieira, pela orientação, por ter aberto as portas do laboratório, pela contribuição para minha formação, por passar junto comigo por todas as dificuldades desse processo e por depositar em mim tanta confiança.

Ao Dr. Leonardo Guarnieri pela Coorientação neste trabalho, por me ajudar a crescer sempre no laboratório. Por toda paciência nas nossas discussões, nunca deixando de acreditar e mostrar o meu potencial.

Ao prof. Dr Marcio Flávio Dutra Moraes, por sempre tirar minhas dúvidas e por acreditar neste trabalho.

Ao Jamil por confiar e sempre estar presente quando precisei de uma ajuda. Sentirei saudades.

Aos membros do CAPI, Nathalia, Natalia, Eduardo e Samuel que me ajudaram na produção das imagens deste trabalho.

Ao aluno Ivan Lobo que aceitou conduzir este trabalho e abraçou comigo todas as dificuldades.

Ao meu amigo Filipe por dividir os melhores e piores momentos, por todos os desabafos e palavras de conforto para prosseguirmos o doutorado. Por cada dia vivido e compartilhado, você faz parte da minha vida e da minha história. Obrigada tudo!

Ao Paulo Henrique que se aventurou no conhecimento de bioquímica para escutar as minhas dificuldades e alegrias enfrentadas ao longo do doutorado com muita paciência e carinho. Meu mais sincero agradecimento.

A todos os amigos que adquiri durante este doutorado e os amigos que a vida me deu, obrigada por tudo. A todos que tornaram possível essa realização, muito obrigada!

Ao CNPq, Capes e Fapemig pelo apoio financeiro.

Resumo

Epilepsias são doenças do Sistema Nervoso Central caracterizadas por descargas elétricas irregulares e recorrentes e, frequentemente, os pacientes epiléticos também são afetados por comorbidades neuropsiquiátricas, como depressão e ansiedade. Tanto a epilepsia quanto as comorbidades podem estar relacionadas a alterações na neurotransmissão dopaminérgica. No presente trabalho, investigamos a expressão de receptores tipo D1 e D2 em animais *Wistar* e *WAR* (*Wistar Audiogenic Rats*) machos, um modelo experimental de epilepsia, também foram realizados testes comportamentais como campo aberto, preferência por sacarose e labirinto em cruz elevado (LCE). Além disso, investigamos os efeitos de agonistas no comportamento dos animais. Os *WAR* foram divididos conforme o índice de gravidade comportamental (IGC) observado após o estímulo audiogênico. Os grupos utilizados foram: grupo *Wistar* e *WAR* controle (solução salina a 0,9%), *Wistar* e *WAR* tratado com agonista D1 (SKF-38393, 40 pmol/ μ L), *Wistar* e *WAR* tratado com agonista D2 (quimpirole, 40 pmol/ μ L). As soluções foram administradas por via intra-amigdalal com o intervalo de dois dias entre as administrações. As análises bioquímicas de *western blot*, imunofluorescência e imunohistoquímica foram feitas para avaliação da expressão dos receptores de dopamina do tipo 1 (RD1) e 2 (RD2) em fatias de hipocampo, córtex pré-frontal, amígdala e estriado. Para o hipocampo, observamos um aumento na expressão de RD1 em animais *WAR* quando comparados aos animais *Wistar* (*western blot*) e uma diminuição da expressão da enzima tirosina hidroxilase (TH) e de RD2 pré-sináptico para a região CA1 (imunofluorescência). Observamos também um aumento na expressão de RD1 para a região infra-límbica do córtex pré-frontal em animais *WAR* quando comparados aos animais *Wistar*. Foi observada diminuição da expressão de TH e de RD2 total para a região da amígdala basolateral (imunofluorescência) em animais *WAR* quando comparados aos animais *Wistar*. Observamos uma diminuição na distância total percorrida, distância percorrida no centro e na periferia em animais *WAR* quando comparados aos animais *Wistar* no teste do campo aberto. Para o teste de preferência por sacarose, não foram observadas alterações. Já para o teste LCE, observamos que animais *WAR* não são capazes de explorar os braços abertos do aparato quando comparados aos animais *Wistar*. Posteriormente, seguimos para a administração dos agonistas e nova realização do LCE, onde observamos maior entrada em braços abertos do aparato para animais *WAR* tratados com quimpirole quando comparados aos animais *WAR* controle. Por fim, avaliamos o IGC em animais *WAR* após a administração dos mesmos agonistas. A diminuição deste índice em animais *WAR* tratados com quimpirole quando comparados aos animais *WAR* controle foi confirmada. Em resumo e pela primeira vez na literatura até onde sabemos, nossos tratamentos, especialmente com o agonista de receptores tipo D2, foram capazes de alterar aspectos comportamentais em animais *WAR* quando comparados aos grupos controle, sugerindo a modulação do sistema dopaminérgico e manifestações comportamentais relacionadas. Estes resultados reforçam o interesse pelo aumento do conhecimento relacionado a moduladores do sistema dopaminérgico em epilepsias, como potenciais candidatos a fármaco para o tratamento de comorbidades neuropsiquiátricas de pacientes epiléticos.

Palavras-chave: Epilepsia, Dopamina, Comorbidades, *Wistar Audiogenic Rats*

Abstract

Epilepsies are diseases of the Central Nervous System characterized by irregular and recurrent electrical discharges and, frequently, epileptic patients are also affected by neuropsychiatric comorbidities, such as depression and anxiety. Both epilepsy and comorbidities may be related to changes in dopaminergic neurotransmission. In the present work, we investigated the expression of D1- and D2-type receptors in Wistar and WAR (Wistar Audiogenic Rats) animals, an experimental model of epilepsy. Furthermore, we investigated the effects of agonists with high specificity to these receptors on animal behavior. Male WAR and Wistar rats were used, and the WAR were divided according to the behavioral severity index (BSI, IGC in portuguese) observed after the audiogenic stimulus. The groups used were: Wistar control group (Saline, 0.9% saline solution), WAR control (Saline, 0.9% saline solution), Wistar treated with D1 agonist (SKF-38393, 40 pmol/ μ L), WAR treated with D1 agonist (SKF-38393, 40 pmol/ μ L), Wistar treated with D2 agonist (quinpirole, 40 pmol/ μ L) and WAR (quinpirole, 40 pmol/ μ L). The solutions were administered intra-amygdalarly with an interval of two days between administrations. Biochemical analyzes of western blot, immunofluorescence and immunohistochemistry were performed to evaluate the expression of dopamine receptors type 1 (RD1) and 2 (RD2) in slices of hippocampus, prefrontal cortex, amygdala and striatum of Wistar and WAR. For the hippocampus, we observed an increase in the expression of RD1 in WAR animals when compared to Wistar animals (western blot) and a decrease in the expression of the enzyme tyrosine hydroxylase and presynaptic RD2 for the CA1 region (immunofluorescence). We also observed an increase in RD1 expression for the infralimbic region of the prefrontal cortex in WAR animals when compared to Wistar animals. In addition, a decrease in the expression of the enzyme tyrosine hydroxylase and total RD2 was observed for the region of the basolateral amygdala (immunofluorescence) in WAR animals when compared to Wistar animals. Subsequently, the behavioral analysis was performed, followed by the administration of the agonists. In the elevated plus maze test, we observed greater entry into open trimmed arms for WAR animals treated with quinpirole when compared to control WAR animals. Finally, we evaluated the IGC observed in WAR animals after the administration of the same agonists. The decrease in this index in WAR animals treated with quinpirole when compared to control WAR animals was also confirmed. In summary, and for the first time in the literature as far as we know, our treatments, especially with D2 receptor agonist, were able to change behavioral aspects in WAR when compared to control groups, suggesting the modulation of the dopaminergic system and related behavioral manifestations. These results reinforce the interest in increasing knowledge related to modulators of the dopaminergic system in epilepsy, as potential drug candidates for the treatment of neuropsychiatric comorbidities in epileptic patients.

Keywords: Epilepsy, Dopamine, Comorbidities, Wistar Audiogenic Rats

Lista de abreviaturas e siglas

ATV - área tegmental ventral
AMPc - monofosfato de adenosina cíclica
AK - ácido cáinico
AP - antero-posterior
ABL - amígdala basolateral
BS - benzaldeído semilcarbazona
BS/HP- β -CD - hidroxipropil-beta-ciclodextrina
BSA - albumina sérica bovina
COMT - catecol-O-metiltransferase
Ca²⁺ – cálcio
CAPI - Centro de Aquisição e processamento de Imagens
DOPAC - ácido 3,4- dihidroxifenilacético
DCAA ou DDC - DOPA-descarboxilase
DV - dorso-ventral
DG - diacilglicerol
DA – dopamina
EH - esclerose do hipocampo
ELT - epilepsia do lobo temporal
EM - estimulação magnética
EI - esquiiva inibitória
EA - esquiiva ativa
GABA - ácido γ -aminobutírico
GD - giro denteado
Glu - L-glutamato
HVA - ácido homovanílico
IL - córtex infralímbico
IP₃ - inositol trifosfato
IGC - índice de gravidade comportamental
ICB - Instituto de ciências biológicas
L-DOPA - 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina
LCE - labirinto em cruz elevado
MAO - monoamina oxidase
ML - médio-lateral
NGS – *normal goat serum*
NF - nado forçado
NBA - núcleo basolateral da amígdala
PLC - fosfolipase C
PrL - pré-límbico
PFA – paraformaldeído
PLP - potenciação de longo prazo
PS - preferência social
PVP – polivinilpirrolidona
PTZ - pentilenotetrazol
RAPG - receptores acoplados à proteína G
RD1 - receptores semelhantes a D1
RD2 - receptores semelhantes a D2
SE - status epilepticus
SD - Sprague-Dawley

SNC - sistema nervoso central

SEM - Erro Padrão da Média

TH - tirosina hidroxilase

TCA - teste de campo aberto

TPS - teste de preferência por sacarose

TEE - teste de enterrar esferas

VMAT2 - proteína transportadora de monoamina vesicular

Sumário

I) Introdução	12
I.1 Epilepsias	12
I.2 Epileptogênese - o papel da amígdala e do hipocampo	15
I.3 Alterações comportamentais relacionadas às epilepsias	17
I.4 Dopamina e neurotransmissão dopaminérgica	18
I.5 Modelos animais de Epilepsias	24
Justificativa	27
Objetivo geral	27
Objetivos específicos	27
II) Material e métodos	28
II.1 Substâncias	28
II.2 Animais	28
II.3 Cirurgia Estereotáxica	30
II.4 Cálculo amostral	31
II.5 Testes comportamentais	32
II.6 Índice de gravidade comportamental da crise epiléptica	32
II.7 Labirinto em cruz elevado (LCE)	32
II.8 Campo aberto	33
II.9 Teste de preferência por sacarose	33
II.10 Preparação de membrana	33
II.11 Doseamento de proteína	34
II.12 <i>Western Blot</i>	34
II.13 Imunofluorescência	35
II.14 Imunoistoquímica	37
II.15 Obtenção das imagens	38
II.16 Quantificação das células marcadas	39
II.17 Análise estatística	39
III) Resultados e discussão	39
III.1 Resultados da análise comportamental dos animais	39
III.2 Resultados das análises bioquímicas de regiões do encéfalo dos animais – RD1	45
III.3 Influência da administração intra-amigdalar de agonista RD1 no comportamento e no índice de gravidade das crises dos animais <i>WAR</i>	51
III.4 Resultados das análises bioquímicas de regiões do encéfalo dos animais – RD2	54

III.5 Influência da administração intra-amigdalár de agonista RD2 no comportamento e no índice de gravidade das crises dos animais <i>WAR</i>	64
IV. Conclusão.....	67
V. Referências.....	70
VI. Anexos.....	80

I) Introdução

I.1 Epilepsias

Epilepsias são condições patológicas do sistema nervoso central (SNC) caracterizadas por descargas elétricas irregulares e recorrentes em uma parte do cérebro ou em sua totalidade (Bragatti, Torres et al. 2009). Afetam aproximadamente 50 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo alguns dos distúrbios neurológicos mais comuns (WHO, 2019). Como característica fisiopatológica, as epilepsias se apresentam na forma de crises epiléticas espontâneas e recorrentes, resultantes de uma atividade hipersincrônica e repetitiva de um grupo neuronal. Essa atividade pode afetar várias estruturas, dentre elas a amígdala e o hipocampo. A região anatômica afetada e a duração da atividade determinam a natureza da crise (Avanzini and Franceschetti 2003).

Crises epiléticas ocorrem aleatoriamente na maioria dos pacientes de ambos os sexos (WHO, 2019) e suas classificações são de grande importância para o diagnóstico das epilepsias, permitindo o direcionamento do tratamento. Geralmente, as crises podem ser divididas em focais, generalizadas e de origem desconhecida (Figura 1) (ILAE, 2017).

As crises focais ocorrem quando um pequeno grupo de neurônios, conhecido como foco epileptogênico, é afetado. Os sintomas são dependentes da região do cérebro afetada e essas crises podem ser classificadas como focais, quando não há perda da consciência, ou complexas, quando há alteração na consciência. Em alguns casos, a atividade epilética focal pode se alastrar para outras áreas, resultando em uma crise focal com generalização secundária (Devinsky, Vezzani et al. 2018).

As crises generalizadas primárias são conhecidas por afetarem, desde seu início, ambos os hemisférios e podem ser divididas em crises motoras ou crises de ausência (não motoras). Elas podem envolver movimentos anormais, como contrações musculares rápidas, espasmos ou rigidez (mioclônicos, clônicos ou tônicos), bem como a perda repentina do tônus muscular (crise atônica) (Devinsky, Vezzani et al. 2018).

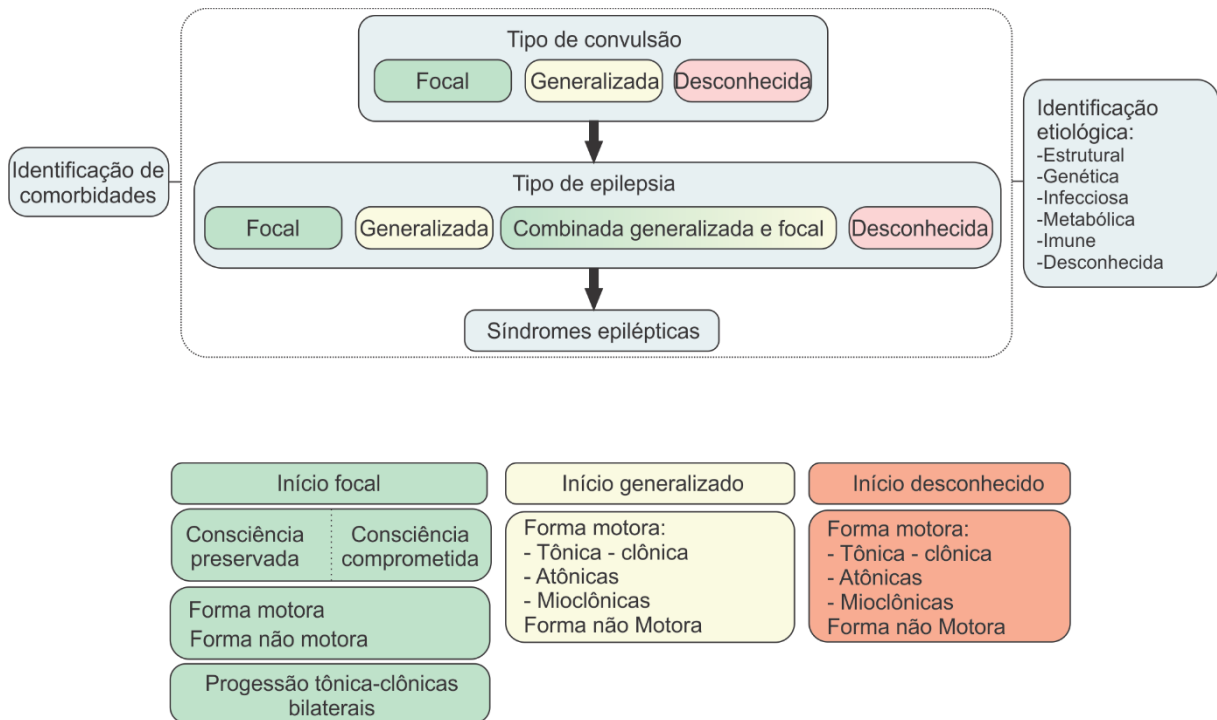
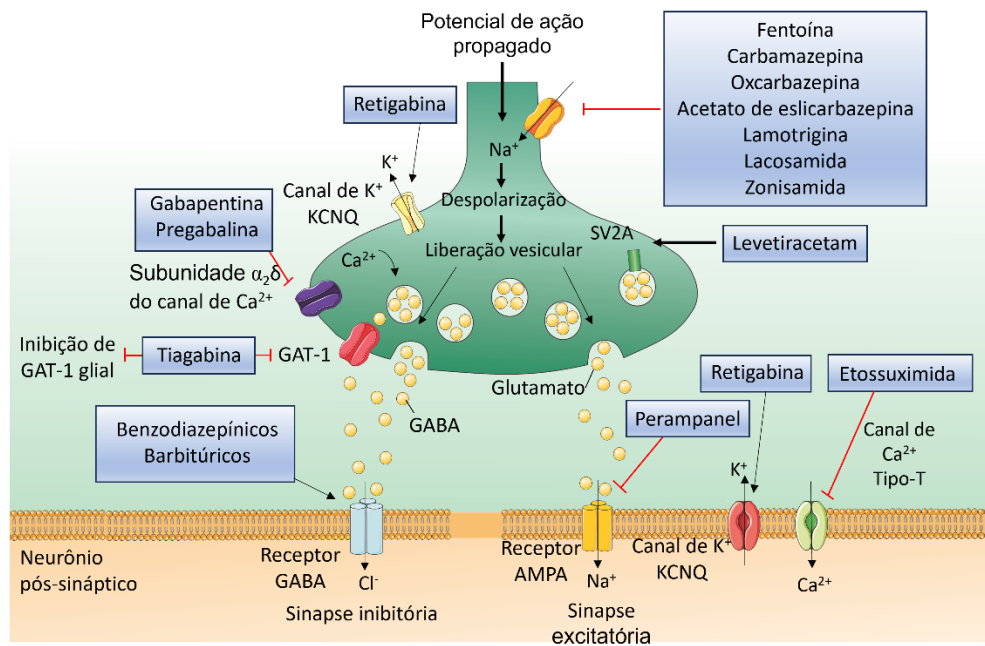


Figura 1: Classificação das síndromes epiléticas de acordo com a ILAE (*International League Against Epilepsy*). Esquema da avaliação do diagnóstico de uma crise epilética, seguindo-se o diagnóstico de um tipo de epilepsia e, se possível, de uma síndrome epilética associada. Após o diagnóstico de uma crise epilética, a etiologia pode ser identificada, relacionando-a às comorbidades associadas. Classificação de crises epiléticas de acordo com o tipo de epilepsia. Adaptado de Riney, Bogacz et al. 2022.

Neste contexto de classificações, é importante diferenciar epilepsia e crise epilética, interrelacionando-as. Uma crise epilética é caracterizada por uma descarga anormal de neurônios sincronizados em uma porção localizada ou generalizada do cérebro. As crises agudas provocadas são aquelas que ocorrem no contexto de uma lesão cerebral aguda ou distúrbio sistêmico, como traumatismo craniano, acidente vascular cerebral ou condição metabólica específica (Bertram 2009). Por outro lado, uma crise epilética não provocada ocorre na ausência de um evento agudo. A epilepsia, por sua vez, é diagnosticada quando ocorrem pelo menos duas crises epiléticas não provocadas separadas por um período mínimo de 24 horas (French, M et al. 2014). Não há um teste único ou biomarcador que diagnostique, de forma conclusiva, um indivíduo com epilepsia. Diferentes conjuntos de biomarcadores podem ser necessários, dependendo dos estágios e da etiologia da epileptogênese (Engel, Pitkänen et al. 2013). Adicionalmente às suas características patológicas intrínsecas, a epilepsia está frequentemente associada a outras condições, como deficiência intelectual, distúrbios de aprendizagem, transtorno de déficit de atenção e hiperatividade, autismo, depressão, ansiedade, osteoporose, distúrbios do sono e obesidade (Tellez-Zenteno, Patten et al. 2007).

Assim, a classificação das epilepsias e o entendimento de suas comorbidades relacionadas se tornam pontos de partida imprescindíveis para o desenvolvimento de métodos de diagnóstico e ferramentas adequadas de tratamento, sendo essas informações também importantes na caracterização de possíveis perfis epidemiológicos. A classificação baseada no tipo de epilepsia permite identificar, então, os tipos mais prováveis de etiologia ou síndrome, e direcionar as investigações para cada caso (Beghi, Carpio et al. 2010, Thurman, Beghi et al. 2011, Riney, Bogacz et al. 2022).

Na epilepsia, a atividade epileptogênica recorrente se apresenta como crises intermitentes resultantes de uma hiperexcitabilidade excessiva em circuitos corticais ou límbicos. Essa condição pode ocorrer em epilepsias de início focal, onde os distúrbios são localizados, ou em epilepsias generalizadas, onde os problemas se estendem por redes mais difusas. Quatro classes amplas de ação dos medicamentos antiepiléticos são descritas: moléculas que atuam na modulação de canais iônicos dependentes de voltagem; na intensificação da neurotransmissão inibitória mediada por GABA; na atenuação da neurotransmissão excitatória mediada por glutamato; e na modulação da liberação do neurotransmissor via ação pré-sináptica (Figura 2) (Sankaraneni and Lachhwani 2015).



Não ilustrado:

- Vigabatrina: ↓ Degradação de GABA

Fármacos com múltiplos mecanismos:

- Valproato: ↑ entrega de Gaba, ↓ canais de Na⁺, ↓ receptores NMDA
- Topiramato: ↓ canais de Na⁺, ↓ receptores AMPA/Kainato, ↑ receptores GABA_A
- Felbamato: ↓ canais de Na⁺, ↑ receptores GABA_A, ↓ receptores NMDA

Figura 2: Mecanismos dos fármacos antiepilépticos na fenda sináptica. AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico); GABA (ácido γ aminobutírico); GAT-1 (transportador GABA 1 sódio e cloro dependente); SV2A (glicoproteína 2A da vesícula sináptica) (adaptado de Shih, Tatum et al. 2013).

Em relação às ferramentas baseadas na farmacoterapia para epilepsias, medicamentos que se mostram eficazes para uma forma de epilepsia podem ser ineficazes ou até mesmo exacerbar o quadro clínico de outras. Por exemplo, embora os agentes dos canais de sódio sejam frequentemente úteis para epilepsias focais, eles exacerbam a síndrome de Dravet e muitos tipos de epilepsias genéticas generalizadas (Mei, Cetica et al. 2019).

Isso reforça a busca por um melhor entendimento do tipo de epilepsia para então uma aplicação de terapias específicas baseando-se nas etiologias específicas, objetivando a diminuição da politerapia hoje observada (Sankaraneni and Lachhwani 2015).

I.2 Epileptogênese - o papel da amígdala e do hipocampo

A epileptogênese é o processo por meio do qual uma rede neuronal é alterada, tornando-se hiperexcitável e propensa a crises epilépticas recorrentes não provocadas. Isso pode ocorrer em qualquer momento da vida de um indivíduo. A origem das crises e da eventual cronicidade da condição patológica pode ser genética ou externa. Além disso, a vulnerabilidade às crises

também pode ser influenciada pelos substratos neurais das redes envolvidas, sendo estes diferentes entre os sexos (Di Maio 2014, Savic and Engel 2014, Reddy, Thompson et al. 2021). Os hormônios esteróides, por exemplo, atuam como moduladores importantes da fisiologia cerebral em adultos e o início das crises é influenciado pelos níveis de hormônios circulantes, sendo um fator importante na epileptogênese (Taubøll, Sveberg et al. 2015).

Estruturas do lobo temporal, citando especialmente o hipocampo, a amígdala e o córtex piriforme, são as mais suscetíveis a insultos cerebrais desencadeadores de crises epiléticas e da epileptogênese (Aroniadou-Anderjaska, Fritsch et al. 2008). A epilepsia do lobo temporal (ELT) é a forma mais comum de epilepsia, sendo caracterizada por crises focais espontâneas originárias do sistema límbico. Variações na conectividade cerebral também existem abundantemente dentro do sistema límbico e são, portanto, relevantes para a ELT (Englot and Blumenfeld 2009, Savic and Engel 2014).

O lobo temporal, especialmente suas estruturas mediais, tem sido alvo de interesse no estudo da epilepsia desde as primeiras descrições de anormalidades do hipocampo no século XIX (Bertram 2009). A remoção cirúrgica dessas estruturas resultou no controle das crises epiléticas, evidenciando seu importante papel nas crises (Chatzikonstantinou 2014). Estudos de *Kindling*, nos quais estímulos elétricos abaixo do limiar para crises epiléticas são aplicados repetidamente nessas regiões cerebrais, confirmaram predisposição em desencadear crises epiléticas por meio desse circuito neural, fortalecendo a sua relevância para o início das crises (Samba Reddy and Ramanathan 2012).

A esclerose do hipocampo (EH) está particularmente associada à síndrome da epilepsia do lobo temporal, mas pode ser observada em outras síndromes epiléticas. A sua incidência é identificada entre aproximadamente 30% e 45% de todas as síndromes epiléticas, sendo possível inferir que a condição patológica associada à epilepsia límbica se estende para outras regiões límbicas (Thom 2014). O papel do hipocampo como uma região crucial no desenvolvimento da epilepsia foi comprovado, uma vez que pacientes com epilepsia frequentemente apresentam danos ou anormalidades nessa região, embora a zona geradora das crises epiléticas possa se estender para regiões além do hipocampo (Chatzikonstantinou 2014).

A amígdala, por sua vez, tem recebido muito menos atenção, apesar das evidências de que seu papel na epilepsia seja tão importante quanto o do hipocampo. A amígdala é bem reconhecida por seu papel central no comportamento emocional, bem como na modulação da cognição e funções executivas (Fanselow and Gale 2003, Aroniadou-Anderjaska, Fritsch et al. 2008). Na

ELT, além do dano no hipocampo, a condição neuropatológica ativa também está presente na amígdala em uma subpopulação significativa de pacientes (Saukkonen, Kälviäinen et al. 1994). Evidências adicionais para um papel central da amígdala na geração e disseminação da atividade epileptogênica vêm de estudos sobre os mecanismos por meio dos quais os agentes neurotóxicos induzem crises epiléticas cerebrais, sugerindo um envolvimento precoce da amígdala no desenvolvimento de crises epiléticas induzidas (Aroniadou-Anderjaska, Fritsch et al. 2008).

O núcleo basolateral da amígdala (NBA) é o núcleo mais importante na ocorrência e propagação das crises epiléticas. Mesmo em modelos animais onde as crises epiléticas são provocadas fora da amígdala, a ativação do NBA é a principal responsável pela ocorrência do SE (Kim, Lee et al. 2001). Além disso, a estimulação elétrica prolongada desencadeia SE mais prontamente quando a estimulação é aplicada ao NBA do que para a amígdala central e medial, ou para o adjacente córtex piriforme (Mohapel, Dufresne et al. 1996). Assim, tanto os achados clínicos quanto os estudos em animais indicam que a amígdala desempenha um papel proeminente na patogênese e no conjunto de sintomas da epilepsia (Aroniadou-Anderjaska, Fritsch et al. 2008).

I.3 Alterações comportamentais relacionadas às epilepsias

Os pacientes com epilepsia podem ser acometidos também por comorbidades que acentuam significativamente o impacto deletério das crises epiléticas. Existem inúmeras comorbidades, mas as mais significativas são as desordens neuropsiquiátricas como depressão, ansiedade e transtorno bipolar – a depressão é a mais frequente, principalmente entre pacientes com epilepsia refratária ao tratamento medicamentoso. Estima-se que aproximadamente 40% dos pacientes com epilepsia sofram de transtorno depressivo, sendo este não apenas causada pelo estigma e dificuldades referentes à epilepsia, mas também derivado das alterações neurais decorrentes da condição primária (Briellmann, Hopwood et al. 2007, Kanner 2011, Kanner, Schachter et al. 2012, Rocha, Alonso-Vanegas et al. 2014, Castro, Medeiros et al. 2017, Conway, Udaiyar et al. 2018). Isso é endossado pelo fato de que tanto a epilepsia quanto os transtornos neuropsiquiátricos citados acima são manifestações diferentes dos mesmos substratos moleculares, em especial aqueles referentes à região mesolímbica que atuam no campo de recompensa, motivação e adição (Nestler and Carlezon 2006, Rocha, Alonso-Vanegas et al. 2014). Tanto a epilepsia quanto os transtornos neuropsiquiátricos associados são quadros patológicos complexos, caracterizados inclusive por alterações em neurotransmissões inibitórias e excitatórias, entre elas a dopaminérgica (Werner and Coveñas 2017).

Várias observações experimentais e clínicas foram associadas à neurotransmissão dopaminérgica, tais como o controle da locomoção, a atividade em processos cognitivos incluindo atenção e memória, a secreção neuroendócrina (prolactina) e o controle de comportamentos motivacionais, como emoção, afeto e atividade em circuitos de recompensa (Carlsson 1987, Greengard 2001). Perturbações na homeostase do sistema dopaminérgico no cérebro são conhecidas por acarretarem diferentes processos patológicos do SNC, como doença de Parkinson, esquizofrenia e várias alterações neuropsiquiátricas (Benturquia, Courtin et al. 2008, Sarkar, Basu et al. 2010).

I.4 Dopamina e neurotransmissão dopaminérgica

A dopamina (3,4-dihidroxi-fenil-etilamina) pertence ao grupo dos neurotransmissores denominados catecolaminas. Sua biossíntese (Figura 3) ocorre no citoplasma dos neurônios dopaminérgicos, baseando-se em duas reações enzimáticas consecutivas. Na primeira etapa, a tirosina é hidroxilada na posição 3' do anel aromático para formar L-DOPA (3,4-dihidroxi-L-fenilalanina), em uma reação catalisada por tirosina hidroxilase (TH). Na segunda etapa, L-DOPA é descarboxilada pela enzima DOPA-descarboxilase (DCAA ou DDC), originando a dopamina.

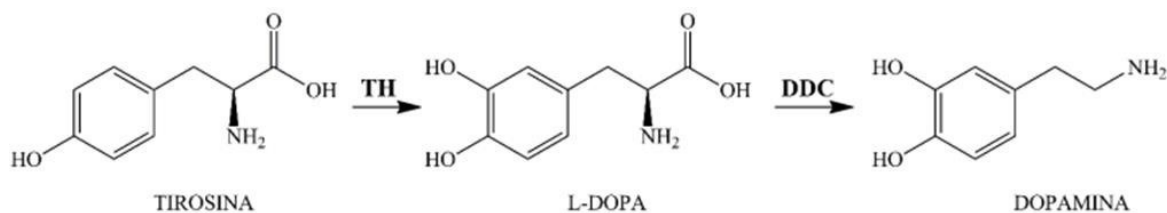


Figura 3. Imagem esquemática representando a biossíntese da dopamina. TH (tirosina hidroxilase) e DDC (ou DCAA, DOPA-descarboxilase).

Uma vez formada, a dopamina é transportada para a vesícula sináptica com a ajuda da proteína VMAT2 (proteína transportadora de monoamina vesicular). Após o estímulo, as vesículas se fundem à membrana pré-sináptica e então liberam seu conteúdo na fenda (Meiser, Weindl et al. 2013) (Figura 4). No citosol dos neurônios dopaminérgicos, a dopamina pode ser metabolizada pela monoamina oxidase (MAO) em neurônios pré- e pós-sinápticos, formando então um derivado aldeído inativo por desaminação oxidativa que posteriormente é metabolizado pela aldeído desidrogenase, dando origem ao ácido 3,4- dihidroxifenilacético (DOPAC). O DOPAC,

por sua vez, pode ser metabolizado pela COMT (catecol-O-metiltransferase), formando o ácido homovanílico (HVA).

Sabe-se que diferentes receptores de dopamina são capazes de ativar diferentes vias de sinalização. Além disso, o tipo de célula ativada, a região do SNC, o estado fisiológico e a comunicação das diversas proteínas, enzimas e receptores devem ser considerados em função dos efeitos decorrentes da cascata de sinalização ativada por dopamina, pois diferentes respostas fisiológicas podem ser observadas. Os receptores de dopamina pertencem à família de receptores acoplados à proteína G (RAPG) com sete domínios transmembrana. A ativação ou inibição da via do monofosfato de adenosina cíclica (AMPc) e a modulação da sinalização de cálcio (Ca^{2+}) são os efeitos mediados por receptores de dopamina mais bem descritos na literatura (Missale, Nash et al. 1998).

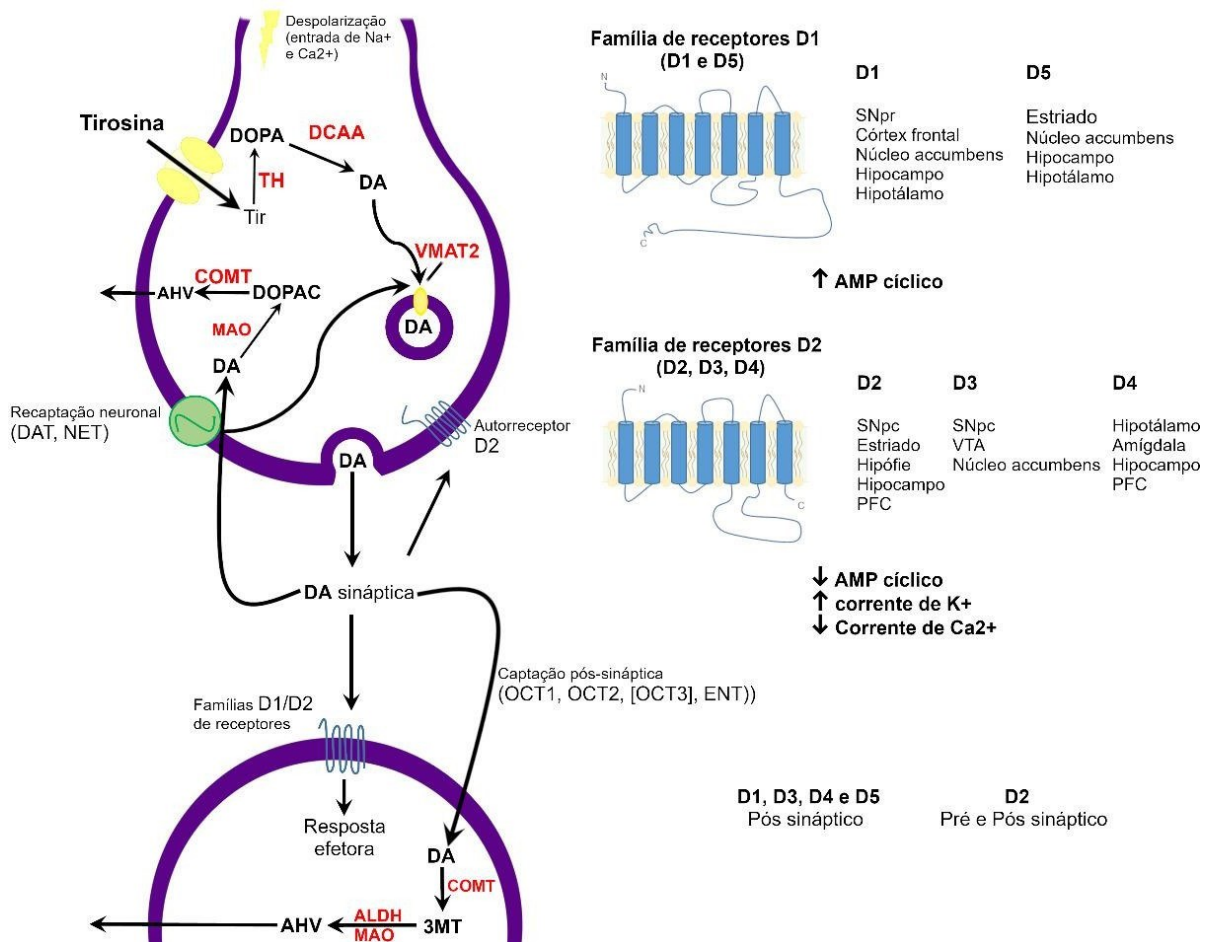


Figura 4. Representação esquemática do metabolismo da dopamina, distribuição e caracterização dos receptores de DA no SNC. Dopamina (DA) é sintetizada a partir da tirosina (Tir) pela ação de duas enzimas, tirosina hidroxilase (TH) formando L-DOPA e DOPA-descarboxilase (DCAA) formando DA. Dopamina então é armazenada em vesículas sinápticas com o auxílio da Proteína transportadora de monoamina vesicular (VMAT2). Uma vez liberada na fenda sináptica, DA interage com receptores da família D1/D2 pós-sinápticos e com autoreceptor D2. Além disso, DA pode ser recaptada pelos transportadores de DA (DAT) e noradrenalina (NET) ou removida por recaptação pós-sináptica por transportadores de cátions orgânicos (OCT1, OCT2, OCT3). DA presente no citosol pode ser degradada pela catecol-O-metiltransferase (COMT) formando 3- metoxitiramina (3MT), que posteriormente pode ser metabolizada pela monoaminoxidase (MAO) ou aldeído desidrogenase (ALDH) formando ácido homovanílico (AHV). Existem duas famílias dos receptores dopaminérgicos (tipo D1 e tipo D2 - RD1 e RD2) que são distribuídos de formas diferentes no cérebro; Substância negra parte reticulada (SNpr); Substância negra porção compacta (SNpc); Córtex pré-frontal (PFC); Área tegmental ventral (VTA) (imagem autoral).

Existem cinco tipos de receptores de dopamina descritos na literatura: D₁, D₂, D₃, D₄ e D₅, que são divididos em duas subfamílias de acordo com a homologia de sequência, farmacologia e ativação de segundos mensageiros: receptores semelhantes a D₁ e semelhantes a D₂ – RD1 e RD2 (Baik 2013). Os receptores D₁ e D₅ enquadram-se na classificação RD1 e a nomenclatura RD2 engloba os receptores D₂, D₃ e D₄. Ambos os tipos de subfamílias são metabotrópicos, levando à formação de segundos mensageiros que podem ativar ou inibir vias de sinalização específicas dentro das células (Beaulieu, Espinoza et al. 2015).

Estudos demonstraram que os RD2 são abundantemente expressos em muitas regiões do cérebro, como córtex frontal, bulbos olfativos, núcleo accumbens, hipocampo e amígdala (Stevens 1999, Zhao, Cheng et al. 2022). Os receptores de dopamina D₂ e D₃ também são expressos na substância negra porção compacta e na área tegmental ventral (ATV), as principais regiões anatômicas nas quais as fibras dopaminérgicas se originam (Missale, Nash et al. 1998).

Os RD1 são expressos no estriado, córtex frontal, núcleo accumbens, substância negra e amígdala, sendo de localização pós-sináptica. Eles desencadeiam a ativação da via de sinalização PKA-AMPC, e os RD2 são acoplados à proteína Gi, que inibe a produção de AMPC, podendo atuar em diferentes vias de sinalização por meio da ativação ou inibição (Bozzi and Borrelli 2013). Além disso, receptores de dopamina também podem ativar outras vias de sinalização como, por exemplo, receptores D₅ e heterodímeros D₁-D₂ que podem ativar a via de fosfolipase C (PLC), pois são acoplados à proteína G (Beaulieu and Gainetdinov 2011). No entanto, o mecanismo exato desta interação e sua regulação ainda não são completamente conhecidos (Sahu, Tyeryar et al. 2009). Sendo assim, a resposta celular exercida pela dopamina

depende de inúmeros fatores como, por exemplo, os receptores ativados nas células-alvo, o segundo mensageiro ativado e a ativação ou não de canais iônicos presentes na membrana pós-sináptica (Figura 5) (Beaulieu and Gainetdinov 2011).

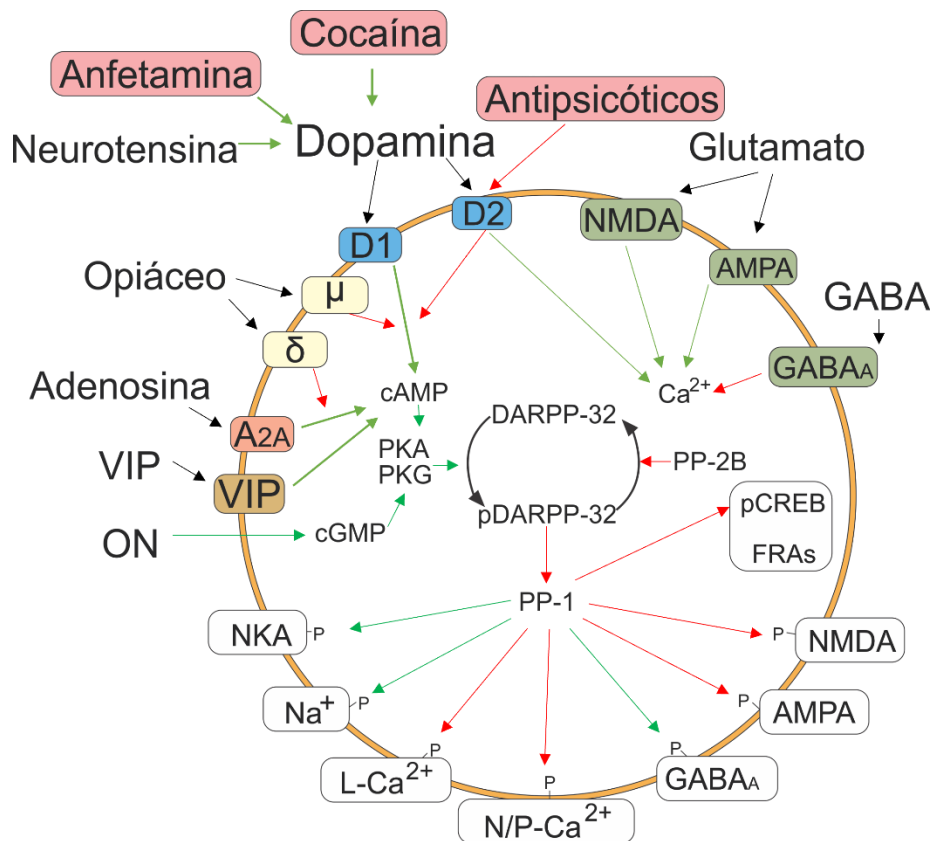


Figura 5. Representação esquemática da cascata de sinalização do sistema dopaminérgico (Adaptada de Greengard, 2001). A ativação da neurotransmissão dopaminérgica por cocaína e anfetamina ocorre via receptores tipo D1, que leva à fosforilação da fosfoproteína regulada por AMPc e dopamina (DARPP-32) pela cascata de sinalização envolvendo adenosina monofosfato cíclico (cAMP) e proteína quinase A (PKA). A ativação dos receptores do tipo D2 por antipsicóticos leva à desfosforilação de DARPP-32 por dois mecanismos diferentes – a partir da diminuição de cAMP e por meio do aumento intracelular de cálcio (Ca²⁺), que ativa uma proteína fosfatase dependente de Ca²⁺ (PP-2B), desfosforilando DARPP-32. Além disso, outras moléculas também são capazes de alterar o estado de fosforilação de DARPP-32 como mostrado na imagem. N-metil D- Aspartato (NMDA); alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA); ácido gama-aminobutírico (GABA); peptídeo intestinal vasoativo (VIP); óxido nítrico (ON); canais de cálcio do tipo L e N/P (L-Ca²⁺, N/Ca²⁺); bomba de Na⁺/K⁺- ATPase (NKA); Monofosfato cíclico de guanosina (cGMP); proteína de ligação responsiva ao AMPc (CREB); colecistocinina (CCK); Receptores opioides (δ e μ).

Como citado anteriormente, a dopamina possui atividade excitatória ou inibitória a depender do subtipo de receptor ativado por sua ligação. Há quatro principais vias dopaminérgicas capazes de regular diferentes funções fisiológicas: (i) a via mesolímbica, que está associada à recompensa, aos comportamentos de aprendizados e à memória; (ii) a via mesocortical, por sua vez, está relacionada a aspectos da cognição, motivação, recompensa e emoção; (iii) a via nigroestriatal relaciona-se à atividade motora; e, finalmente, (iv) a via tuberoinfundibular, que está relacionada à secreção de prolactina (Bozzi and Borrelli 2013) (Figura 6). A desregulação em algumas delas está ligada a diversos distúrbios patológicos como a doença de Parkinson, depressão, transtorno bipolar, distúrbio de hiperatividade e déficit de atenção, e dependência e uso abusivo de drogas (Bromberg-Martin, Matsumoto et al. 2010).

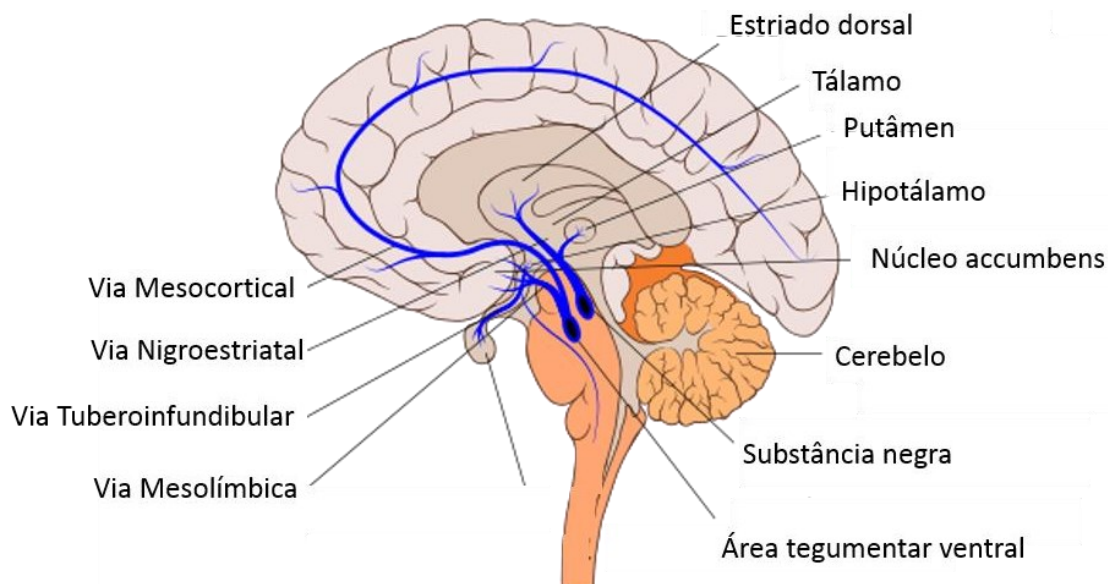


Figura 6. Representação esquemática das principais vias dopaminérgicas no cérebro: mesolímbica, mesocortical, nigroestriatal e tuberoinfundibular. (Adaptada de The main dopaminergic pathways of the human brain, (https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Dopaminergic_pathways.svg))

Uma vez que a dopamina é uma amina biogênica (ou monoamina), possuindo atividade excitatória ou inibitória a depender do subtipo de receptor ativado por sua ligação, o interesse pela caracterização da possível interrelação dos fenômenos relacionados à epilepsia e à neurotransmissão dopaminérgica é esperado. Há relatos na literatura de que a ativação de diferentes subtipos de receptores de dopamina possui papéis diferentes no início e na propagação das crises epiléticas (Starr 1996).

Estudos mostraram que a dopamina exerce um efeito modulador nas crises epiléticas e pode estar relacionada a sintomas da depressão, como anedonia e falta de motivação (Starr 1996, Wise 2004, Eshel, Tian et al. 2016, Werner and Coveñas 2017). A modulação do sistema dopaminérgico pode afetar a excitabilidade neuronal de maneira bidirecional, aumentando a excitação por meio da ativação do receptor D₁ e tendo efeitos anticonvulsivantes a partir da ativação do receptor D₂ (Clinckers, Smolders et al. 2004, Bozzi and Borrelli 2013). Sendo assim, a epilepsia pode ser acompanhada não só do comprometimento no controle do nível de dopamina, mas também da expressão de cada tipo dos seus receptores relacionados (Rocha, Alonso-Vanegas et al. 2014).

Muitos estudos em modelos animais mostraram as ações opostas da sinalização de RD1 e RD2 na epileptogênese límbica. A sinalização de RD1 é geralmente pró-epileptogênica, enquanto a sinalização desencadeada por RD2 promove efeito antiepileptogênico – neste último caso, a dopamina tem efeito inibitório sobre a excitabilidade dos neurônios do hipocampo por meio de RD2 (Bozzi and Borrelli 2006).

Substâncias que estimulam o sistema dopaminérgico, como L-DOPA, fármacos antiparkinsonianas e anfetaminas, têm efeitos antiepiléticos e anticonvulsivantes (Xiong, Lim et al. 2019). Em pacientes epiléticos, os fármacos agonistas de RD2 aumentam o limiar para as crises epiléticas e, por outro lado, a ativação de receptores RD1 da dopamina exerce um efeito pró-convulsivo e diminui o limiar para as crises epiléticas (Starr 1996).

A maioria dos modelos animais de epilepsia do lobo temporal é acompanhada por um aumento na taxa de disparo de neurônios dopaminérgicos e no nível de dopamina no espaço extracelular (Cifelli and Grace 2012). O papel da dopamina na epilepsia também depende das regiões cerebrais envolvidas na geração e controle das crises. Por exemplo, o hipocampo é uma das regiões envolvidas na epilepsia do lobo temporal. Nesta região, a concentração de receptores de RD2 (especialmente D₄) é maior do que RD1 (Bozzi and Borrelli 2006) e, durante a crise epilética, a quantidade de dopamina aumenta. Portanto, a dopamina pode inibir a atividade epileptogênica por meio da ativação de receptores de RD2 do hipocampo. Outra região do hipocampo que está envolvida no processo epilético é o giro denteado. De acordo com a teoria do 'portão' denteado da epilepsia do lobo temporal, as crises epiléticas ocorrem quando a função do portão do giro denteado é interrompida de tal forma que o excesso de excitação aparece ou passa através do giro denteado para regiões a jusante (Behr, Gloveli et al. 2000).

Nesta região, semelhante ao hipocampo, os RD2 desempenham um papel anti-epileptogênico (Barone, Palma et al. 1991).

Portanto, considerando-se os trabalhos que evidenciam o papel da neurotransmissão dopaminérgica na regulação da excitabilidade cerebral, substâncias relacionadas à modulação da produção, liberação e atividade de neurotransmissores como a dopamina tornam-se ferramentas úteis na elucidação de mecanismos relacionados às epilepsias e suas comorbidades neuropsiquiátricas (Starr 1996, Akyuz, Polat et al. 2021).

I.5 Modelos animais de Epilepsias

Atualmente, existem vários modelos animais disponíveis para investigar os diferentes aspectos da doença. Alguns desses modelos incluem o uso de substâncias quimioconvulsivantes, como o ácido caínico (KA) e a pilocarpina, estimulação elétrica e modelos genéticos como WAG.Rij, GAERS, GPERs e WARs (Grone and Baraban 2015, Löscher 2017, Becker 2018). Alguns destes modelos são mais amplamente utilizados que outros em função dos seus altos níveis de semelhança às epilepsias humanas.

O ácido caínico (KA), um análogo funcional do L-glutamato (Glu) e agonista dos receptores ionotrópicos de Glu, é extraído de uma alga vermelha (*Digenea simplex*), sendo considerado um dos primeiros compostos utilizados para o estudo das ELT (Rusina, Bernard et al. 2021). A administração de ácido caínico provoca uma sequência de eventos bioquímicos que culminam em uma despolarização neuronal excessiva e, conseqüentemente, crises epilépticas (Rusina, Bernard et al. 2021). Sua aplicação no estudo das epilepsias ocorreu pela primeira vez por meio dos trabalhos de Ben-Ari e colaboradores, que mostraram que a injeção intra-amidalar de KA é capaz de induzir crises epilépticas, além de produzir lesão neurológica semelhante àquelas que ocorrem em pacientes com ELT (Ben-Ari, Tremblay et al. 1980). Além disso, o uso de KA também levou à melhor compreensão de vários distúrbios neurodegenerativos, como doença de Parkinson, doença de Huntington, doença de Alzheimer, esclerose lateral amiotrófica e esclerose múltipla (Coyle and Puttfarcken 1993, Wang, Yu et al. 2005, Lévesque and Avoli 2013).

Outro quimioconvulsivante utilizado é pilocarpina. Trata-se de um alcaloide extraído das folhas do jaborandi (*Pilocarpus jaborandi*) e atua como agonista colinérgico muscarínico dos receptores M1 e M2 (Cifelli and Grace 2012, Lévesque, Biagini et al. 2021). Os receptores colinérgicos são divididos em dois grupos: o grupo I, que inclui os receptores M1, M3 e M5, acoplados à proteína $G_{q/11}$, e o Grupo II, que inclui os receptores M2 e M4, acoplados à proteína

G_i/o . Quando a pilocarpina se liga ao receptor M2, ocorre a inibição da adenilato ciclase, levando-se à diminuição do segundo mensageiro AMPc, podendo também ativar canais de potássio K^+ (Cavalheiro, Santos et al. 1996). Já quando se liga ao receptor M1, a pilocarpina ativa a fosfolipase C, resultando na produção de diacilglicerol (DG) e inositol trifosfato (IP_3). Isso pode levar à ativação de canais de cálcio (Ca^{2+}) e ao aumento da concentração do intracelular do mesmo íon metálico. A alta concentração de Ca^{2+} aumenta a excitabilidade celular e permite a liberação de glutamato, que poderá induzir o SE (Barone, Palma et al. 1992, Scorza, Arida et al. 2009).

Além dos modelos que utilizam os quimioconvulsivantes, os modelos genéticos merecem destaque. Os *WAR* (*Wistar audiogenic rats*) constituem um modelo genético de epilepsia selecionado a partir do endocruzamento de ratos *Wistar* suscetíveis a crises induzidas por som de alta intensidade (Garcia-Cairasco, Umeoka et al. 2017). Quando submetidos ao estímulo sonoro (110 a 120 dB), esses animais apresentam manifestações de crises epiléticas, saltam, correm ou apresentam crises tônico-clônicas generalizadas. A primeira região do cérebro a ser recrutada é o colículo inferior e, após estímulos sucessivos e recorrentes, outras áreas do cérebro são acionadas, como por exemplo hipocampo e amígdala (Garcia-Cairasco, Reis et al. 1994, Doretto, Fonseca et al. 2003).

O nosso grupo de pesquisa e seus colaboradores têm utilizado, para estudos diversos desde o ano 2000, a colônia *WAR* estabelecida no Departamento de Fisiologia e Fisiologia. Em 2002, Beraldo, Vieira e colaboradores buscaram investigar as atividades anticonvulsivantes de um candidato a fármaco anticonvulsivante, benzaldeído semilcarbazona (BS), e de seu composto de inclusão em hidroxipropil-beta-ciclodextrina (BS/HP- β -CD) no modelo *WAR*. Observou-se que, 30 min após a administração intraperitoneal de BS, houve a inibição de 33%, 50% e 83% do comportamento tônico das crises epiléticas observadas em *WAR* tratados com 50, 75 e 100 $mg.kg^{-1}$, respectivamente. Animais *WAR* tratados com o BS/HP- β -CD na dose de 100 $mg.kg^{-1}$ apresentaram o bloqueio completo das crises epiléticas, apresentando também alterações comportamentais, como diminuição da atividade motora e baixa responsividade aos estímulos ambientais. Utilizando a dose ip de 35 $mg.kg^{-1}$ de BS/HP- β -CD, houve também 100% de bloqueio do comportamento tônico de convulsões, sem a ocorrência dos efeitos comportamentais indesejáveis anteriormente descritos (Beraldo, Sinisterra et al. 2002).

Em 2017, Parreira e colaboradores avaliaram a atividade Na^+,K^+ -ATPase, Ca^{2+} -ATPase, Mg^{2+} -ATPase, a composição dos lipídios de membrana e marcadores de estresse oxidativo em geral

no modelo *WAR*. Além disso, avaliou-se também a expressão das isoformas α_1 e α_3 da Na^+, K^+ -ATPase no prosencéfalo e no tronco encefálico dos animais. Observou-se aumento da atividade da Na^+, K^+ -ATPase no prosencéfalo de *WAR* quando comparados aos animais do grupo controle, havendo também um aumento nos marcadores de estresse oxidativo – peroxidação lipídica, glutathiona peroxidase e superóxido dismutase – no tronco encefálico dos animais do modelo audiogênico. A atividade Ca^{2+} -ATPase, Mg^{2+} -ATPase, composição dos lipídios de membrana e expressão das isoformas α_1 e α_3 da Na^+, K^+ -ATPase não foram alterados nas regiões avaliadas pelo estudo (Parreira, Resende et al. 2018).

Em 2017, Castro, Guarnieri e colaboradores conduziram uma investigação comportamental em animais *WAR* para analisar as comorbidades associadas à epilepsia. Os animais foram então submetidos a vários protocolos experimentais comportamentais, incluindo o teste de nado forçado (*NF*), teste de campo aberto (*TCA*), teste de preferência por sacarose (*TPS*), labirinto em cruz elevado (*LCE*), preferência social (*PS*), teste de enterrar esferas (*TEE*), esQUIVA inibitória (*EI*) e esQUIVA ativa (*EA*). Esses testes foram escolhidos para investigar a relação entre os circuitos subjacentes influenciam a suscetibilidade inata dos *WAR* a crises epilépticas e os substratos neurobiológicos associados ao desempenho dos testes. Os resultados indicaram que os *WAR* apresentam traços comportamentais de aversividade, mas não apresentam comportamento anedônico ou prejuízo social. Além disso, os testes sugeriram que os *WAR* têm dificuldade em avaliar adequadamente os graus de aversividade dos estímulos com os quais são confrontados (Castro, Medeiros et al. 2017).

O uso de modelos experimentais de Epilepsia como os *WAR* é essencial para o avanço do conhecimento relacionado às epilepsias e às diversas condições patológicas do SNC. Paralelamente, o aprimoramento desse conhecimento contribui para o estabelecimento de novas estratégias terapêuticas mais seguras e eficazes, inclusive para os casos de epilepsias refratárias à farmacoterapia, que compreendem cerca de 30% dos casos (WHO, 2019). Simultaneamente, estudos a respeito do reposicionamento de fármacos já aprovados e utilizados na clínica e que poderiam ser utilizados na terapêutica de diversas doenças, inclusive epilepsias, são estratégias crescentes e estimulantes e que podem se utilizar dos modelos animais estabelecidos para a busca por novas estratégias farmacoterapêuticas (Willuhn, Burgeno et al. 2014, Brueggeman, Sturgeon et al. 2019).

Nesse contexto, o presente projeto propõe investigar a expressão de RD1 e RD2 em animais *Wistar* e *WAR*, estendendo essa investigação aos efeitos de moduladores da neurotransmissão dopaminérgica no comportamento dos animais.

Justificativa

Como citado anteriormente, papéis neuromoduladores opostos dos RD1 e RD2 nas convulsões são descritos na literatura (Starr 1996, Wise 2004, Eshel, Tian et al. 2016, Werner and Coveñas 2017). No entanto, de acordo com o nosso conhecimento, estudos que descrevem o papel da dopamina na modulação das convulsões e nas comorbidades observadas em pacientes epilépticos não foram descritos na literatura. Assim, o presente trabalho tem como hipótese a inter-relação entre a sinalização dopaminérgica, a epileptogênese e suas comorbidades relacionadas em modelos experimentais animais, em especial o *WAR*.

Objetivo geral

Avaliar a modulação do sistema dopaminérgico em *WAR* por meio da administração intramigdalár de agonista do receptor D₁ (SKF-38393) e do agonista do receptor D₂ (Quimpirole) e seus efeitos em crises epilépticas e no comportamento dos animais.

Objetivos específicos

Considerando grupos experimentais controle e tratados com as substâncias acima citadas, avaliar:

- a atividade locomotora e exploratória espontâneas por meio do teste de campo aberto em animais *WAR* e *Wistar*;
- o comportamento de anedonia e resposta de animais *WAR* e *Wistar* frente à situação de estresse por meio do teste de preferência por sacarose;
- o comportamento do tipo ansioso em animais *WAR* e *Wistar* por meio do teste do labirinto em cruz elevado;
- a expressão de receptores D1 e D2 em frações de hipocampo, córtex pré-frontal e estriado de animais *WAR* e *Wistar* por *western blot*;
- a expressão de receptores D1 em frações de hipocampo, córtex pré-frontal, estriado e amígdala de animais *WAR* e *Wistar* por imunistoquímica;
- a expressão de receptores D2 em frações de hipocampo, córtex pré-frontal, estriado e amígdala de animais *WAR* e *Wistar* por imunofluorescência;
- a variação do índice de gravidade comportamental após os tratamentos com as substâncias ativas em animais *WAR* e *Wistar*;

- o comportamento do tipo ansioso por meio do teste do labirinto em cruz elevado após os tratamentos com as substâncias ativas em animais *WAR* e *Wistar*;

II) Material e métodos

II.1 Substâncias

Todos os reagentes para ensaios bioquímicos foram adquiridos comercialmente, em grau analítico, sendo deacritos a seguir: solução salina 0,9%; SKF-38393 (40 pmol/ μ L, Sigma); Quimpirole (40 pmol/ μ L, Sigma); isoflurano 5%; isofluorano a 2%; cloridrato de lidocaína; hemitartrato de epinefrina 2,0% (1:200.000 em epinefrina); peróxido de hidrogênio; cimento de zinco dental; álcool 70%; sacarose (Synth); tampão de preparação RIPA (Millipore-20-188); coquetel de inibidores de protease (Sigma, cód. S8820); albumina sérica bovina (BSA, Sigma); azul de bromofenol; 2-mercaptoetanol; glicerol; SDS(Bio-Rad); solução acrilamida/bisacrilamida (Bio-Rad); glicina; metanol (dinâmica); vermelho Ponceau Xilidina (Bio-Rad); leite desnatado; tris-base (Bio-Rad); tween (AMRESCO); anticorpo primário D₁ Dopamine Receptor (Boster Immunoleader-Cód. PB9177) e D₂ Dopamine Receptor (Boster Immunoleader-Cód. PA2234); cetamina (80 mg.kg⁻¹); xilazina (10 mg.kg⁻¹); fosfato dissodico (Synth); fosfato de potássio monobásico (Synth); cloreto de sódio (Synth); cloreto de potássio (Synth); paraformaldeído;; polivinilpirrolidona PVP 1%; etileno glicol 30%; Triton- X 0,3% (usb); soro normal de cabra 5%; Alexa Fluor 488® (Molecular Probes®); Alexa Fluor 647® (Molecular Probes®); diaminobenzidina 0.2 mg.ml⁻¹; vermelho neutro 1%; acetato de sódio anidro 0,3%; ácido acético glacial 0,12%.

II.2 Animais

No presente trabalho, foram utilizados ratos *WAR* machos obtidos de uma colônia endogâmica mantida no Departamento de Fisiologia e Biofísica e ratos *Wistar* machos obtidos do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) (Castro, Medeiros et al. 2017) com idade de 50-55 dias e pesando entre 250 – 300 gramas, mantidos sob temperatura ambiente de 22 ± 1 °C, com ciclo claro-escuro de 12 horas e livre acesso a água e comida, acomodando-se quatro animais por caixa. Os experimentos realizados neste projeto seguiram as normas dos Princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. O projeto foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – CEUA – UFMG, protocolo n° 233/2019.

A susceptibilidade audiogênica de animais *WAR* foi confirmada por triagem, na qual os animais foram submetidos a um estímulo sonoro por 60 s ou até o início da crise tônica por três dias

consecutivos. A gravidade das crises epiléticas foi definida utilizando a escala de índice de gravidade comportamental (IGC), descrita na Tabela 1 (Garcia-Cairasco and Sabbatini 1989).

Tabela 1. Índice de gravidade comportamental expresso por animais *WAR*.

Comportamento	Índice de gravidade comportamental (IGC)
sem crise epilética	0,0
um episódio de corrida	0,11
um episódio de corrida, salto e queda (com salto e queda atônica)	0,23
dois episódios de corrida, salto e queda	0,38
crise tônica	0,61
crise clônica	0,85
flexão ventral da cabeça	0,90
extensões dos membros anteriores	0,95
extensões dos membros posteriores	1,0

Após a triagem, os animais *WAR* foram divididos em três grupos experimentais, grupo Salina (controle), grupo tratado com o agonista D₁ - SKF-38393 e grupo tratado com o agonista D₂ - quimpirole. Apenas animais *WAR* que obtiveram IGC inferior a 0,23 foram utilizados no grupo tratado com agonista D₁ e apenas animais *WAR* que obtiveram IGC superior a 0,38 com um episódio 1,0 foram utilizados no grupo tratado com agonista D₂.

Os animais *Wistar* utilizados no estudo também passaram pelo teste de triagem onde não foram apresentados comportamento de crise epilética, obtendo IGC de 0,0. Estes animais foram então divididos em três grupos, grupo *Wistar* Salina, grupo *Wistar* tratado com SKF-38393 e grupo *Wistar* tratado com quimpirole como observado na tabela 2:

Tabela 2: Compostos e grupos experimentais empregados no estudo

Grupo	Índice de gravidade	Tratamento
<i>WAR</i> - agonista D ₁	IG < 0,23	SKF-38393 40 pmol/μL
<i>WAR</i> - agonista D ₂	IG > 0,38	Quimpirole 40 pmol/μL
<i>WAR</i> Salina	IG < 0,23	Salina, solução salina a 0,9%

<i>Wistar</i> - agonista D ₁	-	SKF-38393 40 pmol/ μ L
<i>Wistar</i> - agonista D ₂	-	Quimpirole 40 pmol/ μ L
<i>Wistar</i> Salina	-	Salina, solução salina a 0,9%

II.3 Cirurgia Estereotática

A cirurgia estereotática foi realizada utilizando um atlas para obtenção das coordenadas anatômicas para implantação de cânulas (Franklin, K and Paxinos, G. 1997). O animal foi induzido à anestesia com isoflurano 5% via inalatória e, em seguida, posicionado no aparelho estereotático, onde foi mantido com anestesia por isoflurano a 2%, recebendo a anestesia local de cloridrato de lidocaína com hemitartrato de epinefrina 2,0% (1:200.000 em epinefrina).

A cabeça do animal foi tricotomizada e o crânio foi exposto com o auxílio de uma tesoura cirúrgica, com posterior extração do periósteo e alinhamento do bregma e lambda. O ponto zero (ponto de referência) foi o bregma, destacado após a adição de uma gota de peróxido de hidrogênio 20%, a partir das coordenadas disponibilizadas (Franklin, K and Paxinos, G. 1997), que serviram como orientação para implantação das cânulas intra-amígdalares. Detalhadamente, as coordenadas em milímetros foram: antero-posterior (AP): - 2,5; médio-lateral (ML): + 5 e -5; dorso-ventral (DV): - 8,8.

O crânio dos animais foi então submetido à trepanação bilateral com auxílio de uma broca odontológica. Em seguida, as cânulas-guia (agulha de 24G, aço) foram introduzidas gradativamente no cérebro do animal segundo as coordenadas AP e ML determinadas e inseridas no equipamento nos dois orifícios do crânio, previamente abertos, até a coordenada DV. Foi colocado um parafuso na região frontal do crânio para auxiliar na fixação. Posteriormente, as cânulas e o parafuso foram fixados no animal pela utilização do cimento de zinco e a proteção da região craniana exposta foi feita por meio da aplicação de acrílico dentário, formando um capacete. Assim que a cirurgia foi finalizada, os animais passaram por um período de repouso de cinco dias conforme o desenho experimental esquematizado pela Figura 7.

Para a confirmação da localização da cânula, os cérebros foram posteriormente fatiados em criostato de acordo com as coordenadas estereotáticas referentes ao implante das cânulas. Quatro fatias foram selecionadas e coradas para confirmação da posição, seguindo protocolo de marcação com solução de vermelho neutro.

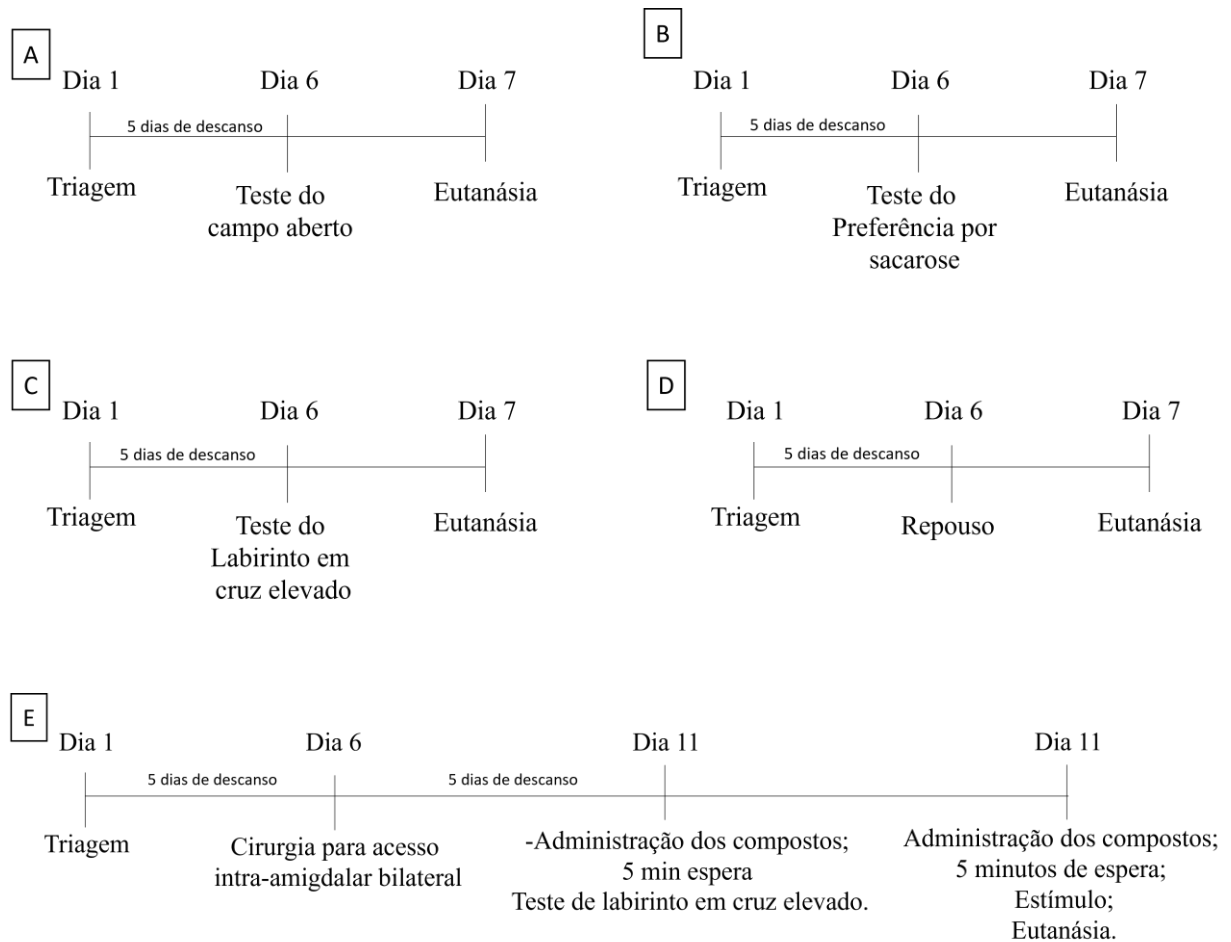


Figura 7. Desenho experimental, linha temporal.

Para esse estudo, cada conjunto de animais passou por um determinado processo. O primeiro conjunto de animais *WAR* e *Wistar* passou pelo teste comportamental do campo aberto; o segundo conjunto de animais *WAR* e *Wistar* passou pelo teste comportamental de preferência por sacarose; por sua vez, o terceiro conjunto de animais *WAR* e *Wistar* passou pelo teste comportamental do labirinto em cruz elevado; o quarto conjunto de animais *WAR* e *Wistar* passou pelo teste de triagem e os tecidos foram coletados para os ensaios bioquímicos; por fim, o quinto conjunto de animais *WAR* e *Wistar* passou pela cirurgia bilateral para acesso intra-amigdalares e para a administração dos agonistas, com as subsequentes realização dos testes comportamentais do labirinto em cruz elevado e submissão ao estímulo sonoro (Figura 7).

II.4 Cálculo amostral

No presente trabalho o cálculo do número amostral mínimo foi realizado a partir da seguinte fórmula:

$$n = \frac{(\alpha + \beta)^2 \sigma^2}{d^2}$$

Onde utilizamos $\alpha = 1,96$ e $\beta = 1,28$ para o erro tipo I (α) e erro tipo II (β), cujos valores derivam da distribuição de Gauss padronizada, para teste 95%. O valor de σ é o desvio padrão da amostra, que deve ser obtido em um estudo piloto ou artigo em que seja usado o mesmo método (Castro, Medeiros et al. 2017). Esse valor incorpora as variações naturais e individuais esperadas para o grupo de indivíduos em questão, permitindo assim a estimativa de um valor que aponte a existência ou não de uma diferença estatisticamente significativa. O valor de d é diferença máxima estimada entre a média amostral e a verdadeira média populacional.

A variância dos grupos é representada pelo desvio padrão aceitável (σ), valor retirado de trabalhos prévios que executaram o teste em questão da maneira mais semelhante à proposta (Castro, Medeiros et al. 2017).

II.5 Testes comportamentais

Os testes comportamentais foram realizados em colaboração com o Departamento de Fisiologia e Biofísica – ICB – UFMG, seguindo protocolos pré-estabelecidos no Núcleo de Neurociências (NNC) (Castro, Medeiros et al. 2017).

II.6 Índice de gravidade comportamental da crise epiléptica

A susceptibilidade audiogênica foi avaliada por meio do teste de estímulo sonoro. Os animais foram colocados em uma caixa acústica fechada (50 cm X 30 cm X 30 cm) ligada a um amplificador sonoro capaz de provocar um estímulo de 110 decibéis. Os animais foram submetidos a estímulos sonoros de 60 s. A gravidade das crises epiléticas foi determinada utilizando-se a escala de índice de gravidade comportamental descrita na Tabela 1 (Castro, Medeiros et al. 2017).

II.7 Labirinto em cruz elevado (LCE)

O labirinto em cruz elevado é baseado no modelo proposto, em ratos, por Pellow et al (1985) e validado por Lister (1990) para camundongos. O equipamento consiste de dois braços abertos opostos (50 x 10 cm) e dois fechados (50 X 10 x 39,5 cm), também opostos, elevados a 45 cm do nível do solo e um quadrado central de 10 x 10 cm. Os animais foram colocados individualmente no centro do LCE com a cabeça voltada para um dos braços fechados e seu comportamento avaliado durante 5 min. Os parâmetros comportamentais avaliados neste teste são: número de entradas nos braços abertos e tempo de permanência dos animais nos braços

abertos, fechados e no centro do equipamento. O equipamento foi higienizado com álcool 70% após cada animal finalizar o teste. Todos os testes foram filmados e analisados *offline* utilizando o programa X-Plo-Rat (2005). Os vídeos foram numerados pelo experimentador 1 de forma aleatória para uma análise cega do experimentador 2 (Pellow, Chopin et al. 1985).

II.8 Campo aberto

O teste de campo aberto foi utilizado para avaliar a atividade locomotora e exploratória dos animais. Para avaliação por 5 min, os ratos de ambas as linhagens foram colocados em uma arena circular preta de 1,0 m de diâmetro, cercada por uma parede de 40 cm de altura. A arena de teste foi higienizada com álcool 70% após cada sessão. Além disso, todos os testes foram filmados e analisados *offline* por um detector de posição automatizado (*ToxTrac*), garantindo uma análise posterior mais detalhada pelo avaliador. Os vídeos foram numerados pelo experimentador 1 de forma aleatória para uma análise cega posterior, feita pelo experimentador 2. Foram mensuradas as distâncias totais percorridas pelos animais, tanto na área central do aparato quanto na periferia, a fim de avaliar aspectos comportamentais da exploração que poderiam sugerir características relacionadas à ansiedade. Além disso, foram mensurados parâmetros como velocidade média e taxa de mobilidade, que constituem variáveis medidas pelo detector de posição automatizado para avaliar aspectos locomotores.

II.9 Teste de preferência por sacarose

Este teste consiste na medida do consumo de água ou solução de sacarose e é utilizado para avaliar a busca por estímulos hedônicos, tendo em vista a preferência natural dos roedores por soluções adoçadas (Leeb et al., 1991). Os animais foram colocados em gaiolas individuais e habituados a beber em duas garrafas um dia antes da realização do teste. Os animais foram então expostos, por 48 h, a duas garrafas, uma contendo solução de sacarose (1%) e outra contendo água. As medições, por meio da pesagem das garrafas, ocorreram nos seguintes intervalos de tempo: medição nas três primeiras horas de exposição (a medição ocorreu de 30 em 30 min neste período), 12 h de exposição, 24 h de exposição e 48 h de exposição, quando a medição final do consumo de líquido total foi realizada. Em cada medição, houve a alternância entre as garrafas para anular o viés de aprendizado (Leeb, Parker et al. 1991).

II.10 Preparação de membrana

Amostras de hipocampo, córtex pré-frontal e estriado de animais *WAR* e *Wistar* foram trituradas e homogeneizadas em triturador de tecidos (T20 Basic UltraTurrax. IKA Labortechnik). As amostras trituradas foram homogeneizadas em tampão de preparação RIPA (Millipore-20-188) contendo 10% de coquetel de inibidores de protease (Sigma, cód. S8820). Posteriormente, foi

feita uma pré-centrifugação de 20 min a 3000 x g, 4°C. O sobrenadante (fração solúvel 1) obtido da pré-centrifugação foi então ultracentrifugado a 100.000 x g por uma hora, a 4°C (Ultra centrifuga refrigerada – Sorvall Ultra Pro 80). O *pellet* formado foi ressuspenso em 150 µl do tampão de preparação (10 mM Tris-HCl [pH 7.4], 320 mM sacarose, 0,5 mM EDTA, 1 mM MgCl₂), correspondente às frações de membrana dos tecidos utilizados. O sobrenadante obtido da ultracentrifugação (fração solúvel 2) foi armazenado para ensaio de doseamento posteriores (Parreira, Resende et al. 2018).

II.11 Doseamento de proteína

A concentração total de proteínas das amostras foi determinada, em triplicata, por meio do método descrito por Lowry, por espectrofotometria na região do UV-visível ($\lambda = 660$ nm). Como padrão, utilizou-se albumina sérica bovina (BSA) (Lowry, Rosebrough et al. 1951). O equipamento utilizado foi o leitor de Elisa com monocromador Epoch.

II.12 Western Blot

As amostras obtidas por meio da preparação de membrana foram preparadas para corridas em gel de eletroforese. Cada amostra foi diluída em tampão de preparação e tampão de amostra (Tris HCl 0,125 mM [pH = 6,8], azul de bromofenol 0,004%, 2-mercaptoetanol 10%, glicerol 20%, e SDS 4%) para uma concentração fixa de proteína (10,0 µg/µL). Posteriormente, as amostras foram submetidas às corridas em gel de poliacrilamida 12,5% (tampão de corrida - tris-base 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1%).

Após a corrida, foi realizada a transferência das proteínas do gel de poliacrilamida para uma membrana de PDVF – 0,45 µm (Thermo scientific) por 2 h (tampão de transferência – tris-base 25 mM, glicina 192 mM e metanol 20%). A eficiência da transferência foi avaliada corando-se a membrana de PDVF – 0,45 com solução de vermelho Ponceau Xilidina 0.5%. Para bloquear ligações inespecíficas dos anticorpos utilizados, a membrana foi bloqueada por 1 h com leite desnatado 5% diluído em T-TBS (tris-base 100 mM, NaCl 0,9% e tween 0,1%).

Posteriormente, a membrana foi lavada duas vezes, por 5 min cada lavagem, com T-TBS, incubando-se em seguida e durante a noite com anticorpo primário D₁ Dopamine Receptor (Boster Immunoleader-Cód. PB9177) e D₂ Dopamine Receptor (Boster Immunoleader-Cód. PA2234) (coelho), diluídos 1:1000. Todos os anticorpos foram diluídos em TBS.

No dia seguinte, a membrana foi lavada 5 vezes, por 5 min cada lavagem, com T-TBS, incubando-se em seguida por uma hora e meia com anticorpo secundário, diluído 1:1000. As

proteínas reconhecidas pelos anticorpos foram reveladas por meio de eletroquimioluminescência (Luminata; Amersham Biosciences, Reino Unido) (ImageQuant LAS 4000; General Electric, EUA). Para quantificar os *immunoblots*, foi utilizado o programa Image J (Schindelin, Arganda- Carreras et al. 2012). Os valores foram expressos em comparação à expressão da proteína constitutiva β -actina (Parreira, Resende et al. 2018).

II.13 Imunofluorescência

Os animais Wistar e *WAR* foram anestesiados com cetamina (80 mg.kg⁻¹) e xilazina (10 mg.kg⁻¹), por meio de administração intraperitoneal. Após a verificação da ausência do reflexo de retirada da pata, foi realizada a perfusão transcardíaca com 100 mL de tampão fosfato (PBS 10%: Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,4), seguida pela perfusão de 100 mL de paraformaldeído (PFA) 4% (m/v). O cérebro de cada animal foi então retirado e armazenado em solução de PFA 4% por 24 h, sendo posteriormente transferidos para solução de sacarose 30% para desidratação. Os tecidos foram, então, fatiados em criostato, em amostras de 40 μ m de espessura nas regiões do córtex pré-frontal, estriado, hipocampo e amígdala. As fatias foram armazenadas em solução crioprotetora (sacarose 30% m/v, polivinilpirrolidona PVP 1% m/v, PBS 10% e etileno glicol 30% v/v), onde permaneceram até a execução do experimento. A imunofluorescência foi realizada por *free-floating*, para a avaliação da expressão de receptor D₂ e TH (Giannakopoulou, Lyras et al. 2017).

Foram selecionadas quatro fatias do estriado, quatro fatias do hipocampo dorsal, quatro do hipocampo ventral, quatro do córtex pré-frontal e quatro da amígdala de cada cérebro. As fatias foram lavadas quatro vezes com PBS (0,1 M pH 7,4) por 5 min para retirar os vestígios da solução crioprotetora e preparar o tecido para as próximas etapas. Em seguida, foram feitas três lavagens de 5 min em PBS-T (PBS 0,1 M + Triton- X 0,3% v/v). O bloqueio de sítios inespecíficos utilizando uma solução de 5% de soro normal de cabra (NGS – *normal goat serum*) em PBS-T foi feito, durante 2 h em temperatura ambiente. Após o bloqueio, as fatias foram incubadas por 48 h com o anticorpo primário anti-D₂ (1:800 monoclonal de coelho – Abcam®), diluído em PBS-T + NGS 5% e com o anticorpo primário anti-TH (1:1000, monoclonal de galinha). Ao término do período de incubação dos anticorpos primários, as fatias foram lavadas três vezes por 5 min com PBS 0,1 M, com o objetivo de evitar o depósito de anticorpos em sítios inespecíficos. Em seguida, foi adicionado o anticorpo secundário anti-IgG de galinha associado ao composto Alexa Fluor 488® (Molecular Probes®) (1:1000 v/v) para a detecção do anticorpo primário anti-TH e anti-IgG de coelho associado ao composto Alexa Fluor 647® (Molecular Probes®) (1:1000 v/v) para detecção do anticorpo primário anti-D₂. A

incubação foi feita por 1 h e 30 min, em temperatura ambiente e protegida da luz para evitar o fotodecaimento dos compostos fluorescentes. Após esse período, as fatias foram lavadas três vezes por 5 min em PBS, seguidas de incubação por 15 min em solução contendo anticorpo anti-DAPI 1:10000 em PBS. Para finalizar o experimento, as fatias foram novamente lavadas três vezes em PBS, para a eliminação do excesso de anticorpos secundários, ligados a sítios inespecíficos. As fatias foram então montadas em lâminas de microscopia carregadas positivamente (Superfrtos® Plus), cobertas com meio de montagem (Hydromount TM), lamínula, vedadas com esmalte acrílico e armazenadas em uma caixa protegida da luz e mantida na geladeira.

Dois controles para este procedimento foram feitos, sendo um poço contendo fatias e que recebeu apenas os anticorpos primários, e outro poço, também contendo fatias, que recebeu apenas os anticorpos secundários utilizados. Não foram observadas marcações nas fatias provenientes desses poços.

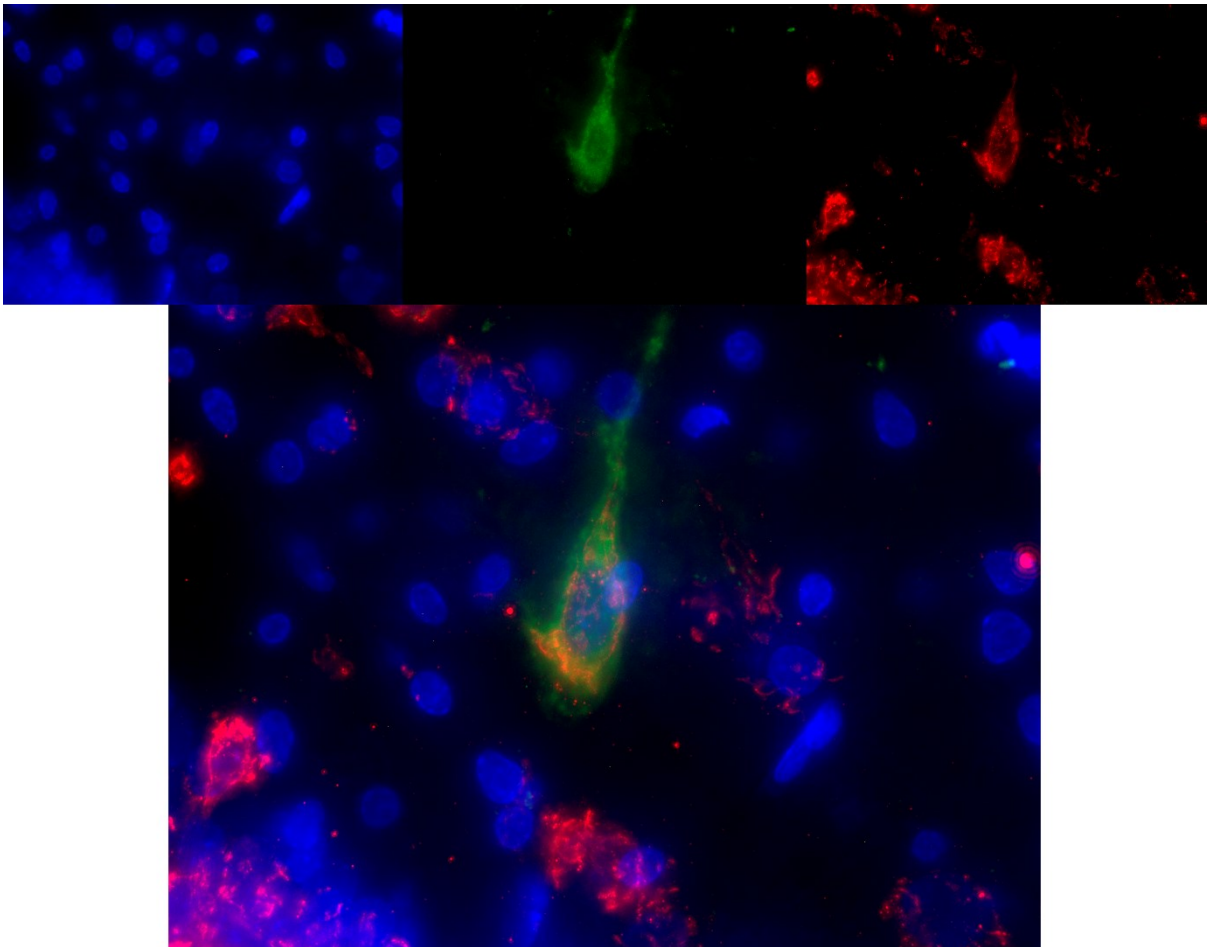


Figura 8. Imagem ilustrativa mostrando a marcação obtida por imunofluorescência. Em azul marcação nuclear com DAPI; em verde marcação com TH; em vermelho marcação dos receptores D2.

II.14 Imunoistoquímica

Fatias de 40 µm contendo o córtex pré-frontal, a amígdala, os hipocampos ventral e dorsal e estriado foram obtidas e armazenadas a -20 °C em solução crioprotetora (sacarose 30% m/v, polivinilpirrolidona PVP 1% m/v, PBS 10% e etileno glicol 30% v/v).

Utilizando-se o método *free-floating* (Guarnieri, Pereira-Caixeta et al. 2020), as fatias foram lavadas 3 vezes por 5 min em 0.01 M de tampão fosfato salina (PBS) e incubadas por 30 min em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 3%. Após este procedimento, as fatias foram novamente lavadas 3 vezes por 5 min em PBS e incubadas por 1 h em solução de bloqueio [*normal goat serum* (NGS) 3% em PBS]. O anticorpo primário anti-D₁ (1:500 Santa Cruz Biotechnology, sc-52, anticorpo policlonal purificado de coelho) foi, então, adicionado e a preparação foi incubada a 4° C por 48 h.

Após a incubação com o anticorpo primário as fatias foram lavadas 3 vezes por 5 minutos em PBS e incubadas com anticorpo secundário (1:1000, biotilado anti-coelho, anti-IgG, Vector Laboratories) diluído em PBS por 2 h em temperatura ambiente. Em seguida, as fatias foram lavadas 3 vezes por 5 min em PBS e incubadas no complexo avidina-biotina peroxidase (1:250 em PBS, Vector Laboratories) durante 90 min em temperatura ambiente. Posteriormente, as fatias foram lavadas 2 vezes por 5 min em PBS.

A solução corante foi preparada em tampão acetato e adicionado 0.2 mg.ml⁻¹ de diaminobenzidina (DAB), 25 mg.ml⁻¹ de sulfato de níquel e 0.0025% de H₂O₂ e as fatias mantidas em imersão por 10 min. Finalmente, as fatias foram lavadas 3 vezes com PBS por 5 min, colocadas em lâminas, secas em temperatura ambiente e cobertas com lamínulas fixadas com meio de montagem rápida (Entellan™).

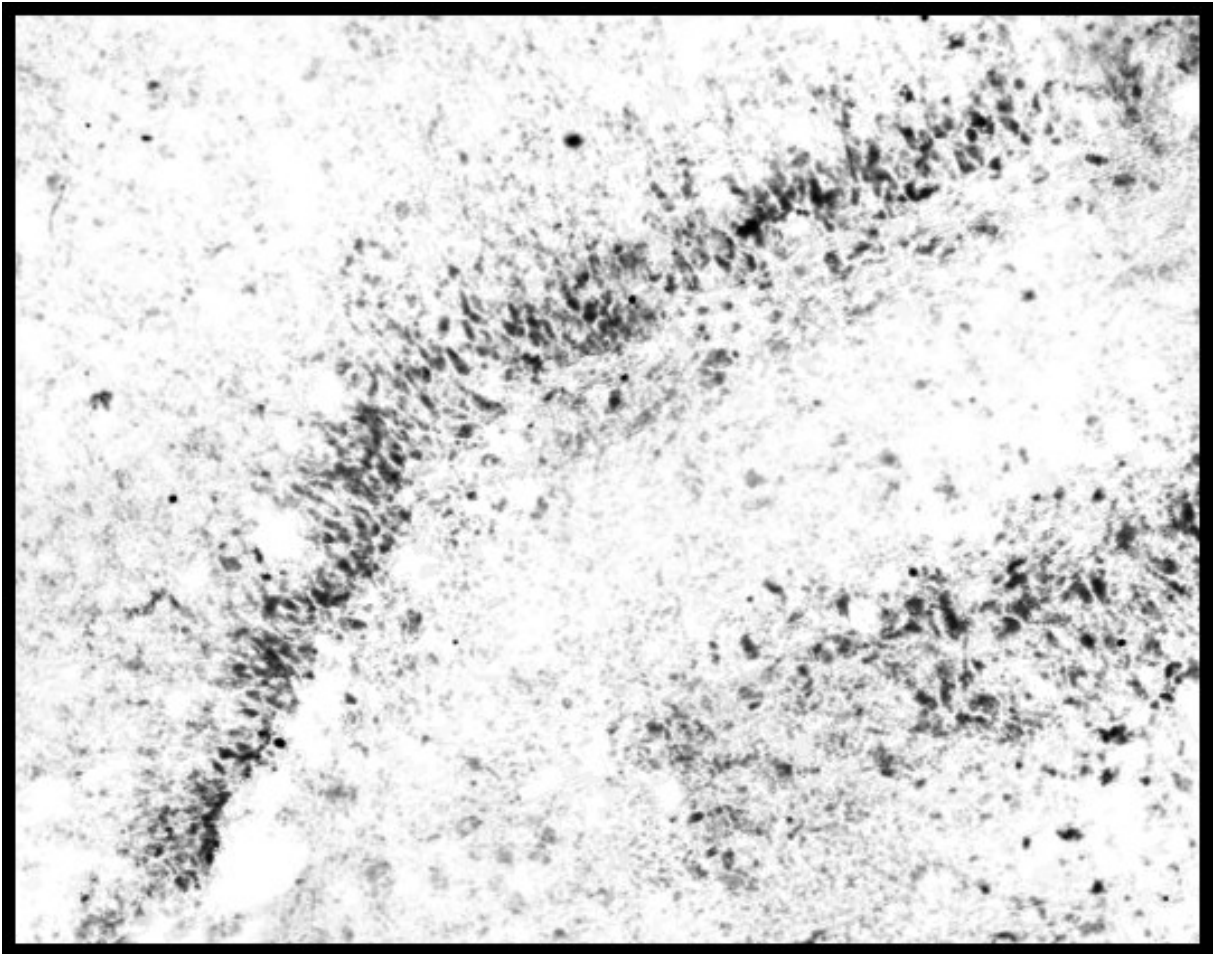


Figura 9. Imagem representativa da marcação dos receptores D1 obtida por meio de imunistoquímica.

II.15 Obtenção das imagens

As lâminas preparadas para a imunofluorescência foram fotografadas no Centro de Aquisição e processamento de Imagens (CAPI) da UFMG por meio do microscópio confocal (LSM 880) utilizando o *software* ZEN2 e no Núcleo de Neurociências (NNC) da UFMG por meio de microscópio de fluorescência (Axio Imager M2 - Zeiss system), utilizando-se o *software* Carl Zeiss Axiovision 4.8. As estruturas foram fotografadas em toda sua extensão, em aumento de 20x e suas posições foram determinadas por meio da comparação com as imagens do atlas neuroanatômico Allen Brain Atlas (Paxinos, George, and Charles Watson. 2006).

As regiões foram fotografadas utilizando-se o método de obtenção de série Z, que consiste em se fazer uma série de fotografias, com intervalos regulares, do primeiro foco inferior da fatia até o último foco superior da mesma. Foram utilizados dois diferentes filtros para permitir a visualização dos dois diferentes fluoróforos utilizados: 1) excitação 450-530 nm/emissão 500-610 nm para o Alexa Fluor 488, associado ao anticorpo anti-TH; 2) excitação 590-680 nm/emissão 630-800 nm para o Alexa Fluor 647, associado ao anticorpo anti-D2R. O tempo de

exposição para cada filtro foi determinado por meio do histograma de saturação de *pixels*, sendo sempre utilizada a resolução máxima possível e logo abaixo do limite de saturação.

Já as lâminas preparadas para a realização da imunistoquímica foram escaneadas pelo microscópio *digital-scanner* de lâminas 3D Histech e então processadas pelo programa *Pannoramic Viewer* para obtenção das imagens referentes as estruturas previamente descritas no tópico II.14.

II.16 Quantificação das células marcadas

A quantificação da imunistoquímica e imunofluorescência foi executada por meio do *software* de análise FIJI – Image J (Schindelin, Arganda- Carreras et al. 2012).

II.17 Análise estatística

O programa *GhaphPad Prism 8* foi utilizado para expressar os valores como média \pm Erro Padrão da Média (SEM). Primeiramente foi realizado uma análise de normalidade e o teste de Shapiro-Wilk foi utilizado, em função dos resultados estarem relacionados a grupos amostrais inferiores a 50 unidades. Para os resultados que seguem uma distribuição normal (dados paramétricos), os grupos foram submetidos ao teste One-way ANOVA e Teste T. Quando os resultados não se encontravam dentro da normalidade (não paramétricos), os grupos foram submetidos ao teste de Mann-Whitney. Por se tratar de uma análise qualitativa ordinal, o teste de índice de gravidade comportamental (IGC) não foi submetido ao teste de normalidade, passando apenas pelo teste de Mann-Whitney. Além disso, sua representação foi dada por mediana com intervalo interquartilico. Para significância, foi considerado $p < 0,05$.

III) Resultados e discussão

III.1 Resultados da análise comportamental dos animais

As Epilepsias estão fortemente associadas a uma série de comorbidades neurocomportamentais, tais como declínio cognitivo, depressão, ansiedade, autismo e esquizofrenia (Akyuz, Polat et al. 2021). Muitos pacientes também sofrem com comprometimentos neurocognitivos ou efeitos adversos derivados dos medicamentos anticonvulsivantes, impactando diretamente na qualidade de vida (Pohlmann-Eden, Aldenkamp et al. 2015, Witt, Elger et al. 2015, Elger, Johnston et al. 2017). As comorbidades em pacientes com epilepsia podem ter sua origem em diferentes fatores como, por exemplo, a localização e a extensão da área epileptogênica, a frequência e a duração das crises, assim como o número e os tipos de medicamentos anticonvulsivantes utilizados na terapêutica (Kang, Eun et al. 2007, Coppola, Verrotti et al. 2008, Medlej, Salah et al. 2019).

No presente trabalho, os animais foram inicialmente submetidos a um protocolo de análise comportamental para a investigação dos aspectos relacionados à capacidade locomotora. Essa avaliação se faz importante diante da influência da mobilidade na execução dos diferentes comportamentos que foram executados posteriormente. Para tal, foi feito o teste comportamental do campo aberto, cujos resultados apresentados nas Figuras 10 e 11. Este teste mensura a atividade locomotora por meio da taxa de mobilidade e da velocidade de locomoção, além da atividade exploratória de animais experimentais a partir do valor da distância total percorrida no aparato (Seibenhener and Wooten 2015).

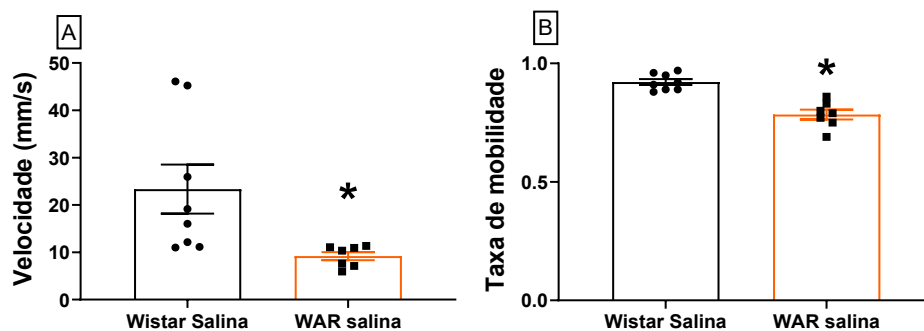


Figura 10. Teste comportamental do Campo Aberto em animais *Wistar* (n=8) e *WAR* (n=7) A) Velocidade B) Taxa de mobilidade. Os dados estão expressos em média \pm SEM. Os resultados de velocidade foram submetidos à análise estatística por meio do teste de Mann-Whitney, enquanto os resultados para a taxa de mobilidade foram submetidos ao teste T para a taxa de mobilidade. $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo; * Refere-se à diferença estatística do grupo *WAR* Salina em relação ao grupo *Wistar* Salina.

Em nossos resultados, observamos reduções estatisticamente significativas na taxa de mobilidade e na velocidade de locomoção do grupo *WAR*, quando comparados ao grupo *Wistar* (Figuras 10A e 10B). Os dados aqui obtidos diferem dos resultados apresentados por Castro e colaboradores (2017). No entanto, no estudo de 2017, é importante ressaltar que foram considerados apenas os quadrantes percorridos durante o teste, enquanto nossa avaliação utiliza parâmetros mais precisos que podem destacar as diferenças existentes.

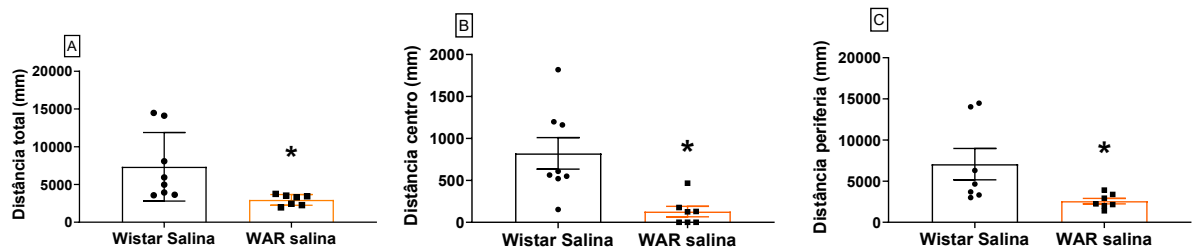


Figura 11. Teste comportamental do campo aberto em animais *Wistar* (n=8) e *WAR* (n=7) A) Distância total B) Distância ao centro C) Distância na periferia. Os dados são expressos em média \pm SEM. Os resultados foram submetidos à análise estatística por meio do teste de Mann-Whitney. Foi considerado estatisticamente significativo $p < 0,05$; * Refere-se à diferença estatística em relação ao grupo *Wistar*.

Durante a análise da locomoção na área central e periférica do campo aberto, observou-se uma redução no grupo *WAR* em comparação ao grupo *Wistar*. Em estudo realizado por Aguilari e colaboradores (2018), foram avaliados os fenótipos semelhantes à ansiedade e à depressão de animais *GEPR-3* (ratos de um modelo de epilepsia de ausência genética) e controles *Sprague-Dawley* (SD) machos e fêmeas em diferentes protocolos comportamentais. Para o teste do campo aberto, foi observado que os machos de ambas as linhagens exploraram menos a arena do que as fêmeas. Além disso, foi observado que os animais *GEPR-3* de ambos os sexos exploraram menos o centro do aparato que ratos SD (Aguilar, Malkova et al. 2018).

O teste do campo aberto foi amplamente utilizado com o objetivo de avaliar os efeitos de diferentes substâncias, incluindo aquelas com efeitos ansiolíticos (benzodiazepínicos, ligantes de serotonina, neuropeptídeos), estimulantes (anfetaminas, cocaína), sedativos (neurolépticos) ou indutores de prostração (drogas epileptogênicas) (Morse, Erwin et al. 1993, Prut and Belzung 2003, Sithisarn, Bada et al. 2011, Zimcikova, Simko et al. 2017).

As comorbidades psiquiátricas são duas a três vezes mais frequentes em pacientes epiléticos e, dentre as inúmeras comorbidades relacionadas às epilepsias, as predominantemente observadas são ansiedade e depressão (Hingray, McGonigal et al. 2019). Com o intuito de avaliar características relacionadas a esses comportamentos, diferentes protocolos experimentais têm sido utilizados. Para avaliar características do comportamento do tipo depressivo, o teste de preferência por sacarose foi feito com o objetivo de avaliar uma das características observadas na depressão, a anedonia, ou seja, o desinteresse por estimuladores de prazer (Willner, Towell et al. 1987).

Em nossos resultados (Figura 12), observamos que não houve alteração no consumo de água e sacarose em animais *WAR* quando comparados aos *Wistar*. A diminuição da preferência por

sacarose é considerada um índice bem validado de estado do tipo depressivo em modelos animais (Willner and Mitchell 2002). No estudo realizado por Sarkisova e colaboradores (2011) em animais *WAG/Rij*, um modelo animal genético de epilepsia de ausência, observou-se menor consumo de sacarose quando comparado ao consumo de animais *Wistar*. Estes resultados sugerem que animais *WAG/Rij*, em comparação aos ratos *Wistar*, apresentam um indicativo de sensibilidade reduzida à recompensa, ou seja, anedonia (Sarkisova and van Luijtelaaar 2011).

No estudo de Aguilar e colaboradores (2018), também foi avaliada a resposta hedônica em animais *GEPR-3* de ambos os sexos. Como resultado, foi observada uma taxa de preferência de sacarose significativamente menor em animais *GEPR-3* machos e fêmeas quando comparados com animais SD (Aguilar, Malkova et al. 2018).

Em contrapartida, no estudo realizado por Castro e colaboradores (2017), na avaliação da anedonia, foi observada uma maior preferência por sacarose pelos animais *WARs* em comparação aos ratos *Wistar* após 48h. Em relação à ingestão total de líquidos, foi observado um aumento na quantidade de sacarose ingerida pelos ratos *WAR* quando comparados aos animais *Wistar*. Quando avaliado o consumo de água, nenhuma alteração foi observada.

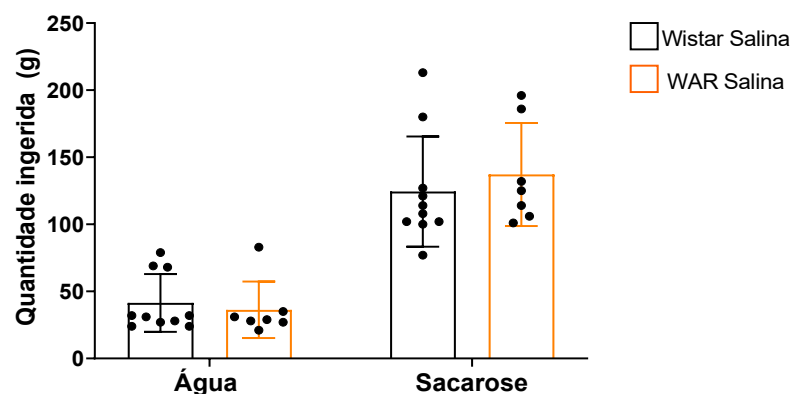


Figura 12. Consumo total de água e sacarose em animais *Wistar* (n=7) e *WAR* (n=6). Os dados são expressos em média \pm SEM. Os resultados foram submetidos à análise estatística por meio do teste de Mann-Whitney. Foi considerado estatisticamente significativo $p < 0,05$.

Outro protocolo que realizamos foi o teste do labirinto em cruz elevado (LCE). Este teste é, provavelmente, o mais aceito atualmente entre os testes disponíveis para o estudo de ansiedade (Dawson and Tricklebank 1995, Carobrez and Bertoglio 2005, Walf and Frye 2007). O protocolo experimental consiste em avaliar o comportamento incondicionado ou espontâneo dos animais em explorar novos ambientes, sendo que esse comportamento exploratório se opõe ao medo e à aversão a locais abertos. Essas características são, então, desafiadas no teste do LCE. Os parâmetros comportamentais avaliados neste teste são: tempo de permanência dos

animais nos braços abertos e fechados do equipamento, número de entradas no braço aberto, além do tempo de permanência no centro do aparato (File 1993, Rodgers and Dalvi 1997). As aplicações do labirinto em cruz elevado são diversas. Por exemplo, é importante como validação de modelos de estudo de comportamentos do tipo ansioso, triagem de agentes farmacológicos e estruturas cerebrais implicadas na ansiedade, tais como regiões límbicas, hipocampo e amígdala (Silveira, Sandner et al. 1993, Walf and Frye 2007).

Nesta avaliação, pudemos observar em nosso estudo que os animais *WAR* não entraram nos braços abertos do equipamento, conseqüentemente não possuindo frequência de entrada nesse ambiente do aparato. Quando observamos a exploração do ambiente fechado, observamos que a permanência nesses braços é maior nos animais *WAR* quando comparados aos ratos *Wistar*. (Figura 13).

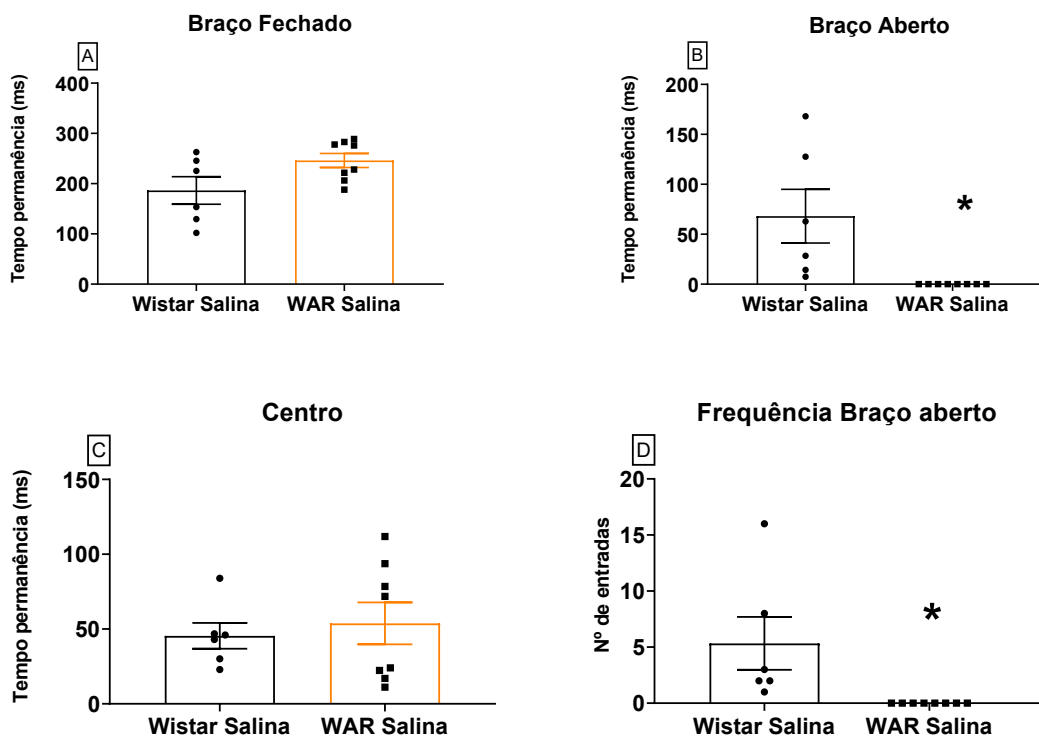


Figura 13. Teste do labirinto em cruz elevado em animais *Wistar* (n=6) e *WAR* (n=8) **A)** Tempo de permanência no braço fechado. **B)** Tempo de permanência no braço aberto. **C)** Tempo de permanência no centro. **D)** Frequência de entradas no braço aberto. Os dados são expressos em média \pm SEM. Os resultados foram submetidos à análise estatística por meio do teste de Mann-Whitney. Foi considerado estatisticamente significativo $p < 0,05$; * Refere-se à diferença estatística em relação ao grupo *Wistar*.

Estudo realizado por Jones e colaboradores (2008) avaliou o comportamento ansioso por meio do teste do LCE em animais *GAERS* (modelo animal de epilepsia genética) em dois períodos, antes e depois do aparecimento das crises de ausência. Em seus resultados foi observado que

os animais *GAERS* passaram um tempo menor nos braços abertos antes e depois do aparecimento das crises quando comparados aos animais controles. Além disso, o número total de entradas no braço aberto também foi significativamente reduzido nos animais *GAERS* em ambos os tempos (Jones, Salzberg et al. 2008).

Em um estudo conduzido por Sarkisova (2011) utilizando animais *WAG/Rij*, avaliou-se o comportamento do tipo ansioso. Em seus resultados, foi observado que o tempo gasto nos braços abertos e no quadrante central do aparato foi reduzido em animais *WAG/Rij* audiogênicos em comparação aos ratos *WAG/Rij* não audiogênicos e *Wistar* (Sarkisova and van Luijtelaar 2011). Para o teste do LCE, o estudo realizado por Aguilar (2018) evidenciou que o tempo gasto e o número total entrada nos braços abertos do aparato não foram alterados em animais *GEPRs* machos e fêmeas quando comparados aos animais controles (Aguilar, Malkova et al. 2018).

No estudo realizado por Castro (2017), o teste LCE também foi realizado, observando-se que animais *WAR* passaram mais tempo na área central e menos tempo nos braços fechados em relação aos controles. Quando considerados apenas os braços abertos, nenhuma diferença significativa foi encontrada quando comparados animais *WAR* e *Wistar*.

Como podemos observar, há diferenças quando comparamos os resultados encontrados em nosso estudo utilizando o modelo animal *WAR* aos resultados encontrados no estudo conduzido por Castro e colaboradores (2017). Essas diferenças podem ser explicadas pelo fato de a seleção desses animais ter acontecido de formas diferentes em cada um dos estudos. A seleção empregada por Castro baseou-se no índice de gravidade comportamental inferior, onde os animais *WAR* selecionados expressavam o comportamento de corrida, salto e queda - índice de 0,23 conforme a Tabela 1. Já em nosso estudo, o índice utilizado foi maior, sendo que, em ao menos um dos três comportamentos triados para cada animal, deveria haver extensões dos membros anteriores e posteriores, atingindo assim índice de 1,0. Além disso, devemos observar que os animais *WAR* são uma colônia heterogênea, pois sua seleção é baseada no fenótipo empregado no momento do estímulo sonoro, podendo então ocorrer variações dentro da colônia. Por isso, a realização destes testes comportamentais dentro do nosso estudo se fez necessária e reforça os indícios de que o aparecimento de comorbidades em modelos animais para epilepsia pode ser bastante variável e afetado pela severidade de crises apresentadas pelos animais.

Essa variação entre modelos e mesmo dentro dos diferentes modelos traz dificuldades para entender seus mecanismos e desenvolver tratamentos, porém é importante que o esforço se

mantenha já que muitas vezes tais comorbidades, tanto quanto as próprias crises, influenciam na qualidade de vida dos pacientes.

III.2 Resultados das análises bioquímicas de regiões do encéfalo dos animais – RD1

Nesta etapa do trabalho, buscamos primeiramente investigar os aspectos bioquímicos relacionados ao sistema dopaminérgico de animais *WAR* a partir da expressão de receptores D₁ (RD1) em diferentes regiões do encéfalo. A primeira região analisada por meio de *imunoblot* de proteínas (*western blot*) foi o hipocampo, importante estrutura do sistema límbico relacionada às emoções, aprendizado e memória.

Em nosso estudo, observamos um aumento estatisticamente significativo da expressão de RD1 em animais *WAR* quando comparados aos *Wistar* (Figura 14) no tecido hipocampal.

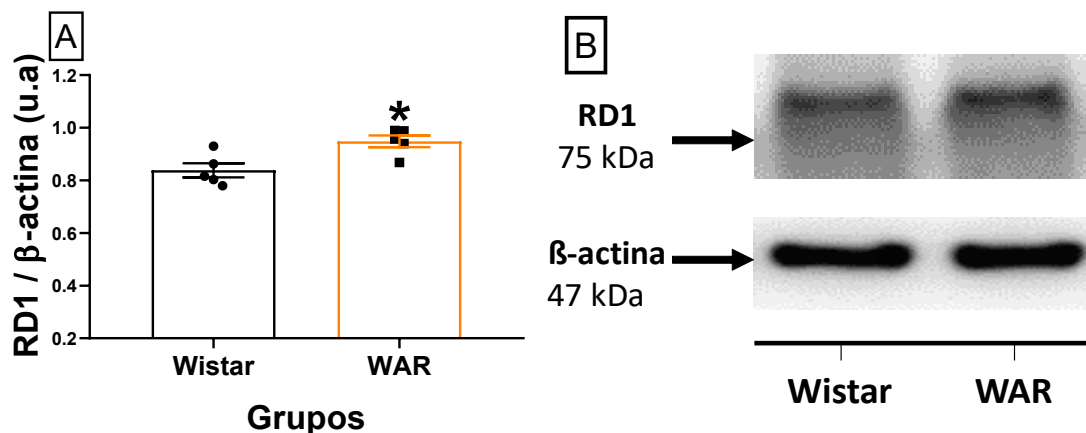


Figura 14. Expressão dos receptores de dopamina tipo D₁ (RD1) em hipocampo de ratos *Wistar* (n=5) e *WAR* (n=5). **A)** Expressão de RD1. **B)** Imagem representativa. Os dados são expressos em média \pm SEM. Os resultados foram submetidos à análise estatística por meio do teste de T, sendo p<0,05 considerado estatisticamente significativo; * Refere-se à diferença estatística em relação ao grupo *Wistar*.

Anatomicamente, o hipocampo pode ser dividido em sub-regiões: CA1, CA2, CA3 e giro denteado (GD). Assim, buscando o detalhamento da análise do hipocampo em relação às sub-regiões e expressão de RD1, procedemos à análise imunoistoquímica, permitindo maior especificidade principalmente quanto à CA1, CA3 e giro denteado. Por meio dessa análise, observamos que não houve alteração na expressão de RD1 em animais *WAR* quando comparados aos animais *Wistar* (Figura 15).

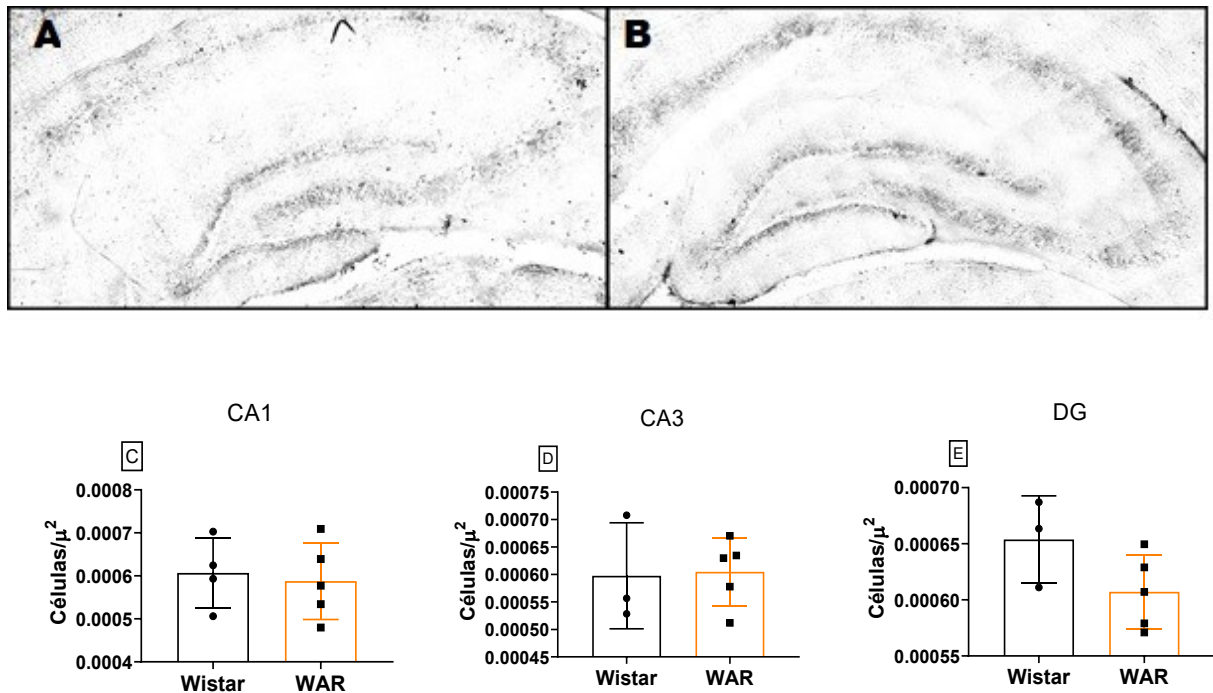


Figura 15. Imunoistoquímica dos receptores de dopamina D₁ (RD1) em hipocampo de ratos *Wistar* (n=4) e *WAR* (n=5). **A)** Imagem representativa da marcação de RD1 em hipocampo de animais *Wistar* **B)** Imagem representativa da marcação de RD1 em hipocampo de animais *WAR* **C)** Quantificação da marcação de RD1 na região de CA1. **D)** Quantificação da marcação de RD1 na região de CA3 **E)** Quantificação da marcação de RD1 na região de DG. Os resultados foram submetidos à análise estatística por meio do teste de T, sendo $p < 0,05$ considerado estatisticamente significativo.

A dopamina, quando liberada no hipocampo, tem um papel relevante na formação da memória (Kempadoo, Mosharov et al. 2016). Estudos demonstraram que a potencialização de longo prazo (PLP) no hipocampo é facilitada por agonistas RD1 e bloqueada na presença de antagonistas RD1 (Chen, Ito et al. 1996, Shohamy and Adcock 2010). Em pacientes apresentando epilepsia do lobo temporal, lesões temporais são frequentemente observadas, com consequente perda neuronal em CA1, CA3 e GD. Esta perda neuronal pode levar a alterações, principalmente relacionadas à aprendizagem e à memória, além de potencializar a ocorrência de novos episódios de crises epiléticas (Thom 2014).

As diferentes vias dopaminérgicas estão relacionadas a várias funções fisiológicas, dentre elas a função motora desempenhada pela via nigroestriatal (Groenewegen 2003, Joshua, Adler et al. 2009). Em função do potencial efeito de variações nessa via na atividade motora e no comportamento dos animais, avaliamos a expressão de RD1 na região do estriado, também por meio de *western blot*. Os resultados mostram que não houve diferença estatisticamente significativa na expressão de RD1 em animais *WAR* quando comparados aos *Wistar* (Figura

16). Além disso, quando realizamos a imunistoquímica para esta região, a mesma ausência de diferença estatisticamente significativa foi observada (Figura 17).

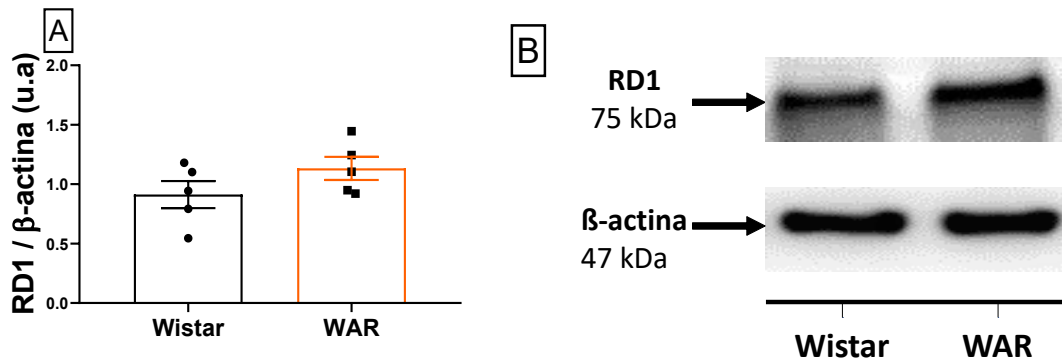


Figura 16. Expressão dos receptores de dopamina D_1 (RD1) no estriado de ratos *Wistar* (n=5) e *WAR* (n=5). A) Expressão de RD1. B) Imagem representativa. Os dados são expressos em média \pm SEM. Os resultados foram submetidos à análise estatística por meio do teste de T, sendo $p < 0,05$ considerado estatisticamente significativo.

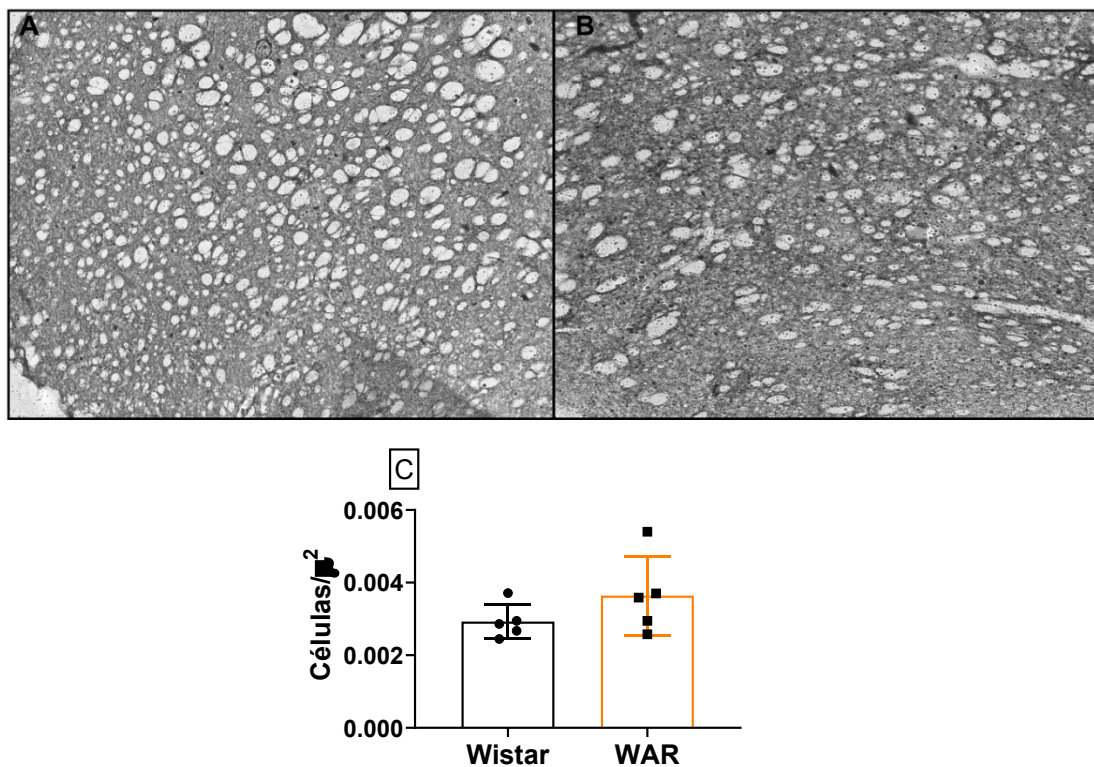


Figura 17. Imunoistoquímica dos receptores de dopamina D_1 (RD1) no estriado de ratos *Wistar* (n=5) e *WAR* (n=5). A) Imagem representativa da marcação de RD1 em estriado de animais *Wistar* B) Imagem representativa da marcação de RD1 em estriado de animais *WAR* C) Quantificação da marcação de RD1 na região do estriado. Os dados são expressos em média \pm SEM. Os resultados foram submetidos à análise estatística por meio do teste de T, sendo $p < 0,05$ considerado estatisticamente significativo.

A via mesocortical origina-se na área tegumentar ventral (ATV) e projeta-se ao córtex pré-frontal, conhecido como um importante regulador do sistema dopaminérgico (Goldman-Rakic and Selemon 1997, Patton, Bizup et al. 2013). Esta via está relacionada a funções cognitivas, memória de trabalho, atenção, aprendizagem e recompensa (Goldman-Rakic and Selemon 1997). O córtex pré-frontal possui duas grandes subdivisões, o córtex infralímbico (IL) e pré-límbico (PrL), que têm projeções diretas para as outras vias dopaminérgicas, como por exemplo para a amígdala basolateral (ABL) e o núcleo accumbens, presentes na via mesolímbica (Vertes 2004, Patton, Bizup et al. 2013). Assim, em função do papel da dopamina nessas vias e o potencial impacto no comportamento dos animais, também buscamos observar a expressão dos receptores dopaminérgicos nessas áreas. Em relação à análise do córtex pré-frontal, não observamos diferença, por meio do *western blot*, na expressão de RD1 em animais *WAR* quando comparados aos animais *Wistar* (Figura 18). No entanto, quando analisada em detalhe por meio da imunistoquímica, observamos aumento estatisticamente significativo da expressão de RD1 em animais *WAR* na sub-região infra-límbica, quando comparados aos animais *Wistar* (Figura 19). De forma similar, observou-se tendência clara de aumento da expressão de RD1 em animais *WAR* na sub-região pré-límbica, quando comparados aos animais *Wistar*. Mesmo que a diferença não tenha se apresentado estatisticamente significativa neste caso, a tendência de aumento é clara, não podendo ser ignorada.

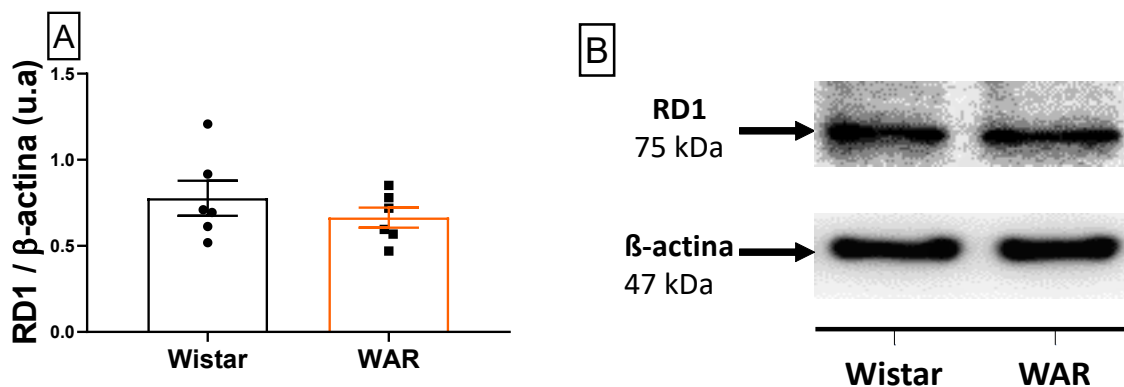


Figura 18. Expressão dos receptores de dopamina D₁ (RD1) no córtex pré-frontal de ratos *Wistar* (n=6) e *WAR* (n=6). A) Expressão de RD1. B) Imagem representativa. Os resultados foram submetidos à análise estatística por meio do teste de T, sendo $p < 0,05$ considerado estatisticamente significativo.

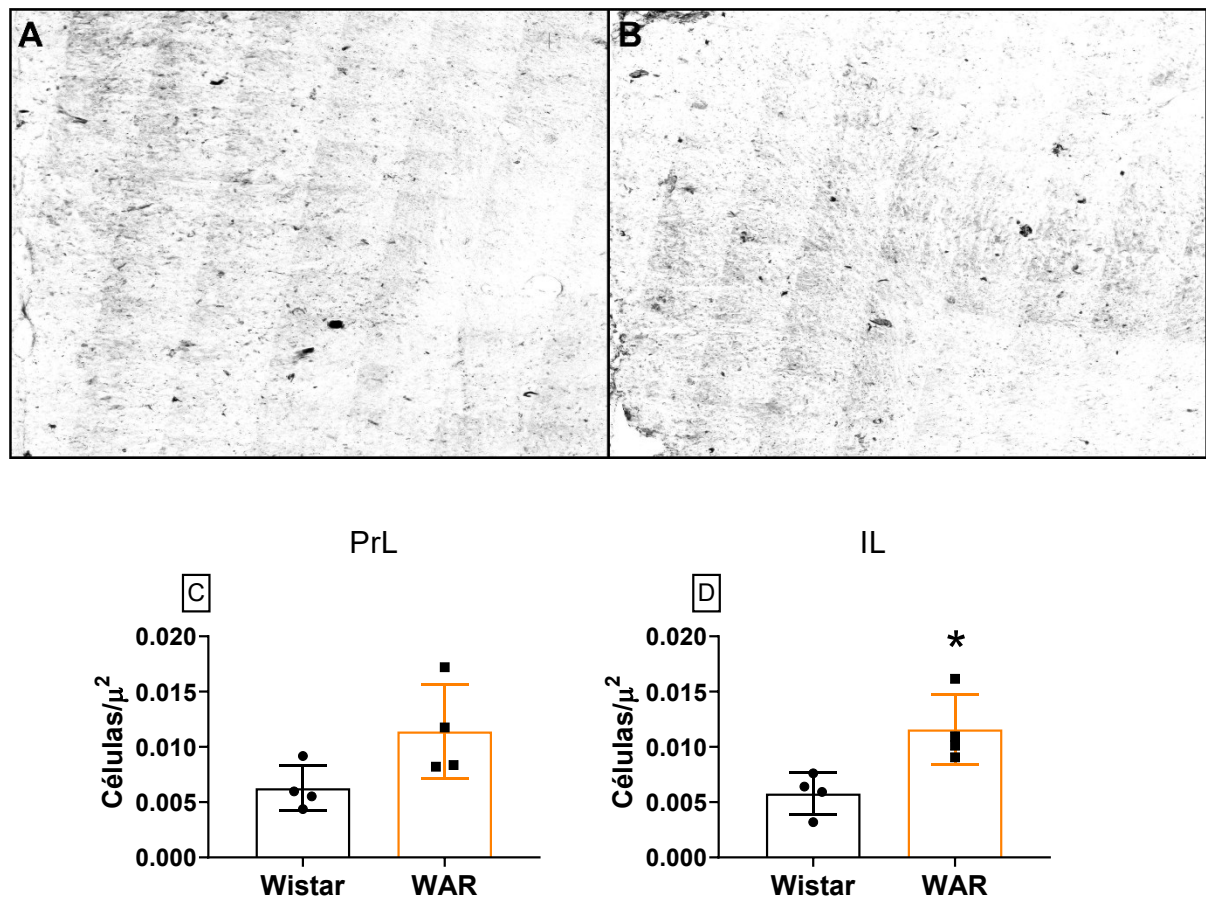


Figura 19. Imunoistoquímica dos receptores de dopamina D₁ (RD1) no córtex pré-frontal de ratos Wistar (n=4) e WAR (n=4). A) Imagem representativa da marcação de RD1 em córtex pré-frontal de animais *Wistar* B) Imagem representativa da marcação de RD1 em córtex pré-frontal de animais *WAR* C) Quantificação da marcação de RD1 na região pré-límbica (PrL). D) Quantificação da marcação de RD1 na região Infra-límbico (IL). Os dados são expressos em média \pm SEM. Os resultados foram submetidos à análise estatística por meio do teste de T, sendo $p < 0,05$ considerado estatisticamente significativo; *Refere-se à diferença estatística em relação ao grupo *Wistar*.

Em um estudo conduzido por Fedosova (2014) em ratos *WAG/Rij*, observaram-se reduções nas concentrações de dopamina e seus metabólitos nos sistemas cerebrais dopaminérgicos meso-cortico-límbico e nigro-estriatal, em animais de cinco a seis meses de idade. Além disso, nessa mesma investigação, cinco estruturas cerebrais - córtex pré-frontal, núcleo accumbens, hipotálamo, corpo estriado e hipocampo - em ratos *WAG/Rij* de 2 meses foram analisadas em comparação aos ratos *Wistar*, observando-se redução significativa de dopamina e seus metabólitos apenas no córtex pré-frontal (Fedosova, Sarkisova et al. 2014).

Outra via dopaminérgica muito importante é a via mesolímbica, que se estende da área tegumentar ventral (ATV), presente no mesencéfalo, se estendendo ao núcleo accumbens e amígdala. Nesta via, a dopamina é responsável por modular respostas comportamentais e o sistema de recompensa. Assim, sua alteração está intimamente relacionada a transtornos

psiquiátricos. A anedonia, uma característica do transtorno depressivo e transtorno bipolar, tem sido relacionada à redução da atividade da dopamina nestas áreas, levando à diminuição na motivação para estímulos recompensadores (Patton, Bizup et al. 2013).

Por fim, a última região avaliada nesta etapa do nosso estudo foi a amígdala, importante estrutura que desempenha papel central no comportamento emocional. Alterações comportamentais têm sido frequentemente associadas a alterações fisiopatológicas na amígdala (Gilpin, Herman et al. 2015, Felix-Ortiz, Burgos-Robles et al. 2016, Braga, Juranek et al. 2022). Além de seu papel nos distúrbios afetivos, a amígdala também desempenha um papel central em epilepsias do lobo temporal devido às extensas conexões que realiza com diferentes regiões do SNC, destacando-se o hipocampo (Pitkänen, Tuunanen et al. 1998).

Em nossos resultados, não observamos alterações na expressão de RD1 na amígdala em animais *WAR* quando comparados aos animais *Wistar* por meio de protocolos experimentais de imunistoquímica desta região (Figura 20).

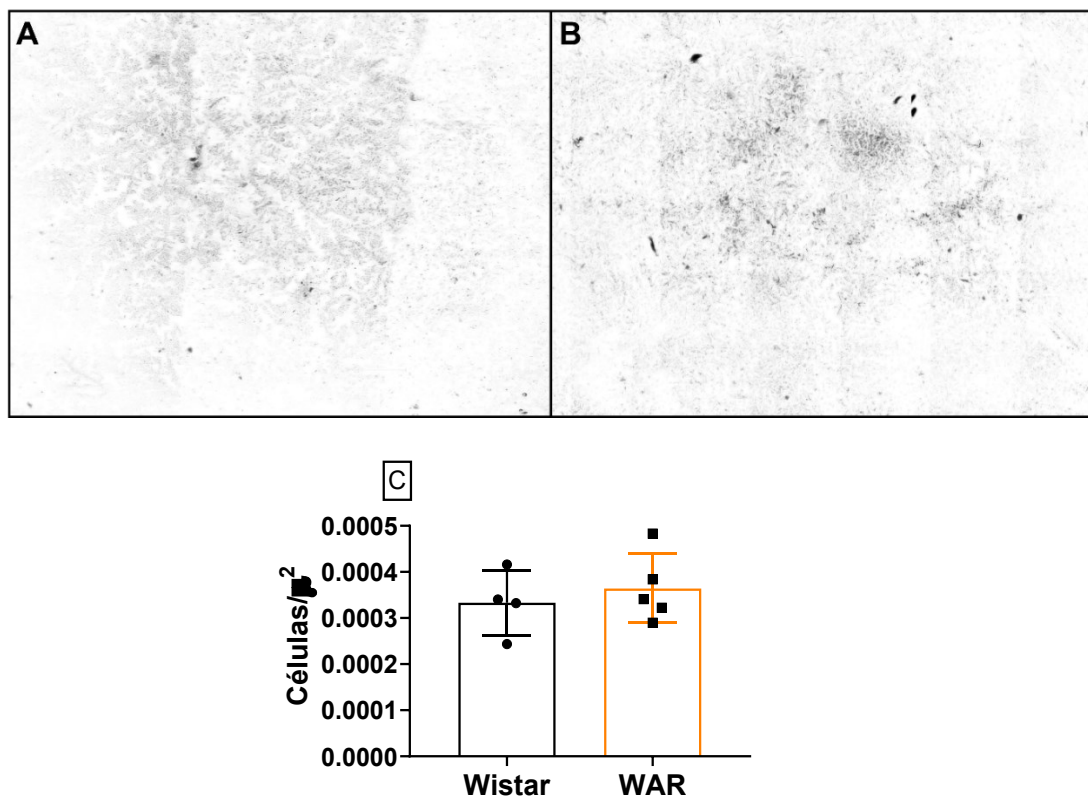


Figura 20. Imunoistoquímica dos receptores de dopamina D₁ (RD1) na amígdala de ratos *Wistar* (n=4) e *WAR* (n=5). A) Imagem representativa da marcação de RD1 na amígdala de animais *Wistar* B) Imagem representativa da marcação de RD1 na amígdala de animais *WAR* C) Quantificação da marcação de RD1 na região basolateral da amígdala. Expressão dos receptores RD1 na amígdala. Os dados são expressos em média \pm SEM. Os resultados foram submetidos à análise estatística por meio do teste de T, sendo $p < 0,05$ considerado estatisticamente significativo.

III.3 Influência da administração intra-amigdalar de agonista RD1 no comportamento e no índice de gravidade das crises dos animais *WAR*

No presente estudo, o desenho experimental objetivou investigar o efeito do agonista no comportamento ansioso e em crises epiléticas, uma vez que diferentes respostas comportamentais frente a diferentes estímulos são descritas na literatura (Starr 1996). Com isso, nossa hipótese é que o uso de agonista D₁ em animais *WAR* com IG baixo (<0,23) acarretaria em uma piora desse índice e um agravamento do comportamento ansioso (Hayashi, Tadokoro et al. 1982, Starr 1996, Baptista, de Senna et al. 2013, Willuhn, Burgeno et al. 2014).

Assim, além de avaliar aspectos bioquímicos das regiões e sub-regiões do encéfalo discutidas anteriormente, analisamos o comportamento similar à ansiedade por meio do teste do labirinto em cruz elevado e os índices de gravidade comportamental por meio do estímulo sonoro, em animais *WAR* e *Wistar* após a administração intramigdalar, na sua porção basolateral (BLA), do agonista dos receptores do tipo D1 (SKF-38393).

Conforme os resultados apresentados na Figura (21B), os animais *WAR* do grupo controle e tratados com SKF-38393 não entraram nos braços abertos do aparato. Além disso, observamos um maior tempo de permanência no braço fechado do aparato dos animais *WAR* tratados com agonista D1 quando comparados aos animais *Wistar* tratados com a mesma substância (Figura 21A). Também foi observada tendência clara no aumento do índice de gravidade comportamental de animais *WAR* tratados com SKF-38393 em relação ao seu índice determinado antes da administração (Figura 22).

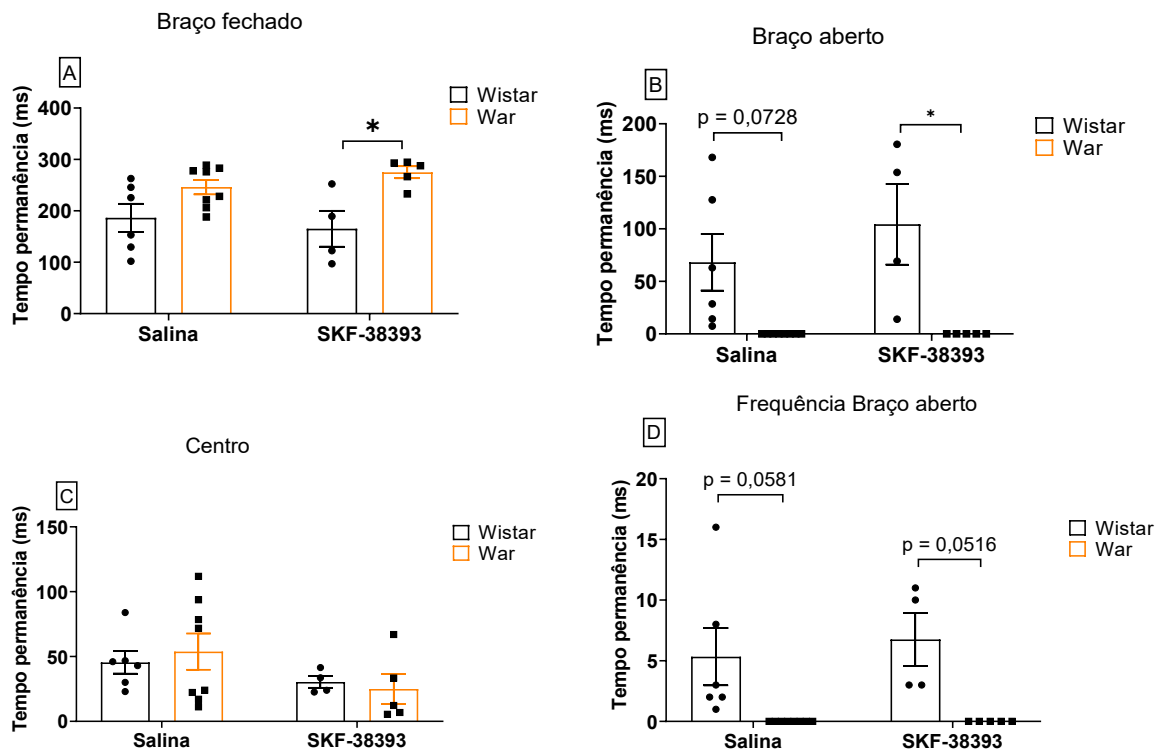


Figura 21. Teste do labirinto em cruz elevado em animais *Wistar* salina (n=6) e *WAR* salina (n=8) *Wistar* SKF-38393 (n=4) e *WAR* SKF-38393 (n=5) A) Tempo de permanência no braço fechado. B) Tempo de permanência no braço aberto. C) Tempo de permanência no centro. D) Frequência de entradas no braço aberto. Os dados são expressos em média \pm SEM. Os resultados foram submetidos à análise estatística por meio do teste de Bonferroni, sendo $p < 0,05$ considerado estatisticamente significativo. * Diferença entre os grupos *Wistar* SKF-38393 e *WAR* SKF-38393.

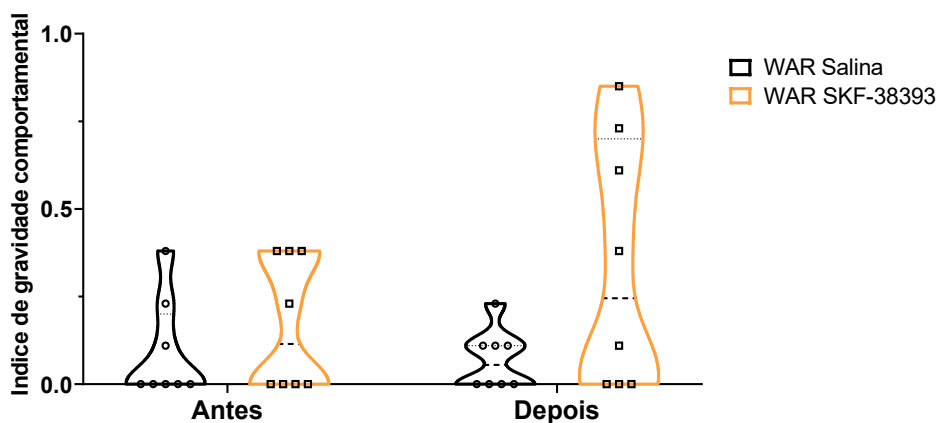


Figura 22. Teste do estímulo sonoro em animais *WAR* salina (n=8) e *WAR* SKF-38393 (n=8) Índice de gravidade comportamental. Os dados são expressos em média \pm SEM. Os resultados foram submetidos à análise estatística por meio do teste de Mann-Whitney, sendo $p < 0,05$ considerado estatisticamente significativo.

A amígdala basolateral é de grande importância para a propagação da atividade epileptogênica. Sua ativação é a principal responsável pela geração de *status epilepticus* (SE), mesmo em modelos animais nos quais as crises epiléticas são iniciadas em regiões extra-amigdalares. Em estudo realizado por Goddard e colaboradores (1969), demonstrou-se que a amígdala tem um dos limiares mais baixos para gerar um animal *kindling*, modelo no qual o animal desenvolve crises epiléticas espontâneas e recorrentes após estimulação elétrica repetida (Goddard, McIntyre et al. 1969). Além disso, a estimulação elétrica prolongada desencadeia SE mais facilmente quando a estimulação é aplicada à ABL (Mohapel, Dufresne et al. 1996, Aroniadou-Anderjaska, Qashu et al. 2007).

Um estudo conduzido por estimulação magnética (EM) por Trindade-Filho (2022) avaliou o efeito da depleção de dopamina nas crises epiléticas em modelo animal de epilepsia por pilocarpina. Em seus resultados, foi observado que a administração de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) na substância negra *pars compacta* levou à redução dos níveis de dopamina no hipocampo. Este resultado sugere que a depleção de dopamina pode ter facilitado a indução do SE (Trindade-Filho, Pai et al. 2022).

Diversos agonistas para os diferentes receptores dopaminérgicos são descritos na literatura, sendo que o agonista do receptor do tipo D1 SKF-38393 é o mais amplamente estudado. Estudo realizado por Löscher e colaboradores (1986) investigou seu efeito em diferentes modelos de epilepsia. Em seu estudo foram avaliados modelos de indução da crise epilética por eletrochoque e administração de pentilenotetrazol (PTZ) em ratos, camundongos e *kindling* amigdalares. Para o modelo de eletrochoque em ratos, SKF-38393 diminuiu o limiar para crises epiléticas. Para camundongos, a substância foi capaz de aumentar o limiar para crises epiléticas em modelo de eletrochoque e não promoveu efeitos no limiar das crises epiléticas em modelo de PTZ. Para o modelo de *kindling* amigdalares, nenhuma alteração nos parâmetros das crises epiléticas foram observados em animais tratados com SKF-38393 (Löscher and Czuczwar 1986).

Como podemos observar, a investigação do papel da dopamina na suscetibilidade a crises epiléticas tem sido um desafio. A dopamina tem sido relacionada à modulação do limiar para crises epiléticas em diversos modelos animais de epilepsia, onde foram observados diferentes resultados quanto ao papel de RD1 na instalação das crises epiléticas (Löscher and Czuczwar 1986, Bo, Soragna et al. 1995, Weinshenker and Szot 2002).

III.4 Resultados das análises bioquímicas de regiões do encéfalo dos animais – RD2

Como apresentado na seção III.2 dos resultados e discussão, nosso estudo teve como objetivo investigar os aspectos bioquímicos relacionados ao sistema dopaminérgico de animais *WAR* a partir da expressão de receptores D₂ (RD2) em diferentes regiões do encéfalo. Para a região do hipocampo, utilizamos a técnica de *imunoblot* de proteínas (*western blot*) para avaliar a expressão de RD2. Nossos resultados demonstram que não houve diferença significativa em animais *WAR* e seus respectivos controles *Wistar* (Figura 21)

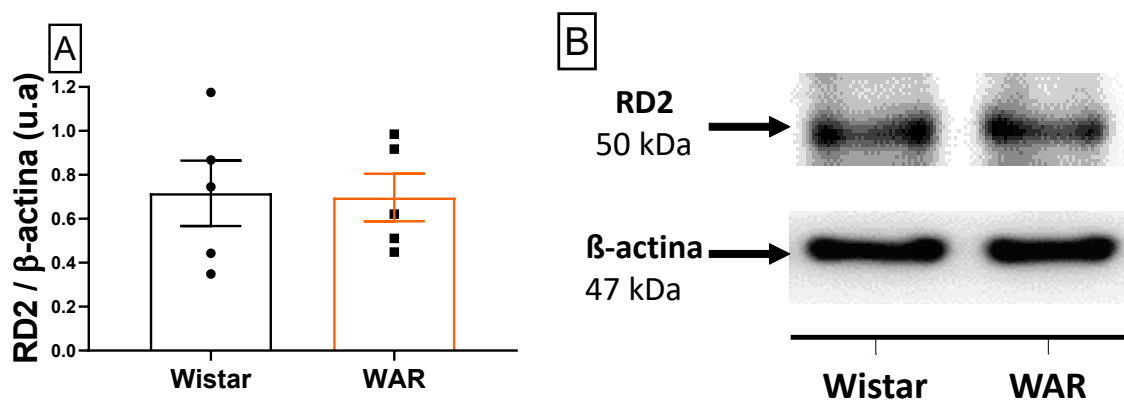


Figura 21. Expressão dos receptores de dopamina D₂ em hipocampo de ratos *Wistar* (n=5) e *WAR* (n=5). A) Expressão de RD2. B) Imagem representativa. Os dados são expressos em média ± SEM. Os resultados foram submetidos à análise estatística por meio do teste de T, sendo p<0,05 considerado estatisticamente significativo; * Refere-se à diferença estatística em relação ao grupo *Wistar*.

Com o objetivo de refinar a análise da expressão desses receptores, conduzimos uma avaliação da marcação da enzima TH e de RD2 por meio da técnica de imunofluorescência. Essa abordagem permite investigar a localização do receptor em neurônios pré e pós-sinápticos. No contexto desse estudo, examinamos a expressão de RD2 no hipocampo em diferentes frações desse tecido. De acordo com as Figuras 22 (G e I), observamos uma diminuição significativa na expressão pré-sináptica do TH e do receptor D₂ na região CA1. Por outro lado, não observamos alterações estatisticamente significativas nas regiões CA3 e giro denteado (DG), como evidenciado pelas Figuras 23 e 24.

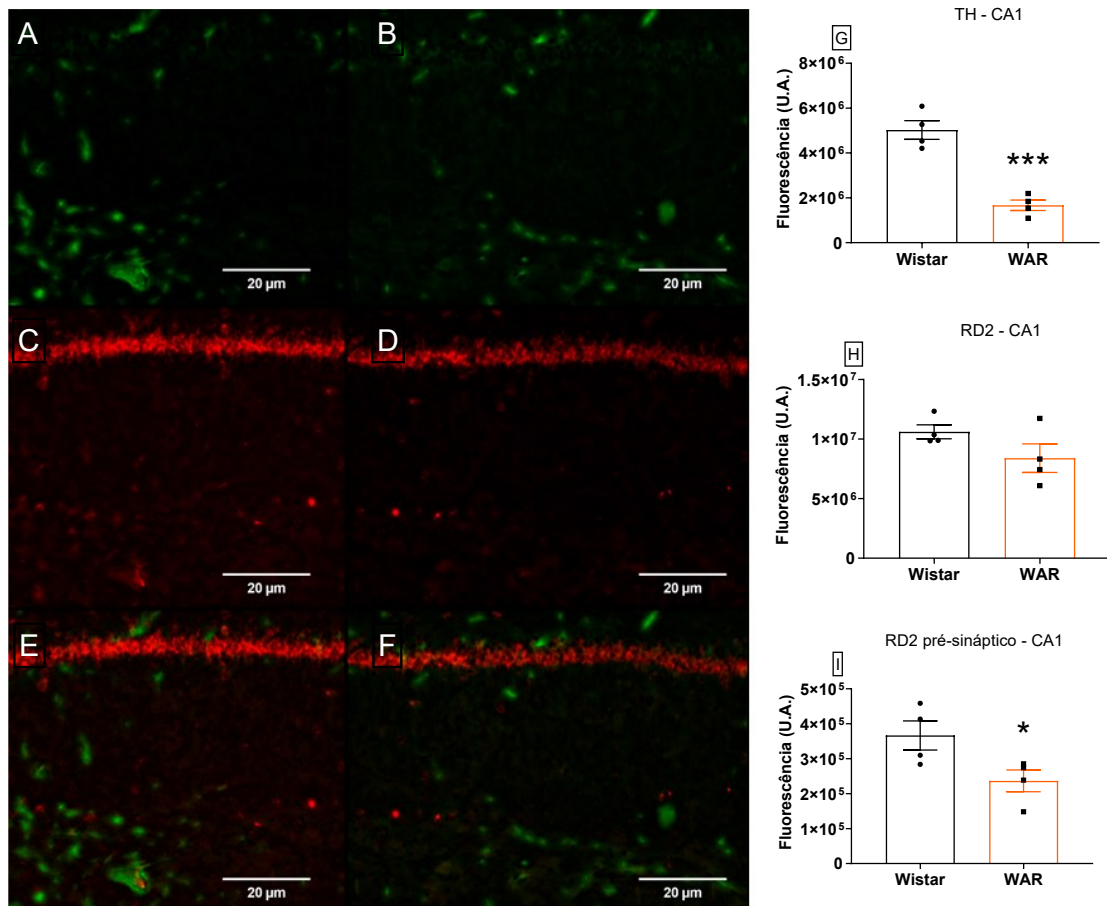


Figura 22. Expressão da enzima tirosina hidroxilase (TH) e receptor de dopamina D₂ (RD2) em fração de hipocampo (CA1) de ratos *Wistar* (n=4) e *WAR* (n=4). **A)** Imagem representativa em aumento de 20 vezes da expressão de TH em animais *Wistar*. **B)** Imagem representativa em aumento de 20 vezes da expressão de TH em animais *WAR*. **C)** Imagem representativa em aumento de 20 vezes da expressão de RD2 em animais em animais *Wistar*. **D)** Imagem representativa em aumento de 20 vezes da expressão de RD2 em animais *WAR*. **E)** Imagem representativa da sobreposição da expressão de TH+ RD2 em animais *Wistar*. **F)** Imagem representativa da sobreposição da expressão de TH + RD2 em animais *WAR*. **G)** Fluorescência emitida pela marcação de TH. **H)** Fluorescência emitida pela marcação de RD2 total **I)** Fluorescência emitida pela marcação de RD1 pré-sináptico. Os dados são expressos em média ± SEM. Foi realizado teste T com $p < 0,05$ considerado estatisticamente significativo; * Refere-se à diferença estatística em relação ao grupo *Wistar*

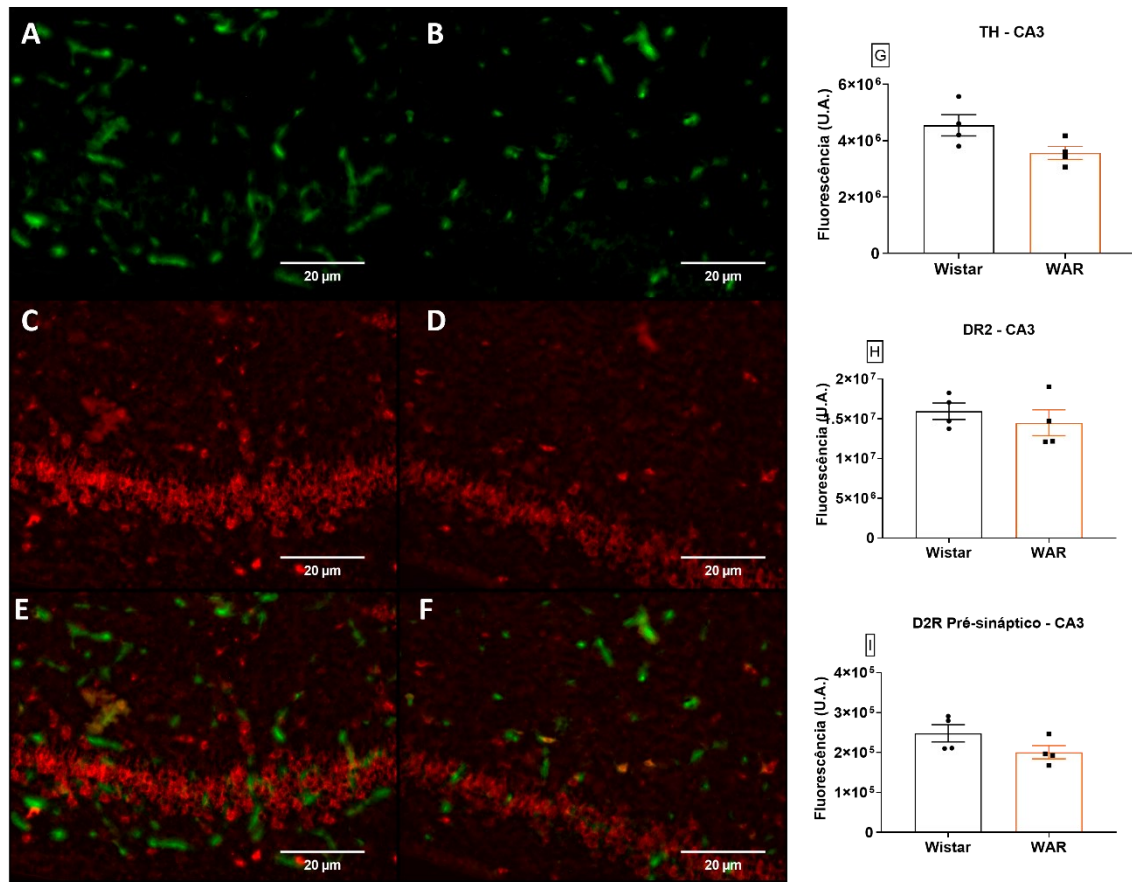


Figura 23. Expressão da enzima tirosina hidroxilase (TH) e receptor de dopamina D₂ (RD2) em fração de hipocampo (CA3) de ratos *Wistar* (n=4) e *WAR* (n=4). **A)** Imagem representativa em aumento de 20 vezes da expressão de TH em animais *Wistar*. **B)** Imagem representativa em aumento de 20 vezes da expressão de TH em animais *WAR*. **C)** Imagem representativa em aumento de 20 vezes da expressão de RD2 em animais em animais *Wistar*. **D)** Imagem representativa em aumento de 20 vezes da expressão de RD2 em animais *WAR*. **E)** Imagem representativa da sobreposição da expressão de TH+ RD2 em animais *Wistar*. **F)** Imagem representativa da sobreposição da expressão de TH + RD2 em animais *WAR*. **G)** Fluorescência emitida pela marcação de TH. **H)** Fluorescência emitida pela marcação de RD2 total **I)** Fluorescência emitida pela marcação de RD1 pré-sináptico. Os dados são expressos em média ± SEM. Foi realizado teste T com $p < 0,05$ considerado estatisticamente significativo; * Refere-se à diferença estatística em relação ao grupo *Wistar*

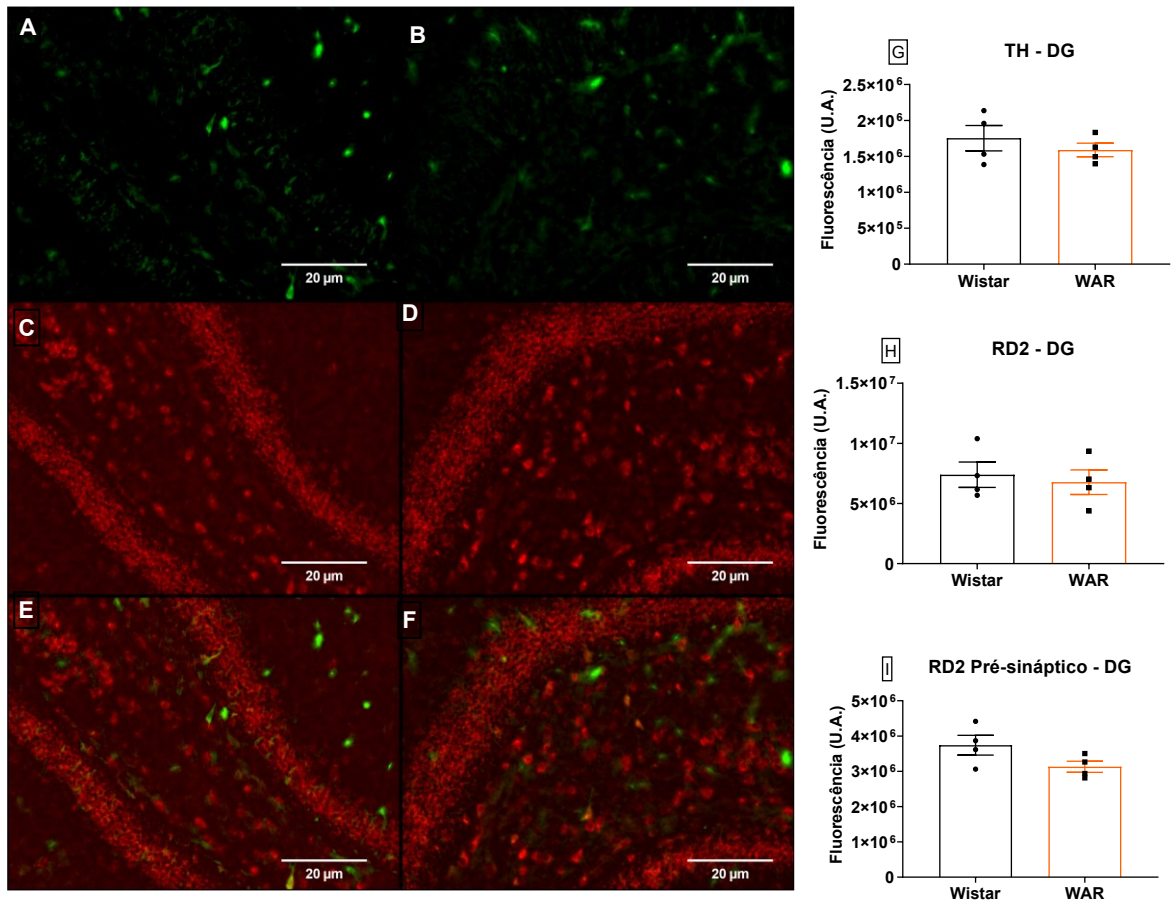


Figura 24. Expressão da enzima tirosina hidroxilase (TH) e receptor de dopamina D₂ (RD2) em fração de hipocampo (DG) de ratos *Wistar* (n=4) e *WAR* (n=4). **A)** Imagem representativa em aumento de 20 vezes da expressão de TH em animais *Wistar*. **B)** Imagem representativa em aumento de 20 vezes da expressão de TH em animais *WAR*. **C)** Imagem representativa em aumento de 20 vezes da expressão de RD2 em animais em animais *Wistar*. **D)** Imagem representativa em aumento de 20 vezes da expressão de RD2 em animais *WAR*. **E)** Imagem representativa da sobreposição da expressão de TH+ RD2 em animais *Wistar*. **F)** Imagem representativa da sobreposição da expressão de TH + RD2 em animais *WAR*. **G)** Fluorescência emitida pela marcação de TH. **H)** Fluorescência emitida pela marcação de RD2 total **I)** Fluorescência emitida pela marcação de RD1 pré-sináptico. Os dados são expressos em média ± SEM. Foi realizado teste T com p<0,05 considerado estatisticamente significativo; * Refere-se à diferença estatística em relação ao grupo *Wistar*

Em um estudo realizado por Clinckers e colaboradores em 2005, foi demonstrada a importância do aumento nos níveis de dopamina (DA) ou serotonina (5-HT) no hipocampo, com efeitos significativos como anticonvulsivantes em um modelo de pilocarpina. Além disso, demonstrou-se que esses efeitos seriam mediados pela estimulação dos receptores RD2 e 5-HT1A (Clinckers, Smolders et al. 2005). Com base nesses achados, sugere-se que substâncias capazes

de aumentar os níveis de DA e 5-HT no hipocampo ou que atuem diretamente em receptores RD2 e 5-HT1A, como agonistas dos neurotransmissores, poderiam apresentar atividade anticonvulsivante.

Outra região que também foi avaliada quanto à expressão dos receptores RD2 por meio do *western blot* foi o estriado. Em nossos resultados, não observamos nenhuma alteração estatisticamente significativa na expressão desses receptores em animais da linhagem *WAR* quando comparados aos animais *Wistar* controle (Figura 25).

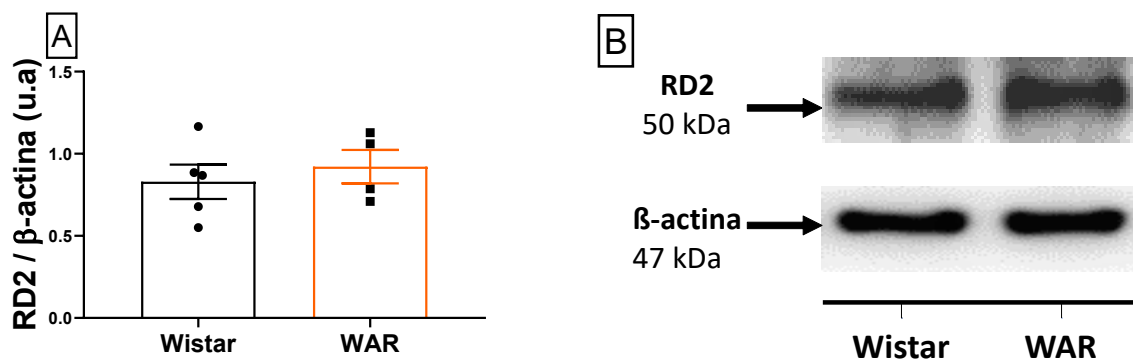


Figura 25. Expressão dos receptores de dopamina D₂ (RD2) no estriado de ratos *Wistar* (n=5) e *WAR* (n=5). A) Expressão de RD2. B) Imagem representativa. Os dados são expressos em média ± SEM. Os resultados foram submetidos à análise estatística por meio do teste de T, sendo p<0,05 considerado estatisticamente significativo.

Assim como no hipocampo, realizamos a quantificação de RD2 e TH para a região do estriado por meio de imunofluorescência. No entanto, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas para a quantificação total e pré-sináptica de RD2 e para a quantificação de TH (Figura 26).

Em estudo conduzido por Birioukova e colaboradores em 2005 utilizando animais *WAG/Rij*, um modelo animal também audiogênico, observou-se diminuição na densidade de receptores do tipo RD1 e RD2 nas regiões do núcleo acumbens e do hipocampo, respectivamente, quando comparados ao grupo controle sem crise epiléptica. Além disso, também foi observada a redução na expressão de RD1 e RD2 na região do estriado (Birioukova, Midzyanovskaya et al. 2005). No entanto, em estudo conduzido por Freitas e colaboradores em 2005, não foram observadas alterações nas densidades de receptores do tipo RD1 e RD2 no hipocampo de animais *Wistar* tratados com pilocarpina (400 mg.kg⁻¹.s.c) (Mendes de Freitas, Aguiar et al. 2005). Os resultados observados na literatura, juntamente com os resultados aqui apresentados

para os *WAR*, sugerem que diferentes modelos animais de epilepsia apresentam alterações distintas na neurotransmissão dopaminérgica.

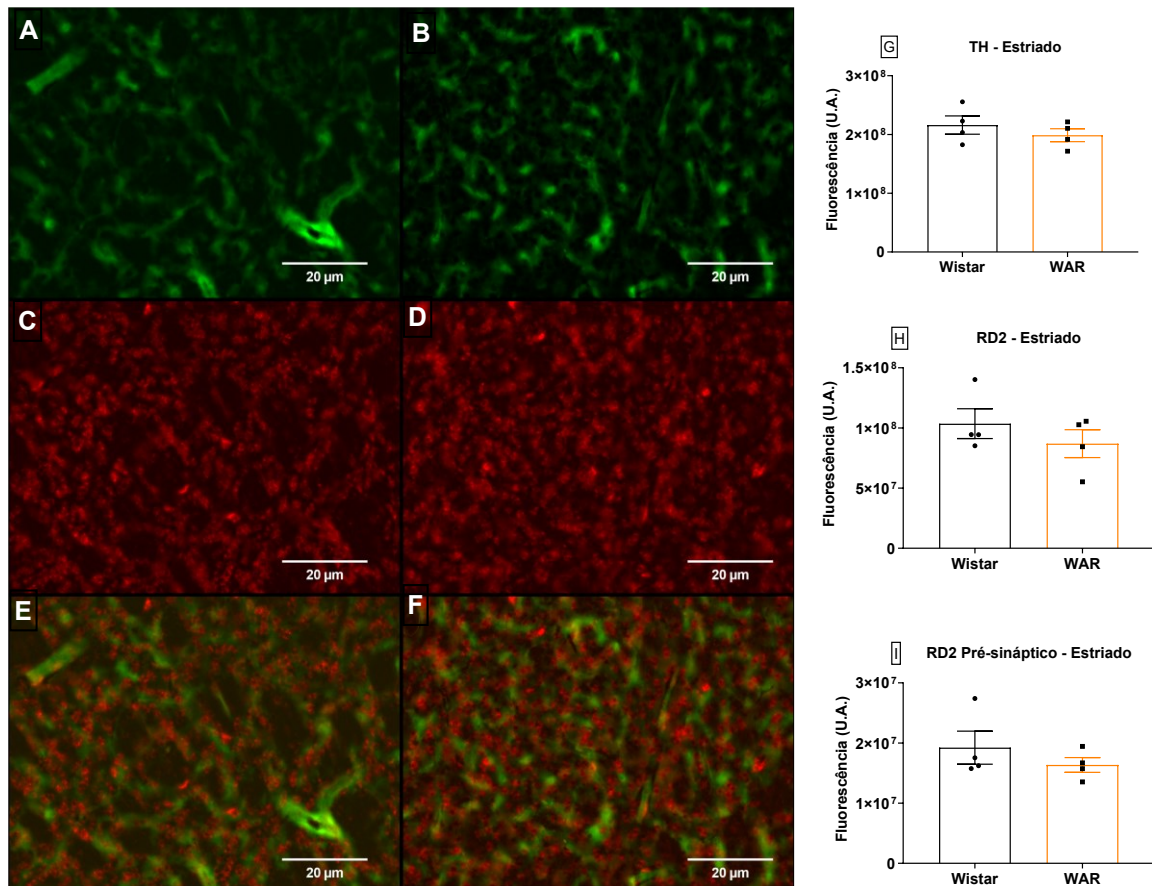


Figura 26. Expressão da enzima tirosina hidroxilase (TH) e receptor de dopamina D₂ (RD2) em fração de estriado de ratos *Wistar* (n=4) e *WAR* (n=4). **A)** Imagem representativa em aumento de 20 vezes da expressão de TH em animais *Wistar*. **B)** Imagem representativa em aumento de 20 vezes da expressão de TH em animais *WAR*. **C)** Imagem representativa em aumento de 20 vezes da expressão de RD2 em animais em animais *Wistar*. **D)** Imagem representativa em aumento de 20 vezes da expressão de RD2 em animais *WAR*. **E)** Imagem representativa da sobreposição da expressão de TH+ RD2 em animais *Wistar*. **F)** Imagem representativa da sobreposição da expressão de TH + RD2 em animais *WAR*. **G)** Fluorescência emitida pela marcação de TH. **H)** Fluorescência emitida pela marcação de RD2 total **I)** Fluorescência emitida pela marcação de RD1 pré-sináptico. Os dados são expressos em média ± SEM. Foi realizado teste T com p<0,05 considerado estatisticamente significativo; * Refere-se à diferença estatística em relação ao grupo *Wistar*.

Em continuidade aos protocolos experimentais propostos, realizamos análises da expressão de RD2 no córtex pré-frontal utilizando *western blot* e imunofluorescência. Em ambos experimentos, não observamos diferença estatisticamente significativa na expressão de RD2 em animais *WAR* quando comparados ao grupo controle *Wistar* (figuras 27 e 28).

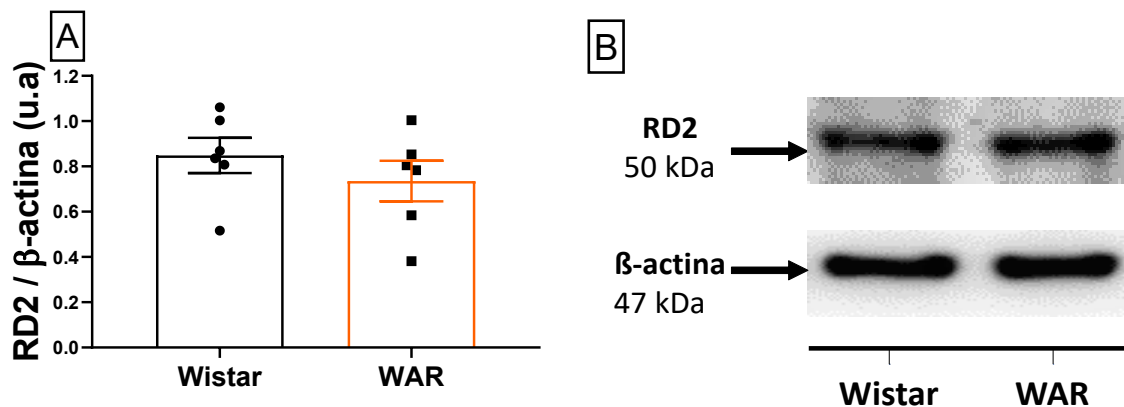


Figura 27. Expressão dos receptores de dopamina D₂ (RD2) no córtex pré-frontal de ratos *Wistar* (n=6) e *WAR* (n=6). A) Expressão de RD2. B) Imagem representativa. Os resultados foram submetidos à análise estatística por meio do teste de T, sendo $p < 0,05$ considerado estatisticamente significativo.

Além de avaliar a densidade de RD2 no estriado e no hipocampo, Birioukova e colaboradores em 2005 também avaliaram em animais *WAG/Rij* a densidade desses receptores no córtex pré-frontal e parietal, observando densidade estatisticamente aumentada para estas regiões nos animais avaliados, utilizando autorradiografia (Birioukova, Midzyanovskaya et al. 2005).

Em 2023, Tsyba e colaboradores compararam a distribuição de receptores RD2 em diferentes modelos de epilepsia. Em seu estudo, foram utilizados os modelos *WAG/Rij* (WR, modelo animal de crise de ausência), o modelo *Krushinsky–Molodkina* (KM, caracterizada por epilepsia audiogênica) e o modelo *WAG/Rij-AGS* (WRA, que manifesta crise audiogênicas). Todos esses modelos foram comparados aos animais *Wistar* controles e, como resultados, observou-se que a ligação do ligante seletivo para RD2 (haloperidol) em regiões específicas do encéfalo nas linhagens de ratos com epilepsia (KM, WR e WRA) foi significativamente menor quando comparada à ligação em ratos *Wistar* nas mesmas regiões (Tsyba, Birioukova et al. 2023).

Em estudo realizado por Freitas e colaboradores em 2006, foi investigada a concentração de dopamina e seus derivados, bem como a densidade de receptores RD1 e RD2 em um modelo utilizando animais *Wistar* tratados com pilocarpina em uma única dose subcutânea de 400 mg.kg⁻¹. Observou-se a redução na concentração de dopamina no córtex pré-frontal após a indução de SE. No entanto, não houve alteração na densidade dos receptores mencionados anteriormente quando comparados ao grupo *Wistar* (Freitas, Oliveira et al. 2006).

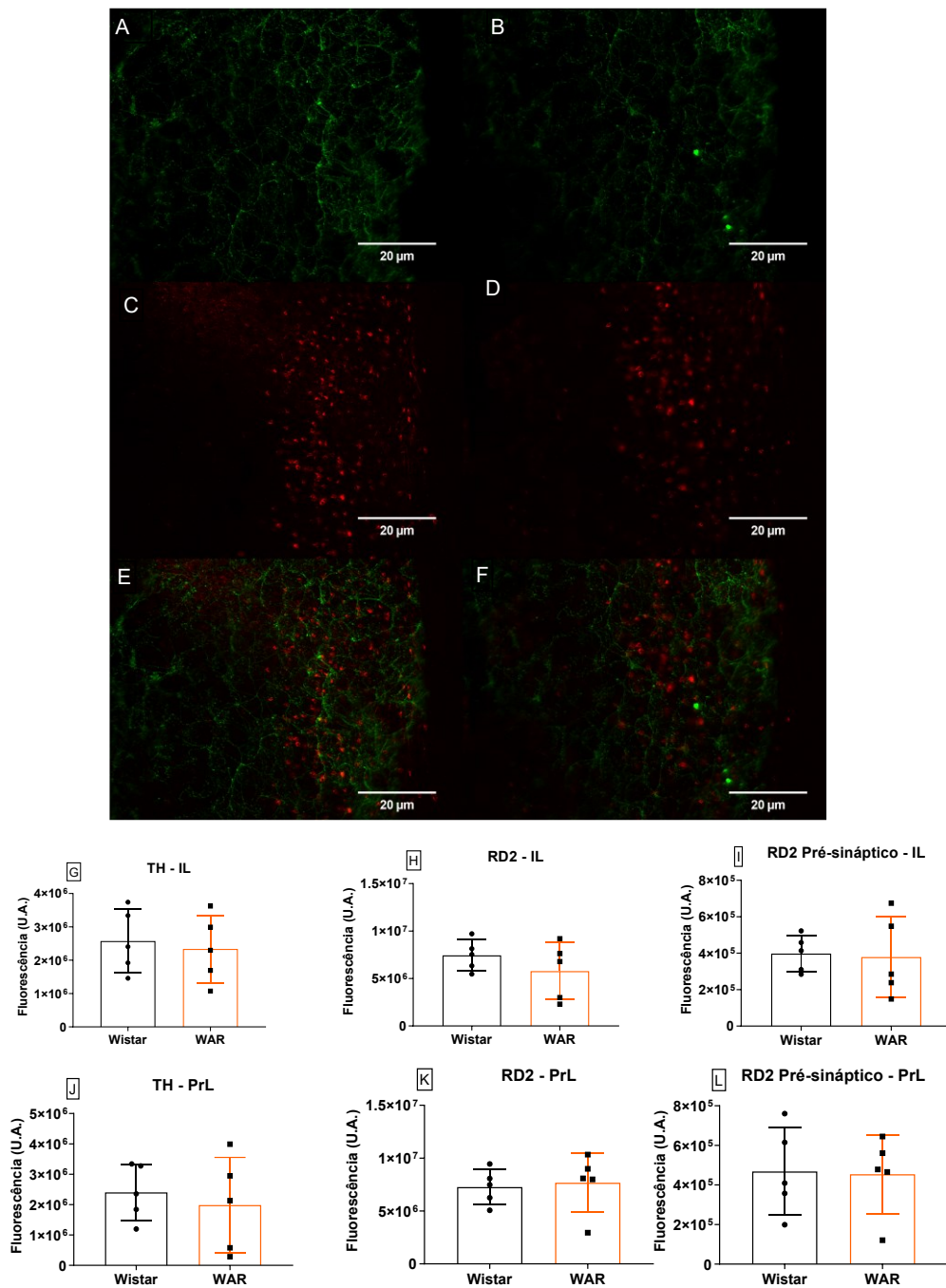


Figura 28. Expressão da enzima tirosina hidroxilase (TH) e receptor de dopamina D₂ (RD2) em fração de córtex pré-frontal de ratos *Wistar* (n=5) e *WAR* (n=5). **A)** Imagem representativa em aumento de 20 vezes da expressão de TH em animais *Wistar*. **B)** Imagem representativa em aumento de 20 vezes da expressão de TH em animais *WAR*. **C)** Imagem representativa em aumento de 20 vezes da expressão de RD2 em animais em animais *Wistar*. **D)** Imagem representativa em aumento de 20 vezes da expressão de RD2 em animais *WAR*. **E)** Imagem representativa da sobreposição da expressão de TH+ RD2 em animais *Wistar*. **F)** Imagem representativa da sobreposição da expressão de TH + RD2 em animais *WAR*. **G)** Fluorescência emitida pela marcação de TH para região IL. **H)** Fluorescência emitida pela marcação de RD2 total para região IL **I)** Fluorescência emitida pela marcação de RD1 pré-sináptico para região IL. **J)** Fluorescência emitida pela marcação de TH para região PrL. **K)**

Fluorescência emitida pela marcação de RD2 total para região PrL L) Fluorescência emitida pela marcação de RD1 pré-sináptico para região PrL. Os dados são expressos em média \pm SEM. Foi realizado teste T com $p < 0,05$ considerado estatisticamente significativo; * Refere-se à diferença estatística em relação ao grupo *Wistar*.

Considerando a importância da amígdala nos transtornos de ansiedade e da associação do núcleo basolateral (BL) a esse comportamento, avaliamos a expressão de RD2 na região BL por meio de imunofluorescência. Observamos uma redução da expressão da enzima TH, bem como uma diminuição geral na expressão de RD2 em animais da linhagem *WAR* quando comparados aos animais *Wistar* (Figura 29). Dessa forma, a redução da presença de RD2 em *WAR* na amígdala pode corroborar para a exacerbação do comportamento ansioso, uma vez que já há relatos a respeito da administração de antagonistas RD2 e a intensificação de comportamento relacionado à ansiedade em animais (de la Mora, Gallegos-Cari et al. 2010).

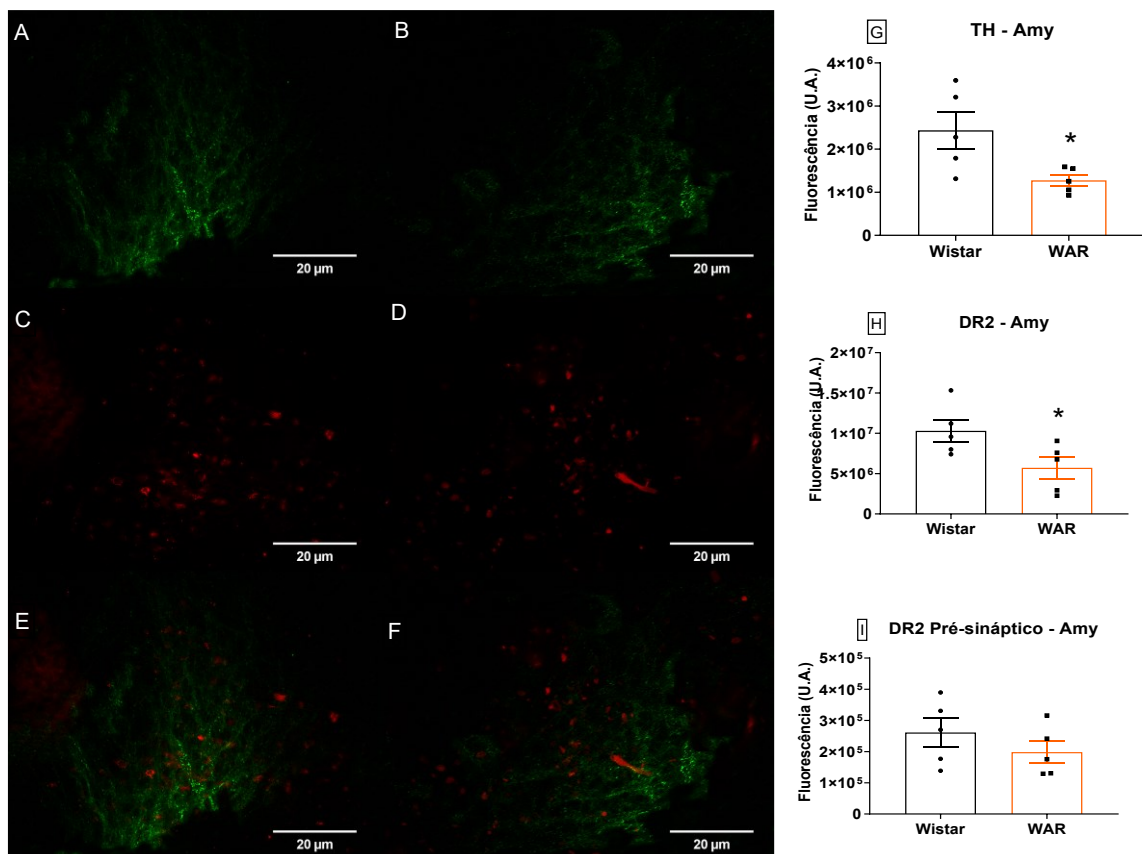


Figura 29. Expressão da enzima tirosina hidroxilase (TH) e receptor de dopamina D₂ (RD2) em fração de amígdala de ratos *Wistar* (n=5) e *WAR* (n=5). A) Imagem representativa em aumento de 20 vezes da expressão de TH em animais *Wistar*. B) Imagem representativa em aumento de 20 vezes da expressão de TH em animais *WAR*. C) Imagem representativa em aumento de 20 vezes da expressão de RD2 em animais em animais *Wistar*. D) Imagem representativa em aumento de 20 vezes da expressão de RD2 em animais *WAR*. E) Imagem representativa da sobreposição da expressão de TH+ RD2 em animais *Wistar*. F) Imagem representativa da

sobreposição da expressão de TH + RD2 em animais *WAR*. **G)** Fluorescência emitida pela marcação de TH **H)** Fluorescência emitida pela marcação de RD2 total **I)** Fluorescência emitida pela marcação de RD1 pré-sináptico. Os dados são expressos em média \pm SEM. Foi realizado teste T com $p < 0,05$ considerado estatisticamente significativo; * Refere-se à diferença estatística em relação ao grupo *Wistar*.

III.5 Influência da administração intra-amigdalar de agonista RD2 no comportamento e no índice de gravidade das crises dos animais *WAR*

A partir dos nossos resultados, que evidenciaram alterações comportamentais e bioquímicas em regiões específicas do cérebro nos animais *WAR* em comparação aos *Wistar*, propusemos um segundo protocolo de tratamento. Nesse protocolo, os animais foram tratados com quimpirole, um agonista RD2, com o objetivo de avaliar o efeito da modulação desse sistema e as conseqüentes alterações no comportamento dos *WAR*. Os animais tratados foram submetidos a dois testes comportamentais: o labirinto em cruz elevado, para avaliar comportamentos relacionados à ansiedade, e o estímulo sonoro, para avaliar comportamentos das crises epiléticas.

Quanto à investigação do efeito do quimpirole no comportamento das crises epiléticas (Figura 30), observamos uma redução no índice de gravidade comportamental (IGC) nos animais *WAR* após o tratamento, em comparação aos índices observados nos mesmos animais antes da administração do agonista. Vale ressaltar que esse mesmo parâmetro foi avaliado em animais *Wistar* antes e depois do tratamento com a substância, e observamos que o IGC não sofreu alteração com o tratamento neste caso, ou seja, os animais *Wistar* não apresentaram qualquer nível de crise antes ou após o tratamento (IGC=0) (n=8).

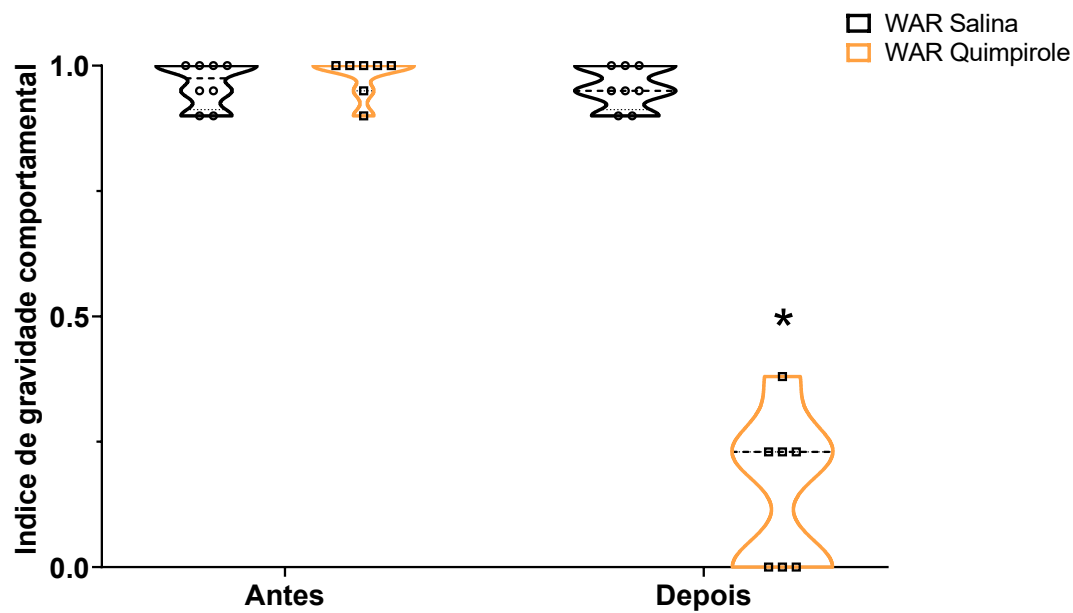


Figura 30. Teste do estímulo sonoro em animais *WAR* salina (n=8) e *WAR* Quimpirole (n=8) Índice de gravidade comportamental. Os dados são expressos em média \pm SEM. Os resultados foram submetidos à análise estatística por meio do teste de Mann-Whitney, sendo $p < 0,05$ considerado estatisticamente significativo. * Diferença entre os grupos WAR salina e WAR Quimpirole.

Em estudo realizado por Turski e colaboradores (1988), foi observado que a administração bilateral de apomorfina, um agonista RD1/RD2, nas regiões do caudado-putâmen anterior, núcleo accumbens ou tubérculo olfatório apresentou efeitos neuroprotetores contra crises epilêpticas induzidas por pilocarpina em ratos. Os resultados indicaram que esse efeito anticonvulsivante está associado aos mecanismos do receptor RD2, em oposição ao receptor RD1, com base no uso de agonistas específicos para cada tipo de receptor (Turski, Cavalheiro et al. 1988).

Em outro estudo realizado por Wahnschaffe e Lfscher, investigou-se o efeito da administração de agonistas dos receptores RD₁ (SKF-38393) e RD₂ (quimpirole) no núcleo acumbens em um modelo animal de *kindling* amigdalár. Os resultados mostraram que todos os parâmetros de *kindling* foram significativamente reduzidos em animais tratados com 4 ou 40 pmol de quimpirole em comparação ao grupo controle. Neste caso, a administração de SKF-38393 na concentração de 40 pmol teve efeitos anticonvulsivantes (Wahnschaffe and Löscher 1991).

Os achados na literatura corroboram com os resultados observados no nosso presente trabalho, pois observamos uma redução no IGC em animais *WAR* após a administração intra-amigdalár de quimpirole. Paralelamente, não observamos alteração significativa no mesmo parâmetro avaliado a administração do agosnista RD1, SKF-38393.

Pacientes com epilepsia podem apresentar comorbidades que ampliam consideravelmente o impacto negativo das crises epiléticas, sendo a ansiedade e a depressão os mais prevalentes. A amígdala, em especial a sua porção basolateral (BL), é a estrutura cerebral envolvida no sistema funcional de formação da ansiedade e do medo (Sah 2017). Nesse processo, as disfunções dos receptores RD1 e RD2 desempenham um papel de grande importância. Portanto, avaliar o efeito de agonistas e antagonistas dopaminérgicos, por meio da administração intra-amigdal, no comportamento de animais em modelos de epilepsia fornece informações valiosas sobre a possibilidade de modular as comorbidades em pacientes com epilepsia.

No teste do labirinto em cruz elevado, observamos que, após o tratamento com quimpirole, os animais *WAR* apresentaram uma frequência estatisticamente significativa e maior tempo de permanência nos braços abertos, resultando em uma diminuição no tempo de permanência nos braços fechados do aparato, em comparação com animais *WAR* do grupo controle (Figura 31A,31B, 31D).

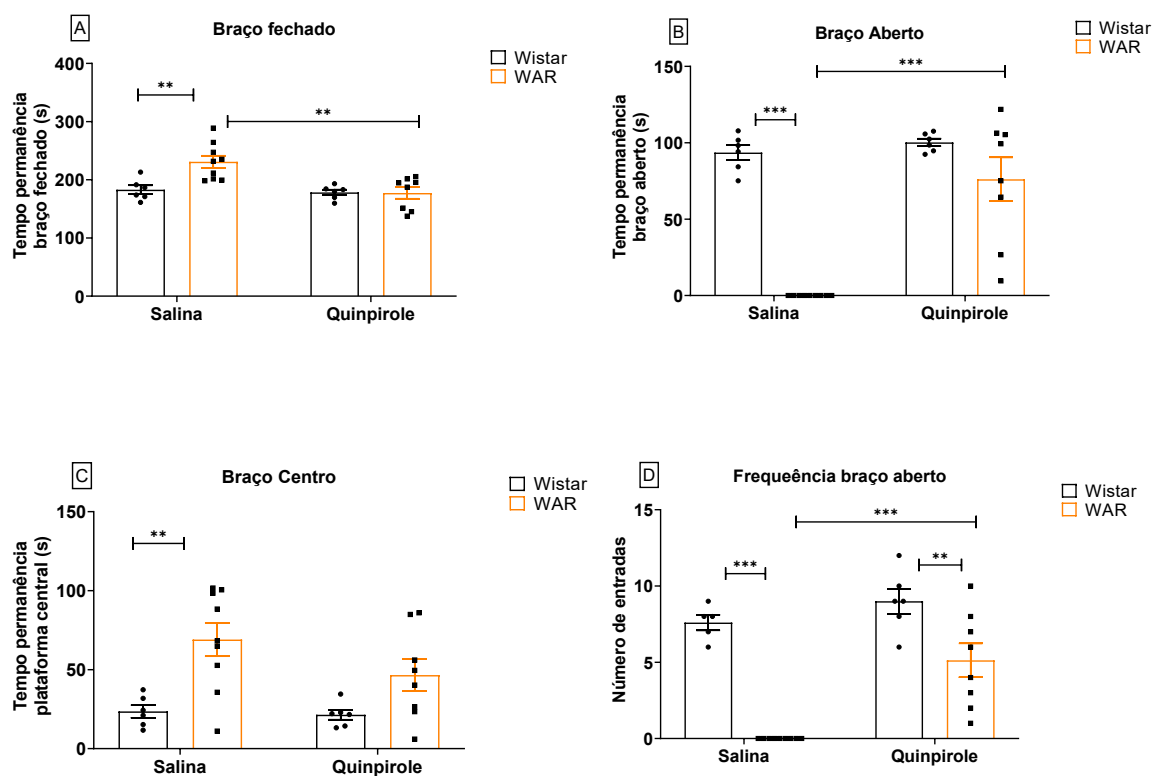


Figura 31. Teste do labirinto em cruz elevado em animais Wistar salina (n=6) WAR salina (n=9) e Wistar salina (n=6) WAR Quimpirole (n=8) A) Tempo de permanência no braço fechado. B) Tempo de permanência no braço aberto. C) Tempo de permanência no centro. D) Frequência de entradas no braço aberto. Os dados são expressos em média \pm SEM. Os resultados foram submetidos à análise estatística por meio do teste de Bonferroni,

sendo $p < 0,05$ considerado estatisticamente significativo. * Diferença entre os grupos WAR Salina e WAR Quimpirole.

Conforme descrito por Castro e colaboradores em 2017, as alterações comportamentais presentes nos animais *WAR* podem estar associadas à sua predisposição a crises epiléticas, fornecendo pistas valiosas quanto à relação entre epilepsia e comorbidades psiquiátricas e cognitivas (Castro, Medeiros et al. 2017).

No teste do labirinto em cruz elevado, os animais evitam os braços abertos devido ao fato deste ambiente ser naturalmente ameaçador, distante do solo, sem proteção, sem paredes ou limites e distante do solo. Isso justifica a maior aversão para explorar os braços abertos em detrimento ao braço fechado. Conforme observado em nossos resultados, quando o quimpirole foi administrado intra-amigdalár, o comportamento dos animais *WAR* foi modificado, levando-os a explorar os braços abertos do aparato. Esses dados sugerem um possível papel ansiolítico do quimpirole no modelo audiogênico *WAR*, instigando investigações adicionais em outros modelos de epilepsia.

Em conjunto, nossos resultados demonstram que o circuito dopaminérgico pode estar relacionado às alterações comportamentais expressas pelos animais *WAR*, em contraste com a condição previamente existente de serem susceptíveis às crises induzidas por estímulo sonoro. Portanto, a modulação desse sistema por meio da administração de agonistas dos receptores RD1 e RD2 pode causar alterações tanto do IGC quanto nos aspectos relacionados ao comportamento tipo-ansioso, corroborando os achados descritos por Castro (2017) (Castro, Medeiros et al. 2017).

IV. Conclusão

Nossos resultados revelam alterações nos parâmetros comportamentais de animais da linhagem *WAR* em comparação com animais *Wistar*, resultados observados no teste do campo aberto e labirinto em cruz elevado. Quanto aos aspectos bioquímicos, observamos diferentes alterações ao examinarmos os diferentes tipos de receptores de dopamina.

No caso dos receptores do tipo D1, ao analisarmos o hipocampo (*western blot*) e o córtex pré-frontal (imunoistoquímica) observamos um aumento na expressão desses receptores em animais *WAR* quando comparados aos animais *Wistar*. Por outro lado, em relação aos receptores do tipo D2, identificamos uma redução na expressão desses receptores em animais *WAR*, comparados aos animais *Wistar*, na região CA1 do hipocampo e na amígdala (imunofluorescência).

Ao conduzirmos experimentos com o agonista DR1 SKF-38393, não constatamos alterações nos parâmetros comportamentais relacionados à ansiedade. Os animais *WAR* não mostraram tendência para entrada nos braços abertos do aparato utilizado para o teste do labirinto em cruz elevado. No entanto, observamos uma possível elevação do IGC após o tratamento, sugerindo a necessidade de investigação complementar para maior compreensão.

Quando utilizamos o agonista RD2 quimpirole no tratamento dos animais, os resultados foram surpreendentemente encorajadores nos aspectos comportamentais. Os animais *WAR* começaram a explorar os braços abertos do aparato no teste do labirinto em cruz elevado, indicando uma modulação do comportamento do tipo ansioso. Além disso, observamos uma redução significativa no IGC dos animais *WAR*, o que aponta para uma modulação também no comportamento convulsivo desse modelo. Os resultados mais expressivos estão compilados na Figura 32, como uma visão geral do trabalho realizado.

Esses achados, que compõem o primeiro estudo avaliando o efeito de um agonista do tipo RD2 em ratos *WAR*, destacam a influência do sistema dopaminérgico nos comportamentos manifestados por esses animais. Essa influência sugere também uma interrelação entre as comorbidades associadas à epilepsia e aos episódios convulsivos observados. Estudos mais aprofundados, tendo foco no efeito dose-resposta, são importantes e complementares aos achados aqui descritos. Adicionalmente, nosso trabalho também estimula análises posteriores relacionadas à bioquímica da neurotransmissão dopaminérgica na epilepsia, permitindo futuros avanços quanto ao entendimento da fisiopatologia da doença e, conseqüentemente, a obtenção de ferramentas mais eficazes para a farmacoterapia, especialmente para casos refratários aos medicamentos atualmente disponíveis.

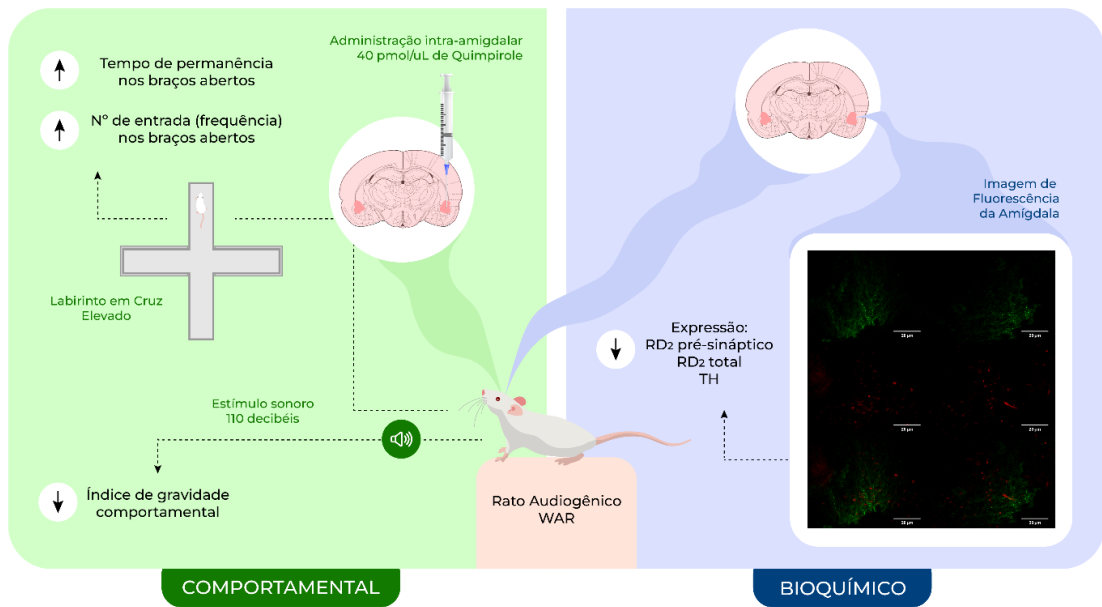


Figura 32: Visão esquemática dos resultados mais expressivos obtidos no presente trabalho

V. Referências

- Aguilar, B. L., L. Malkova, P. N'Gouemo and P. A. Forcelli (2018). "Genetically Epilepsy-Prone Rats Display Anxiety-Like Behaviors and Neuropsychiatric Comorbidities of Epilepsy." Front Neurol **9**: 476.
- Akyuz, E., A. K. Polat, E. Eroglu, I. Kullu, E. Angelopoulou and Y. N. Paudel (2021). "Revisiting the role of neurotransmitters in epilepsy: An updated review." Life Sci **265**: 118826.
- Aroniadou-Anderjaska, V., B. Fritsch, F. Qashu and M. F. Braga (2008). "Pathology and pathophysiology of the amygdala in epileptogenesis and epilepsy." Epilepsy Res **78**(2-3): 102-116.
- Aroniadou-Anderjaska, V., F. Qashu and M. F. Braga (2007). "Mechanisms regulating GABAergic inhibitory transmission in the basolateral amygdala: implications for epilepsy and anxiety disorders." Amino Acids **32**(3): 305-315.
- Avanzini, G. and S. Franceschetti (2003). "Cellular biology of epileptogenesis." Lancet Neurol **2**(1): 33-42.
- Baik, J. H. (2013). "Dopamine signaling in reward-related behaviors." Front Neural Circuits **7**: 152.
- Baptista, P. P., P. N. de Senna, M. F. Paim, L. Saur, M. Blank, P. do Nascimento, J. Ilha, M. R. Vianna, R. G. Mestriner, M. Achaval and L. L. Xavier (2013). "Physical exercise down-regulated locomotor side effects induced by haloperidol treatment in Wistar rats." Pharmacol Biochem Behav **104**: 113-118.
- Barone, P., V. Palma, A. de Bartolomeis, G. Cicarelli and G. Campanella (1992). "Dopaminergic regulation of epileptic activity." Neurochem Int **20 Suppl**: 245S-249S.
- Barone, P., V. Palma, A. DeBartolomeis, E. Tedeschi, G. Muscettola and G. Campanella (1991). "Dopamine D1 and D2 receptors mediate opposite functions in seizures induced by lithium-pilocarpine." Eur J Pharmacol **195**(1): 157-162.
- Beaulieu, J. M., S. Espinoza and R. R. Gainetdinov (2015). "Dopamine receptors - IUPHAR Review 13." Br J Pharmacol **172**(1): 1-23.
- Beaulieu, J. M. and R. R. Gainetdinov (2011). "The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors." Pharmacol Rev **63**(1): 182-217.
- Becker, A. J. (2018). "Review: Animal models of acquired epilepsy: insights into mechanisms of human epileptogenesis." Neuropathol Appl Neurobiol **44**(1): 112-129.
- Beghi, E., A. Carpio, L. Forsgren, D. C. Hesdorffer, K. Malmgren, J. W. Sander, T. Tomson and W. A. Hauser (2010). "Recommendation for a definition of acute symptomatic seizure." Epilepsia **51**(4): 671-675.
- Behr, J., T. Gloveli, D. Schmitz and U. Heinemann (2000). "Dopamine depresses excitatory synaptic transmission onto rat subicular neurons via presynaptic D1-like dopamine receptors." J Neurophysiol **84**(1): 112-119.
- Ben-Ari, Y., E. Tremblay, O. P. Ottersen and B. S. Meldrum (1980). "The role of epileptic activity in hippocampal and "remote" cerebral lesions induced by kainic acid." Brain Res **191**(1): 79-97.

Benturquia, N., C. Courtin, F. Noble and C. Marie-Claire (2008). "Involvement of D1 dopamine receptor in MDMA-induced locomotor activity and striatal gene expression in mice." Brain Res **1211**: 1-5.

Beraldo, H., R. D. Sinisterra, L. R. Teixeira, R. P. Vieira and M. C. Doretto (2002). "An effective anticonvulsant prepared following a host-guest strategy that uses hydroxypropyl-beta-cyclodextrin and benzaldehyde semicarbazone." Biochem Biophys Res Commun **296**(2): 241-246.

Bertram, E. H. (2009). "Temporal lobe epilepsy: where do the seizures really begin?" Epilepsy Behav **14 Suppl 1**(Suppl 1): 32-37.

Birioukova, L. M., I. S. Midzyanovskaya, S. Lensu, L. Tuomisto and G. van Luijteleaer (2005). "Distribution of D1-like and D2-like dopamine receptors in the brain of genetic epileptic WAG/Rij rats." Epilepsy Res **63**(2-3): 89-96.

Bo, P., D. Soragna, E. Marchioni, E. Candeloro, A. Albergati and F. Savoldi (1995). "Role of dopamine D-1 and D-2 antagonists in a model of focal epilepsy induced by electrical stimulation of hippocampus and amygdala in the rabbit." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **19**(5): 917-930.

Bozzi, Y. and E. Borrelli (2006). "Dopamine in neurotoxicity and neuroprotection: what do D2 receptors have to do with it?" Trends Neurosci **29**(3): 167-174.

Bozzi, Y. and E. Borrelli (2013). "The role of dopamine signaling in epileptogenesis." Front Cell Neurosci **7**: 157.

Braga, M. F. M., J. Juraneck, L. E. Eiden, Z. Li, T. H. Figueiredo, M. de Araujo Furtado and A. M. Marini (2022). "GABAergic circuits of the basolateral amygdala and generation of anxiety after traumatic brain injury." Amino Acids **54**(9): 1229-1249.

Bragatti, J. A., C. M. Torres, J. B. Assmann, V. Fontana, C. P. Rigotti, M. P. Hidalgo, M. L. Chaves and M. M. Bianchin (2009). "Left-sided EEG focus and positive psychiatric family history are independent risk factors for affective disorders in temporal lobe epilepsy." Epilepsy Res **87**(2-3): 169-176.

Briellmann, R. S., M. J. Hopwood and G. D. Jackson (2007). "Major depression in temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis: clinical and imaging correlates." J Neurol Neurosurg Psychiatry **78**(11): 1226-1230.

Bromberg-Martin, E. S., M. Matsumoto and O. Hikosaka (2010). "Dopamine in motivational control: rewarding, aversive, and alerting." Neuron **68**(5): 815-834.

Brueggeman, L., M. L. Sturgeon, R. M. Martin, A. J. Grossbach, Y. Nagahama, A. Zhang, M. A. Howard, H. Kawasaki, S. Wu, R. A. Cornell, J. J. Michaelson and A. G. Bassuk (2019). "Drug repositioning in epilepsy reveals novel antiseizure candidates." Ann Clin Transl Neurol **6**(2): 295-309.

Carlsson, A. (1987). "Perspectives on the discovery of central monoaminergic neurotransmission." Annu Rev Neurosci **10**: 19-40.

Carobrez, A. P. and L. J. Bertoglio (2005). "Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on." Neurosci Biobehav Rev **29**(8): 1193-1205.

- Castro, G. P., D. C. Medeiros, L. O. Guarnieri, F. A. G. Mourão, H. P. P. Pinto, G. S. Pereira and M. F. D. Moraes (2017). "Wistar audiogenic rats display abnormal behavioral traits associated with artificial selection for seizure susceptibility." Epilepsy Behav **71**(Pt B): 243-249.
- Cavalheiro, E. A., N. F. Santos and M. R. Priel (1996). "The pilocarpine model of epilepsy in mice." Epilepsia **37**(10): 1015-1019.
- Chatzikonstantinou, A. (2014). "Epilepsy and the hippocampus." Front Neurol Neurosci **34**: 121-142.
- Chen, Z., K. Ito, S. Fujii, M. Miura, H. Furuse, H. Sasaki, K. Kaneko, H. Kato and H. Miyakawa (1996). "Roles of dopamine receptors in long-term depression: enhancement via D1 receptors and inhibition via D2 receptors." Recept Channels **4**(1): 1-8.
- Cifelli, P. and A. A. Grace (2012). "Pilocarpine-induced temporal lobe epilepsy in the rat is associated with increased dopamine neuron activity." Int J Neuropsychopharmacol **15**(7): 957-964.
- Clinckers, R., I. Smolders, A. Meurs, G. Ebinger and Y. Michotte (2004). "Anticonvulsant action of hippocampal dopamine and serotonin is independently mediated by D and 5-HT receptors." J Neurochem **89**(4): 834-843.
- Clinckers, R., I. Smolders, A. Meurs, G. Ebinger and Y. Michotte (2005). "Hippocampal dopamine and serotonin elevations as pharmacodynamic markers for the anticonvulsant efficacy of oxcarbazepine and 10,11-dihydro-10-hydroxycarbamazepine." Neurosci Lett **390**(1): 48-53.
- Conway, C. R., A. Udaiyar and S. C. Schachter (2018). "Neurostimulation for depression in epilepsy." Epilepsy Behav **88S**: 25-32.
- Coppola, G., A. Verrotti, G. Resicato, S. Ferrarelli, G. Auricchio, F. F. Operto and A. Pascotto (2008). "Topiramate in children and adolescents with epilepsy and mental retardation: a prospective study on behavior and cognitive effects." Epilepsy Behav **12**(2): 253-256.
- Coyle, J. T. and P. Puttfarcken (1993). "Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders." Science **262**(5134): 689-695.
- Dawson, G. R. and M. D. Tricklebank (1995). "Use of the elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents." Trends Pharmacol Sci **16**(2): 33-36.
- de la Mora, M. P., A. Gallegos-Cari, Y. Arizmendi-García, D. Marcellino and K. Fuxe (2010). "Role of dopamine receptor mechanisms in the amygdaloid modulation of fear and anxiety: Structural and functional analysis." Prog Neurobiol **90**(2): 198-216.
- Devinsky, O., A. Vezzani, T. J. O'Brien, N. Jette, I. E. Scheffer, M. de Curtis and P. Perucca (2018). "Epilepsy." Nat Rev Dis Primers **4**: 18024.
- Di Maio, R. (2014). "Neuronal mechanisms of epileptogenesis." Front Cell Neurosci **8**: 29.
- Doretto, M. C., C. G. Fonseca, R. B. Lôbo, V. C. Terra, J. A. Oliveira and N. Garcia-Cairasco (2003). "Quantitative study of the response to genetic selection of the Wistar audiogenic rat strain (WAR)." Behav Genet **33**(1): 33-42.

Elger, C. E., S. A. Johnston and C. Hoppe (2017). "Diagnosing and treating depression in epilepsy." Seizure **44**: 184-193.

Engel, J., A. Pitkänen, J. A. Loeb, F. E. Dudek, E. H. Bertram, A. J. Cole, S. L. Moshé, S. Wiebe, F. E. Jensen, I. Mody, A. Nehlig and A. Vezzani (2013). "Epilepsy biomarkers." Epilepsia **54 Suppl 4(0 4)**: 61-69.

Englot, D. J. and H. Blumenfeld (2009). "Consciousness and epilepsy: why are complex-partial seizures complex?" Prog Brain Res **177**: 147-170.

Eshel, N., J. Tian, M. Bukwich and N. Uchida (2016). "Dopamine neurons share common response function for reward prediction error." Nat Neurosci **19(3)**: 479-486.

Fanselow, M. S. and G. D. Gale (2003). "The amygdala, fear, and memory." Ann N Y Acad Sci **985**: 125-134.

Fedosova, E. A., K. I. u. Sarkisova, V. S. Kudrin, V. B. Narkevich, P. M. Klodt and A. S. Bazian (2014). "[Concentrations of monoamines in the brain structures and features of behavior in the two-month old WAG/Rij rats]." Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova **64(5)**: 562-577.

Felix-Ortiz, A. C., A. Burgos-Robles, N. D. Bhagat, C. A. Leppla and K. M. Tye (2016). "Bidirectional modulation of anxiety-related and social behaviors by amygdala projections to the medial prefrontal cortex." Neuroscience **321**: 197-209.

File, S. E. (1993). "The interplay of learning and anxiety in the elevated plus-maze." Behav Brain Res **58(1-2)**: 199-202.

Fisher, R. S., C. Acevedo, A. Arzimanoglou, A. Bogacz, J. H. Cross, C. E. Elger, J. Engel, L. Forsgren, J. A. Franklin, K. B. J. Paxinos, G. (1997) "The mouse brain in stereotaxic coordinates." Academic Press.

French, M. Glynn, D. C. Hesdorffer, B. I. Lee, G. W. Mathern, S. L. Moshé, E. Perucca, I. E. Scheffer, T. Tomson, M. Watanabe and S. Wiebe (2014). "ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy." Epilepsia **55(4)**: 475-482.

Freitas, R. M., A. e. A. Oliveira, S. M. Vasconcelos, F. C. Sousa, G. S. Viana and M. M. Fonteles (2006). "Expression of muscarinic and dopaminergic receptors and monoamine levels frontal cortex of epileptic rats." Pharmacol Biochem Behav **83(2)**: 302-306.

Garcia-Cairasco, N., L. C. Reis, V. C. Terra, J. A. Oliveira and J. Antunes-Rodrigues (1994). "Diuresis and natriuresis in non-seizing and in kindled rats from a genetically audiogenic susceptible strain." Neuroreport **5(15)**: 1873-1876.

Garcia-Cairasco, N. and R. M. Sabbatini (1989). "Neuroethological evaluation of audiogenic seizures in hemidetelencephalated rats." Behav Brain Res **33(1)**: 65-77.

Garcia-Cairasco, N., E. H. L. Umeoka and J. A. Cortes de Oliveira (2017). "The Wistar Audiogenic Rat (WAR) strain and its contributions to epileptology and related comorbidities: History and perspectives." Epilepsy Behav.

- Giannakopoulou, A., G. A. Lyras and N. Grigoriadis (2017). "Long-term effects of autoimmune CNS inflammation on adult hippocampal neurogenesis." J Neurosci Res **95**(7): 1446-1458.
- Gilpin, N. W., M. A. Herman and M. Roberto (2015). "The central amygdala as an integrative hub for anxiety and alcohol use disorders." Biol Psychiatry **77**(10): 859-869.
- Goddard, G. V., D. C. McIntyre and C. K. Leech (1969). "A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation." Exp Neurol **25**(3): 295-330.
- Goldman-Rakic, P. S. and L. D. Selemon (1997). "Functional and anatomical aspects of prefrontal pathology in schizophrenia." Schizophr Bull **23**(3): 437-458.
- Greengard, P. (2001). "The neurobiology of slow synaptic transmission." Science **294**(5544): 1024-1030.
- Groenewegen, H. J. (2003). "The basal ganglia and motor control." Neural Plast **10**(1-2): 107-120.
- Grone, B. P. and S. C. Baraban (2015). "Animal models in epilepsy research: legacies and new directions." Nat Neurosci **18**(3): 339-343.
- Guarnieri, L. O., A. R. Pereira-Caixeta, D. C. Medeiros, N. S. S. Aquino, R. E. Szawka, E. M. A. M. Mendes, M. F. D. Moraes and G. S. Pereira (2020). "Pro-neurogenic effect of fluoxetine in the olfactory bulb is concomitant to improvements in social memory and depressive-like behavior of socially isolated mice." Transl Psychiatry **10**(1): 33.
- Hayashi, T., S. Tadokoro, H. Hashimoto and M. Nakashima (1982). "Enhancement of avoidance-suppressing effect after repeated administration of haloperidol and serum haloperidol in rats." Pharmacol Biochem Behav **17**(1): 131-136.
- Hingray, C., A. McGonigal, I. Kotwas and J. A. Micoulaud-Franchi (2019). "The Relationship Between Epilepsy and Anxiety Disorders." Curr Psychiatry Rep **21**(6): 40.
- ILAE. ILAE Classification of the Epilepsies (2017). Disponível em: <https://www.ilae.org/guidelines/definition-and-classification/ilae-classification-of-the-epilepsies-2017>. Acesso em: 10 set. 2021.
- Jones, N. C., M. R. Salzberg, G. Kumar, A. Couper, M. J. Morris and T. J. O'Brien (2008). "Elevated anxiety and depressive-like behavior in a rat model of genetic generalized epilepsy suggesting common causation." Exp Neurol **209**(1): 254-260.
- Joshua, M., A. Adler and H. Bergman (2009). "The dynamics of dopamine in control of motor behavior." Curr Opin Neurobiol **19**(6): 615-620.
- Kang, H. C., B. L. Eun, C. Wu Lee, H. Ku Moon, J. S. Kim, D. Wook Kim, J. Soo Lee, K. Young Chae, B. Ho Cha, E. Sook Suh, J. Chae Park, K. Lim, E. Hye Ha, D. Ho Song, H. Dong Kim and K. P. T. S. Group (2007). "The effects on cognitive function and behavioral problems of topiramate compared to carbamazepine as monotherapy for children with benign rolandic epilepsy." Epilepsia **48**(9): 1716-1723.

Kanner, A. M. (2011). "Depression and epilepsy: A bidirectional relation?" Epilepsia **52 Suppl 1**: 21-27.

Kanner, A. M., S. C. Schachter, J. J. Barry, D. C. Hesdorffer, D. C. Hersdorffer, M. Mula, M. Trimble, B. Hermann, A. E. Ettinger, D. Dunn, R. Caplan, P. Ryvlin, F. Gilliam and W. C. LaFrance (2012). "Depression and epilepsy: epidemiologic and neurobiologic perspectives that may explain their high comorbid occurrence." Epilepsy Behav **24**(2): 156-168.

Kempadoo, K. A., E. V. Mosharov, S. J. Choi, D. Sulzer and E. R. Kandel (2016). "Dopamine release from the locus coeruleus to the dorsal hippocampus promotes spatial learning and memory." Proc Natl Acad Sci U S A **113**(51): 14835-14840.

Kim, J. J., H. J. Lee, J. S. Han and M. G. Packard (2001). "Amygdala is critical for stress-induced modulation of hippocampal long-term potentiation and learning." J Neurosci **21**(14): 5222-5228.

Leeb, K., L. Parker and R. Eikelboom (1991). "Effects of pimozone on the hedonic properties of sucrose: analysis by the taste reactivity test." Pharmacol Biochem Behav **39**(4): 895-901.

LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR and R. J. RANDALL (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem **193**(1): 265-275.

Lévesque, M. and M. Avoli (2013). "The kainic acid model of temporal lobe epilepsy." Neurosci Biobehav Rev **37**(10 Pt 2): 2887-2899.

Lévesque, M., G. Biagini, M. de Curtis, V. Gnatkovsky, J. Pitsch, S. Wang and M. Avoli (2021). "The pilocarpine model of mesial temporal lobe epilepsy: Over one decade later, with more rodent species and new investigative approaches." Neurosci Biobehav Rev **130**: 274-291.

Löscher, W. (2017). "Animal Models of Seizures and Epilepsy: Past, Present, and Future Role for the Discovery of Antiseizure Drugs." Neurochem Res **42**(7): 1873-1888.

Löscher, W. and S. J. Czuczwar (1986). "Studies on the involvement of dopamine D-1 and D-2 receptors in the anticonvulsant effect of dopamine agonists in various rodent models of epilepsy." Eur J Pharmacol **128**(1-2): 55-65.

Medlej, Y., H. Salah, L. Wadi, S. Saad, R. Asdikian, N. Karnib, D. Ghazal, B. Bashir, J. Allam and M. Obeid (2019). "Overview on Emotional Behavioral Testing in Rodent Models of Pediatric Epilepsy." Methods Mol Biol **2011**: 345-367.

Mei, D., V. Cetica, C. Marini and R. Guerrini (2019). "Dravet syndrome as part of the clinical and genetic spectrum of sodium channel epilepsies and encephalopathies." Epilepsia **60 Suppl 3**: S2-S7.

Meiser, J., D. Weindl and K. Hiller (2013). "Complexity of dopamine metabolism." Cell Commun Signal **11**(1): 34.

Mendes de Freitas, R., L. M. Aguiar, S. M. Vasconcelos, F. C. Sousa, G. S. Viana and M. M. Fonteles (2005). "Modifications in muscarinic, dopaminergic and serotonergic receptors concentrations in the hippocampus and striatum of epileptic rats." Life Sci **78**(3): 253-258.

- Missale, C., S. R. Nash, S. W. Robinson, M. Jaber and M. G. Caron (1998). "Dopamine receptors: from structure to function." Physiol Rev **78**(1): 189-225.
- Mohapel, P., C. Dufresne, M. E. Kelly and D. C. McIntyre (1996). "Differential sensitivity of various temporal lobe structures in the rat to kindling and status epilepticus induction." Epilepsy Res **23**(3): 179-187.
- Morse, A. C., V. G. Erwin and B. C. Jones (1993). "Strain and housing affect cocaine self-selection and open-field locomotor activity in mice." Pharmacol Biochem Behav **45**(4): 905-912.
- Nestler, E. J. and W. A. Carlezon (2006). "The mesolimbic dopamine reward circuit in depression." Biol Psychiatry **59**(12): 1151-1159.
- Paxinos, George, and Charles Watson (2006). "The rat brain in stereotaxic coordinates." Elsevier.
- Parreira, G. M., M. D. A. Resende, I. J. P. Garcia, D. B. Sartori, E. H. L. Umeoka, L. D. Godoy, N. Garcia-Cairasco, L. A. Barbosa, H. L. Santos and C. Q. Tilelli (2018). "Oxidative stress and Na,K-ATPase activity differential regulation in brainstem and forebrain of Wistar Audiogenic rats may lead to increased seizure susceptibility." Brain Res **1679**: 171-178.
- Patton, M. H., B. T. Bizup and A. A. Grace (2013). "The infralimbic cortex bidirectionally modulates mesolimbic dopamine neuron activity via distinct neural pathways." J Neurosci **33**(43): 16865-16873.
- Pellow, S., P. Chopin, S. E. File and M. Briley (1985). "Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat." J Neurosci Methods **14**(3): 149-167.
- Pitkänen, A., J. Tuunanen, R. Kälviäinen, K. Partanen and T. Salmenperä (1998). "Amygdala damage in experimental and human temporal lobe epilepsy." Epilepsy Res **32**(1-2): 233-253.
- Pohlmann-Eden, B., A. Aldenkamp, G. A. Baker, C. Brandt, F. Cendes, R. Coras, C. E. Crocker, C. Helmstaedter, M. Jones-Gotman, A. M. Kanner, A. Mazarati, M. Mula, M. L. Smith, A. Omisade, J. Tellez-Zenteno and B. P. Hermann (2015). "The relevance of neuropsychiatric symptoms and cognitive problems in new-onset epilepsy - Current knowledge and understanding." Epilepsy Behav **51**: 199-209.
- Prut, L. and C. Belzung (2003). "The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review." Eur J Pharmacol **463**(1-3): 3-33.
- Reddy, D. S., W. Thompson and G. Calderara (2021). "Molecular mechanisms of sex differences in epilepsy and seizure susceptibility in chemical, genetic and acquired epileptogenesis." Neurosci Lett **750**: 135753.
- Riney, K., A. Bogacz, E. Somerville, E. Hirsch, R. Nabbout, I. E. Scheffer, S. M. Zuberi, T. Alsaadi, S. Jain, J. French, N. Specchio, E. Trinka, S. Wiebe, S. Auvin, L. Cabral-Lim, A. Naidoo, E. Perucca, S. L. Moshé, E. C. Wirrell and P. Tinuper (2022). "International League Against Epilepsy classification and definition of epilepsy syndromes with onset at a variable age: position statement by the ILAE Task Force on Nosology and Definitions." Epilepsia **63**(6): 1443-1474.
- Rocha, L., M. Alonso-Vanegas, S. Orozco-Suárez, D. Alcántara-González, H. Cruzblanca and E. Castro (2014). "Do certain signal transduction mechanisms explain the comorbidity of epilepsy and mood disorders?" Epilepsy Behav **38**: 25-31.

- Rodgers, R. J. and A. Dalvi (1997). "Anxiety, defence and the elevated plus-maze." Neurosci Biobehav Rev **21**(6): 801-810.
- Rusina, E., C. Bernard and A. Williamson (2021). "The Kainic Acid Models of Temporal Lobe Epilepsy." eNeuro **8**(2).
- Sah, P. (2017). "Fear, Anxiety, and the Amygdala." Neuron **96**(1): 1-2.
- Sahu, A., K. R. Tyeryar, H. O. Vongtau, D. R. Sibley and A. S. Undieh (2009). "D5 dopamine receptors are required for dopaminergic activation of phospholipase C." Mol Pharmacol **75**(3): 447-453.
- Samba Reddy, D. and G. Ramanathan (2012). "Finasteride inhibits the disease-modifying activity of progesterone in the hippocampus kindling model of epileptogenesis." Epilepsy Behav **25**(1): 92-97.
- Sankaraneni, R. and D. Lachhwani (2015). "Antiepileptic drugs--a review." Pediatr Ann **44**(2): e36-42.
- Sarkar, C., B. Basu, D. Chakroborty, P. S. Dasgupta and S. Basu (2010). "The immunoregulatory role of dopamine: an update." Brain Behav Immun **24**(4): 525-528.
- Sarkisova, K. and G. van Luijtelaaar (2011). "The WAG/Rij strain: a genetic animal model of absence epilepsy with comorbidity of depression [corrected]." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **35**(4): 854-876.
- Saukkonen, A., R. Kälviäinen, K. Partanen, P. Vainio, P. Riekkinen and A. Pitkänen (1994). "Do seizures cause neuronal damage? A MRI study in newly diagnosed and chronic epilepsy." Neuroreport **6**(1): 219-223.
- Savic, I. and J. Engel (2014). "Structural and functional correlates of epileptogenesis - does gender matter?" Neurobiol Dis **70**: 69-73.
- Scorza, F. A., R. M. Arida, M. a. G. Naffah-Mazzacoratti, D. A. Scerni, L. Calderazzo and E. A. Cavalheiro (2009). "The pilocarpine model of epilepsy: what have we learned?" An Acad Bras Cienc **81**(3): 345-365.
- Seibenhener, M. L. and M. C. Wooten (2015). "Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice." J Vis Exp(96): e52434.
- Shih, J. J., W. O. Tatum and L. A. Rudzinski (2013). "New drug classes for the treatment of partial onset epilepsy: focus on perampanel." Ther Clin Risk Manag **9**: 285-293.
- Shohamy, D. and R. A. Adcock (2010). "Dopamine and adaptive memory." Trends Cogn Sci **14**(10): 464-472.
- Silveira, M. C., G. Sandner and F. G. Graeff (1993). "Induction of Fos immunoreactivity in the brain by exposure to the elevated plus-maze." Behav Brain Res **56**(1): 115-118.
- Sithisarn, T., H. S. Bada, H. Dai, D. C. Randall and S. J. Legan (2011). "Effects of perinatal cocaine exposure on open field behavior and the response to corticotropin releasing hormone (CRH) in rat offspring." Brain Res **1370**: 136-144.

- Starr, M. S. (1996). "The role of dopamine in epilepsy." Synapse **22**(2): 159-194.
- Stevens, J. R. (1999). "Epilepsy, schizophrenia, and the extended amygdala." Ann N Y Acad Sci **877**: 548-561.
- Taubøll, E., L. Sveberg and S. Svalheim (2015). "Interactions between hormones and epilepsy." Seizure **28**: 3-11.
- Tellez-Zenteno, J. F., S. B. Patten, N. Jetté, J. Williams and S. Wiebe (2007). "Psychiatric comorbidity in epilepsy: a population-based analysis." Epilepsia **48**(12): 2336-2344.
- Thom, M. (2014). "Review: Hippocampal sclerosis in epilepsy: a neuropathology review." Neuropathol Appl Neurobiol **40**(5): 520-543.
- Thurman, D. J., E. Beghi, C. E. Begley, A. T. Berg, J. R. Buchhalter, D. Ding, D. C. Hesdorffer, W. A. Hauser, L. Kazis, R. Kobau, B. Kroner, D. Labiner, K. Liow, G. Logroscino, M. T. Medina, C. R. Newton, K. Parko, A. Paschal, P. M. Preux, J. W. Sander, A. Selassie, W. Theodore, T. Tomson, S. Wiebe and I. C. o. Epidemiology (2011). "Standards for epidemiologic studies and surveillance of epilepsy." Epilepsia **52 Suppl 7**: 2-26.
- Trindade-Filho, E. M., J. D. Pai, D. N. Castro, A. T. M. D. Silva, A. F. Costa, J. S. S. Vieira, S. D. B. D. Santos, V. B. Félix, S. A. B. F. Leão, L. I. Zambrano, A. J. M. Saldanha-Filho, E. G. A. Carvalho, J. B. N. Cavalcante, G. B. Quintella, A. T. S. Lino, M. V. Costa, J. A. Lima, M. M. A. Tavares, M. R. de Melo, K. C. Mousinho, C. L. C. L. Biase, M. L. Leite, P. J. M. S. Costa, E. L. Becker, I. M. F. B. Moura and J. C. D. Silva (2022). "Dopamine depletion in wistar rats with epilepsy." Braz J Biol **84**: e248411.
- Tsyba, E. T., L. M. Birioukova, I. S. Midzyanovskaya, N. M. Surina and K. R. Abbasova (2023). "Brain D2-Like Dopamine Receptor Distribution in Rats with Different Types of Genetic Epilepsy." Dokl Biol Sci **509**(1): 140-144.
- Turski, L., E. A. Cavalheiro, Z. A. Bortolotto, C. Ikonomidou-Turski, Z. Kleinrok and W. A. Turski (1988). "Dopamine-sensitive anticonvulsant site in the rat striatum." J Neurosci **8**(11): 4027-4037.
- Vertes, R. P. (2004). "Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat." Synapse **51**(1): 32-58.
- Wahnschaffe, U. and W. Löscher (1991). "Anticonvulsant effects of ipsilateral but not contralateral microinjections of the dopamine D2 agonist LY 171555 into the nucleus accumbens of amygdala-kindled rats." Brain Res **553**(2): 181-187.
- Walf, A. A. and C. A. Frye (2007). "The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents." Nat Protoc **2**(2): 322-328.
- Wang, Q., S. Yu, A. Simonyi, G. Y. Sun and A. Y. Sun (2005). "Kainic acid-mediated excitotoxicity as a model for neurodegeneration." Mol Neurobiol **31**(1-3): 3-16.
- Weinshenker, D. and P. Szot (2002). "The role of catecholamines in seizure susceptibility: new results using genetically engineered mice." Pharmacol Ther **94**(3): 213-233.

Werner, F. M. and R. Coveñas (2017). "Classical neurotransmitters and neuropeptides involved in generalized epilepsy in a multi-neurotransmitter system: How to improve the antiepileptic effect?" Epilepsy Behav **71**(Pt B): 124-129.

Willner, P. and P. J. Mitchell (2002). "The validity of animal models of predisposition to depression." Behav Pharmacol **13**(3): 169-188.

Willner, P., A. Towell, D. Sampson, S. Sophokleous and R. Muscat (1987). "Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant." Psychopharmacology (Berl) **93**(3): 358-364.

Willuhn, I., L. M. Burgeno, P. A. Groblewski and P. E. Phillips (2014). "Excessive cocaine use results from decreased phasic dopamine signaling in the striatum." Nat Neurosci **17**(5): 704-709.

Wise, R. A. (2004). "Dopamine, learning and motivation." Nat Rev Neurosci **5**(6): 483-494.

Witt, J. A., C. E. Elger and C. Helmstaedter (2015). "Adverse cognitive effects of antiepileptic pharmacotherapy: Each additional drug matters." Eur Neuropsychopharmacol **25**(11): 1954-1959.

WHO.Epilepsy.2019.Disponível: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy> . Acesso em: 10 Set. 2021.

Xiong, S. L., G. T. Lim, S. J. Yin, J. Lee, Y. X. Si, J. M. Yang, Y. D. Park and G. Y. Qian (2019). "The inhibitory effect of pyrogallol on tyrosinase activity and structure: Integration study of inhibition kinetics with molecular dynamics simulation." Int J Biol Macromol **121**: 463-471.

Zhao, F., Z. Cheng, J. Piao, R. Cui and B. Li (2022). "Dopamine Receptors: Is It Possible to Become a Therapeutic Target for Depression?" Front Pharmacol **13**: 947785.

Zimcikova, E., J. Simko, I. Karesova, J. Kremlacek and J. Malakova (2017). "Behavioral effects of antiepileptic drugs in rats: Are the effects on mood and behavior detectable in open-field test?" Seizure **52**: 35-40.

VI. Anexos

CAMILA OLIVEIRA PEREIRA

ESTIMULAÇÃO INTRA-AMIGDALAR DO RECEPTOR DE DOPAMINA D1 (SKF-38393) E SEU EFEITO COMPORTAMENTAL EM MODELO AUDIOGÊNICO SEMELHANTE À EPILEPSIA

Monografia de Conclusão de Curso, como requisito parcial, para obter o grau de Bacharela em Farmácia apresentada ao Colegiado de Coordenação Didática do Curso de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Pinto Vieira. UFMG
Coorientadora: MSc Gabriela Machado Parreira. UFMG

Aprovado em

Comissão Examinadora



Prof(a) Dr. ANTÔNIO CARLOS PINHEIRO DE OLIVEIRA
EXAMINADOR (ICB/UFMG)

Documento assinado digitalmente
gov.br MARCELLA NUNES DE MELO BRAGA
Data: 14/12/2022 15:00:38-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof(a) Dra. MARCELLA NUNES DE MELO BRAGA
EXAMINADOR (ICB/UFMG)

Documento assinado digitalmente
gov.br RAFAEL PINTO VIEIRA
Data: 14/12/2022 14:27:01-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Orientador(a) Prof(a). Dr. RAFAEL PINTO VIEIRA
ICB/UFMG

Documento assinado digitalmente
gov.br GABRIELA MACHADO PARREIRA
Data: 14/12/2022 18:58:37-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Coorientador(a) MSc. GABRIELA MACHADO PARREIRA
ICB/UFMG

Aprovação homologada pelo Colegiado de Coordenação Didática do Curso de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais no dia ___ de _____.

Prof(a). MÁRCIO M. COELHO E SIMONE A. M. MENDONÇA
Coordenador(a) do Colegiado de Coordenação Didática do Curso de Farmácia da
Universidade Federal de Minas Gerais

BELO HORIZONTE

2022

Douglas Alves Melgaço

ESTUDO COMPARATIVO DA EXPRESSÃO DE RECEPTORES
DOPAMINÉRGICOS EM UM MODELO DE EPILEPSIA

Monografia de Conclusão do Curso de Farmácia da
Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de
Minas Gerais, defendida e aprovada no dia 08 de
Dezembro de 2022.

Orientador Professor Rafael Pinto Vieira

Co-orientadora MsC Gabriela Machado Parreira

Comissão Examinadora

Documento assinado digitalmente
gov.br BEATRIZ CAMPOS CODO
Data: 15/12/2022 15:51:01-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

BsC. Beatriz Campos Codo / ICB/UFMG

Documento assinado digitalmente
gov.br FILIPE NOGUEIRA FRANCO
Data: 15/12/2022 10:45:14-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

MsC. Filipe Nogueira Franco / ICB/UFMG

Documento assinado digitalmente
gov.br GABRIELA MACHADO PARREIRA
Data: 15/12/2022 16:32:06-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Co-orientadora

MsC Gabriela Machado Parreira / ICB/UFMG

Documento assinado digitalmente
gov.br RAFAEL PINTO VIEIRA
Data: 14/12/2022 14:36:12-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Orientador(a)

Professor(a) Rafael Pinto Vieira / ICB/UFMG

Aprovação homologada pelo Colegiado de Coordenação Didática do Curso de Farmácia da
Universidade Federal de Minas Gerais.

Professor Márcio de Matos Coelho

Coordenador(a) do Colegiado de Coordenação Didática do Curso de Farmácia da Universidade
Federal de Minas Gerais



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 233/2019

Título do projeto: Efeito de moduladores da neurotransmissão dopaminérgica no comportamento e na expressão de receptores em modelos experimentais de epilepsia

Finalidade: Pesquisa

Pesquisador responsável: Rafael Pinto Vieira

Unidade: Instituto de Ciências Biológicas

Departamento: Departamento de Bioquímica e Imunologia

Situação atual: [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado na reunião do dia 04/11/2019. Validade: 04/11/2019 à 03/11/2024
Belo Horizonte, 04/11/2019.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br

Review > [Curr Neuropharmacol. 2023;21\(2\):219-234.](#)

doi: [10.2174/1570159X20666220922153903](https://doi.org/10.2174/1570159X20666220922153903).

Receptors for Advanced Glycation End Products (RAGE): Promising Targets Aiming at the Treatment of Neurodegenerative Conditions

Suélyn Koerich ¹, Gabriela Machado Parreira ², Douglas Lamounier de Almeida ¹, Rafael Pinto Vieira ², Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira ¹

Affiliations + expand

PMID: 36154605 DOI: [10.2174/1570159X20666220922153903](https://doi.org/10.2174/1570159X20666220922153903)

Abstract

Advanced glycation end products (AGEs) are compounds formed after the non-enzymatic addition of reducing sugars to lipids, proteins, and nucleic acids. They are associated with the development of various clinical complications observed in diabetes and cardiovascular diseases, such as retinopathy, nephropathy, diabetic neuropathy, and others. In addition, compelling evidence indicates that these molecules participate in the progression of neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and amyotrophic lateral sclerosis. Multiple cellular and molecular alterations triggered by AGEs that could alter homeostasis have been identified. One of the main targets for AGE signaling is the receptor for advanced glycation end-products (RAGE). Importantly, this receptor is the target of not only AGEs, but also amyloid β peptides, HMGB1 (high-mobility group box-1), members of the S100 protein family, and glycosaminoglycans. The activation of this receptor induces intracellular signaling cascades that are involved in pathological processes and cell death. Therefore, RAGE represents a key target for pharmacological interventions in neurodegenerative diseases. This review will discuss the various effects of AGEs and RAGE activation in the pathophysiology of neurodegenerative diseases, as well as the currently available pharmacological tools and promising drug candidates.

Nanomaterials for Viral Detection

[Pedro Augusto Machado Vitor](#) & [Gabriela Machado Parreira](#)

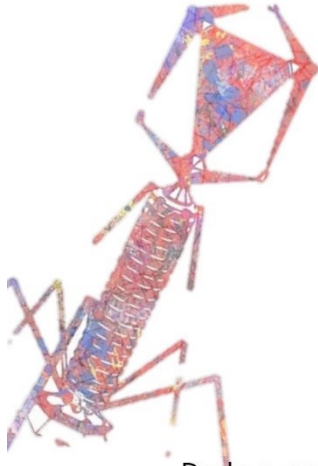
Chapter | [First Online: 22 October 2021](#)

686 Accesses

Part of the [Engineering Materials](#) book series (ENG.MAT.)

Abstract

The mass testing tactic is among the main strategies to fight a virus pandemic. It allows for an early diagnosis in the initial phase of the disease and reduces disease transmission. In this sense, there is a growing interest in developing devices with high sensitivity, selectivity, and fast detections. With this purpose, nanobiosensors are presented as a promising alternative, produced from nanomaterials with different structures and properties. On biosensing, NMs comprise transduction elements (transducers) associated with biomarkers to recognize and amplify different signals when interacting with biological material. The primary transducers involve optical and electrochemical methods. Gold nanoparticles (AuNPs) and carbon-based, such as graphene, graphene oxide, and carbon nanotube (CNT), make up most NMs used in biosensing. For such application, the use of magnetic nanoparticles (MNPs) and quantum dots (QDs) of different compositions, such as the basis of cadmium and tellurium (CdTe QDs), are also widely studied. In addition to applications in biosensing, nanomaterials can be applied in biomarker immobilization and extraction procedure in standard tests such as RT-PCR and LFIA (ELISA). NMs allow for the improvement of different techniques used in viral detection, presenting diverse and unique solutions for health crisis moments, including for Covid-19.



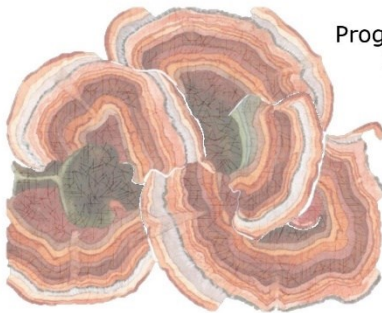
DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que **MSc. Gabriela Machado Parreira** ministrou aulas na disciplina **"Bioquímica Celular"**, com carga horária de 12 horas, no Curso de Especialização em Diagnóstico Microbiológico, do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Belo Horizonte, 15 de dezembro de 2022.

Nalu Teixeira de Aguiar Peres

Profa. Nalu Teixeira de Aguiar Peres
 Coordenadora do Curso de Especialização em
 Diagnóstico Microbiológico.
 Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
 Universidade Federal de Minas Gerais






IUPAB 45th Annual SBBF Meeting 50th Annual SBBq Meeting
 20th IUPAB Congress 13th Annual SBBN Congress

Certificate

MODULATORS OF DOPAMINERGIC NEUROTRANSMISSION: EFFECTS ON THE BEHAVIOR AND EXPRESSION OF RECEPTORS IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF EPILEPSY

by authors: **GABRIELA MACHADO PARREIRA , IVAN LOBO DE SOUSA MARQUES, MÁRCIO FLÁVIO DUTRA MORAES, LEONARDO DE OLIVEIRA GUARNIERI, RAFAEL PINTO VIEIRA**

was presented during the 20th International Union for Pure and Applied Biophysics (IUPAB), 50th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 45th Congress of 50th Brazilian Society of Biophysics (SBBf) and 13th Brazilian Society on Nuclear Biosciences Congress (SBBN), virtually, Brazil, on October 4th to 8th, 2021.


 Rosangela Itri


 Mauricio da Silva Baptista

Chairs of the IUPAB Congress

Diamond Sponsor: 

Gold Sponsor:    

Silver Sponsor: 

Organization:  

Support:     




IUPAB 45th Annual SBBF Meeting 50th Annual SBBq Meeting
 20th IUPAB Congress 13th Annual SBBN Congress

Certificate

We hereby certify that

GABRIELA MACHADO PARREIRA

attended the 20th International Union for Pure and Applied Biophysics (IUPAB), 50th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 45th Congress of 50th Brazilian Society of Biophysics (SBBf) and 13th Brazilian Society on Nuclear Biosciences Congress (SBBN), virtually, Brazil, on October 4th to 8th


 Rosangela Itri


 Mauricio da Silva Baptista

Chairs of the IUPAB Congress

Diamond Sponsor: 

Gold Sponsor:    

Silver Sponsor: 

Organization:  

Support:     

22/03/2023, 11:19

[https://carretel.grude.ufmg.br/mail/icb/biq/prof/vieirarp.nsf/\(%24Inbox\)/B3B15C110585FBAD0325897A003B40E3/?OpenDoc...](https://carretel.grude.ufmg.br/mail/icb/biq/prof/vieirarp.nsf/(%24Inbox)/B3B15C110585FBAD0325897A003B40E3/?OpenDoc...)

Dear Asma,

Hope this message finds you well. According to the draft you sent us (in attachment), our chapter would be part of the Vol 11 in Frontiers in Clinical Drug Research - CNS and Neurological Disorders.

According to link below, it is not included in Vol 11.

<https://benthambooks.com/book/9789815123319/preface/>

Thank you in advance and I'll be waiting for your response

Prof. Dr. Rafael Pinto Vieira
Departamento de Bioquímica e Imunologia
Lab Q4-167 - Instituto de Ciências Biológicas - UFMG
Av. Presidente Antônio Carlos, 6627, Pampulha, CEP 31270-901
Belo Horizonte-MG Brasil
+55 31 3409 2639
lattes.cnpq.br/2300064372165096
<https://scholar.google.com/citations?user=qJnc7W8AAAAJ&hl=en>
<https://plusdobrasil.weebly.com/>



[anexo "Draft.pdf" removido por Rafael Pinto Vieira/PROF/BIQ/ICB/UFMG]

22/03/2023, 11:19 [https://carretel.grude.ufmg.br/mail/icb/biq/prof/vieirarp.nsf/\(%24Inbox\)/B3B15C110585FBAD0325897A003B40E3/?OpenDoc...](https://carretel.grude.ufmg.br/mail/icb/biq/prof/vieirarp.nsf/(%24Inbox)/B3B15C110585FBAD0325897A003B40E3/?OpenDoc...)

De: "Asma Ahmed" <asmaahmed@benthamsience.net>
Para: "Rafael Pinto Vieira" <vieirarp@icb.ufmg.br>

Data: Quarta-feira, 22 De março De 2023 07:47 AM
Assunto: [SPAM] Re: Chapter - vol 11 - Frontiers in Clinical Drug Research - CNS and Neurological Disorders.

Dear Dr. Vieira,

Thank you for your email. Referring to the below email, we will publish your chapter online as the editor includes your chapter for the next volume which will be published soon.

If you have any other questions please do not hesitate to contact us.

Regards,

Asma Ahmed
 Senior Manager Publications
 Bentham Books

On Tue, Mar 21, 2023 at 4:48 PM Rafael Pinto Vieira <vieirarp@icb.ufmg.br> wrote:

Dear Asma,
 Hope you are well. Do you have an update about my message below?
 Thank you in advance.

Prof. Dr. Rafael Pinto Vieira
 Departamento de Bioquímica e Imunologia
 Lab Q4-167 - Instituto de Ciências Biológicas - UFMG
 Av. Presidente Antônio Carlos, 6627, Pampulha, CEP 31270-901
 Belo Horizonte-MG Brasil
 +55 31 3409 2639
lattes.cnpq.br/2300064372165096
<https://scholar.google.com/citations?user=qJnc7W8AAAAJ&hl=en>
<https://plusdobrasil.weebly.com/>



-----Rafael Pinto Vieira/PROF/BIQ/ICB/UFMG escreveu: -----

Para: "Asma Ahmed" <asmaahmed@benthamsience.net>
 De: Rafael Pinto Vieira/PROF/BIQ/ICB/UFMG
 Data: 17/03/2023 04:43 PM
 cc: salma@benthamsience.net
 Assunto: Chapter - vol 11 - Frontiers in Clinical Drug Research - CNS and Neurological Disorders.

CHAPTER 32

Drug Repurposing in CNS and Clinical Trials: Recent Achievements and Perspectives Focusing on Epilepsy and Related Comorbidities

Gabriela Machado Parreira¹, Antonio Carlos Pinheiro de Oliveira², Leonardo de Oliveira Guarnieri^{3,*},[#] and Rafael Pinto Vieira^{1,*},[#]

¹ Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais

² Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais

³ Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais

Abstract: Central Nervous System (CNS) disorders are a massive burden on the global health system, including a broad range of clinical conditions, such as epilepsies, depression, dementia, multiple sclerosis, and Parkinson's disease. Permanent efforts are being made to find early, non-invasive, and effective diagnostic methods, as well as efficient and safe drug-based treatments for CNS conditions. Nevertheless, many patients displaying these clinical conditions still face the lack of an effective pharmacotherapy to cure the diseases or at least to properly control the progression of symptoms. Currently, epilepsies present an estimated prevalence of 0.5%–1% worldwide, and around 30% of the patients remain refractory to the available drug treatment. The comorbidities that affect epileptic patients, such as cognitive impairment and depression, are major public health challenges. This scenario highlights the urgent need for approving new therapeutic tools for CNS diseases. A successful development process of a new compound presenting therapeutic potential can range up to 20 years and cost hundreds of millions of US dollars, from the initial characterization of the *in vitro* chemical and biological properties until clinical trials. Additionally, drug development has a low success rate in the case of CNS conditions. In this context, drug repurposing (or drug repositioning, DR) is an alternative way to reduce the cost and accelerate the process of a drug-based treatment approach since it identifies a novel clinical application for an existing compound already approved for a distinct indication. In the present chapter, we aim to describe recent outcomes of DR

* Corresponding authors Rafael Pinto Vieira and Leonardo de Oliveira Guarnieri: Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais and Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais; E-mails: leoguarneri@gmail.com, vieirarp@icb.ufmg.br

[#] These authors equally contributed to this work.

Zareen Amtul (Ed.)

All rights reserved-© 2022 Bentham Science Publishers

Evaluation of the expression of D1- and D2-type receptors and the effect of agonists in behavior of Wistar Audiogenic Rats (WAR), an Epilepsy animal model

Gabriela Machado Parreira¹, Leonardo de Oliveira Guarnieri^{2*}, Ivan Lobo¹, Márcio Flávio Dutra Moraes², Rafael Pinto Vieira^{1*}

1 - Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil.

2 - Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil.

***Corresponding authors:**

Rafael Pinto Vieira, PhD

Phone: +55 31 3409 2639

Email: vieirarp80@gmail.com

Leonardo de Oliveira Guarnieri, PhD

Phone: +55 31 984200292

Email: leoguarnieri@gmail.com

ABSTRACT

Epileptic patients are also affected by neuropsychiatric comorbidities, such as depression and anxiety. Both epilepsy and comorbidities may be related to changes in dopaminergic neurotransmission. In the present work, we investigated the expression of D1- and D2-type dopamine receptors in Wistar and WAR (Wistar Audiogenic Rats) animals, an experimental model of epilepsy. Furthermore, we investigated the effects of high specific D1- and D2-type agonists (SKF-38393 and quinpirole, 40 pmol/ μ L intra-amigdalary) in animal behavior. Male WAR and Wistar rats were used, and the WAR were divided according to the behavioral severity index (BSI) observed after the audiogenic stimulus. Biochemical analyzes were performed to evaluate the expression of dopamine receptors type 1 (RD1) and 2 (RD2) in slices of hippocampus, prefrontal cortex, amygdala and striatum of Wistar and WAR. For the hippocampus, we observed an increase in the expression of RD1 in WAR animals when compared to Wistar animals and a decrease in the expression of the enzyme tyrosine hydroxylase and presynaptic RD2 for the CA1 region. In addition, a decrease in the expression of the enzyme tyrosine hydroxylase and total RD2 was observed for the region of the basolateral amygdala in WAR animals when compared to Wistar animals. In the regards to the behavioral analysis, we observed greater entry into open trimmed arms for WAR animals treated with quinpirole when compared to control WAR animals in the elevated plus maze test.

Tabela 3. Teste comportamental do campo aberto

Teste comportamental	Wistar	WAR	p-Valor
Campo aberto Velocidade média	23,34±5,18	9,193±0,84	0,0022
Campo aberto Taxa de mobilidade	0,9213±0.01	0,7843±0,02	<0,0001
Campo aberto Distância total	7340±1605	2959±269,8	0,0012
Campo aberto Distância ao centro	821,5±189,9	128,3±62,80	0,0012
Campo aberto Distância na periferia	7068±1901	2573±331,7	0,0111

Tabela 4. Teste comportamental do labirinto em cruz elevado

Teste	Wistar	WAR	p-Valor
Labirinto em cruz elevado Braço fechado	186,4±27,30	246,2±13,98	0,0575
Labirinto em cruz elevado Braço aberto	38,12±26,89	0±0	0,0118
Labirinto em cruz elevado centro	45,44±8,62	53,80±13,98	0,6490

Tabela 5. Teste comportamental de preferência por sacarose

Teste	Wistar	WAR	p-Valor
Preferência por sacarose	124,4±12,99	137,1±14,51	0,5279

Tabela 6. Análise bioquímica de WB

Região WB	Wistar	WAR	p-Valor
Hipocampo	0,84±0,02	0,95±0,02	0,0131
Cortex pré-frontal	0,78±0,10	0,66±0,05	0,361
Estriado	0,91±0,11	1,13±0,09	0,179

Tabela 7. Análise bioquímica de imunohistoquímica para receptores RD1

Região Imunohistoquímica (RD1)	Wistar	WAR	p-Valor
Hipocampo (CA1)	0,0006067 ± 4,070e-005	0,0005879 ± 3,999e-005	0,7548
Hipocampo (CA3)	0,0005977 ± 5,576e-005	0,0006050 ± 2,752e-005	0,8986
Hipocampo (DG)	0,0006538 ± 2,246e-005	0,0006072 ± 1,478e-005	0,1185
Cortex pré-frontal (IL)	0,005778 ± 0,0009320	0,01157 ± 0,001579	0,0196
Cortex pré-frontal (PrL)	0,006263 ± 0,001028	0,01139 ± 0,002108	0,0716
Estriado	0,002928 ± 0,0002135	0,003644 ± 0,0004849	0,2136
Amígdala	0,0003330 ± 3,528e-005	0,0003641 ± 3,345e-005	0,5459

Tabela 8. Análise bioquímica de imunofluorescência para receptores RD2 pré-sináptico

Região imunofluorescência (RD2 pré-sináptico)	Wistar	WAR	p-Valor
Hipocampo (CA1)	366483 ± 41520	236633 ± 31140	0,0464
Hipocampo (CA3)	247745 ± 21701	200661 ± 16488	0,1348
Hipocampo (DG)	3741263 ± 280857	3129586 ± 156978	0,1060
Cortex pré-frontal (IL)	397633 ± 44774	379020 ± 99374	0,8686
Cortex pré-frontal (PrL)	468150 ± 98822	454019 ± 89267	0,9181
Estriado	19228490 ± 2749134	16354053 ± 1223028	0,3763
Amígdala	261230 ± 46612	198617 ± 35763	0,3176

Tabela 9. Análise bioquímica de imunofluorescência para receptores RD2 total

Região imunofluorescência (RD2 total)	Wistar	WAR	p-Valor
Hipocampo (CA1)	10609267 ± 586313	8396837 ± 1202863	0,1493
Hipocampo (CA3)	15926140 ± 1038749	14486679 ± 1623050	0,4833
Hipocampo (DG)	7389628 ± 1056319	6771535 ± 1025026	0,6892
Cortex pré-frontal (IL)	7435953 ± 733922	5779790 ± 1340989	0,3102

Cortex pré-frontal (PrL)	7264180 ± 752520	7668982 ± 1254150	0,7890
Estriado	39,23±1,35	37,67±2,65	0,619
Amígdala	10299550 ± 1418457	5719386 ± 1331884	0,0464

Tabela 10. Análise bioquímica de imunofluorescência da enzima tirosina hidroxilase

Região imunofluorescência (TH)	Wistar	WAR	p-Valor
Hipocampo (CA1)	5023114 ± 417686	1667207 ± 233725	0,0004
Hipocampo (CA3)	4546514 ± 378393	3568889 ± 231301	0,0697
Hipocampo (DG)	1753004 ± 176320	1588778 ± 94378	0,4429
Cortex pré-frontal (IL)	2573112 ± 426461	2336536 ± 452297	0,7134
Cortex pré-frontal (PrL)	2401340 ± 412317	1985728 ± 701492	0,6233
Estriado	39,23±1,35	37,67±2,65	0,619
Amígdala	2436709 ± 426533	1276133 ± 131093	0,0316

Tabela 11. Teste comportamental do labirinto em cruz elevado após administração dos agonistas Quimpirole e SKF-38393

Teste	Wistar	WAR	p-Valor
Labirinto em cruz elevado Braço fechado (Quimpirole)	180,6 ± 2,298	204,1 ± 26,81	0,0078
Labirinto em cruz elevado Braço aberto (Quimpirole)	96,90 ± 3,344	38,05 ± 3,05	<0,0001
Labirinto em cruz elevado centro (Quimpirole)	22,52 ± 1,047	57,83 ± 11,24	0,0087
Labirinto em cruz elevado Braço fechado (SKF-38393)	175,8 ± 10,59	260,6 ± 14,41	0,2717
Labirinto em cruz elevado Braço aberto (SKF-38393)	86,23 ± 18,11	0,00±0,00	0,0728
Labirinto em cruz elevado centro (SKF-38393)	37,93 ± 7,518	39,39 ± 14,41	>0,9999

Tabela 11. Teste comportamental para avaliação do índice de gravidade comportamental após administração dos agonistas Quimpirole e SKF-38393

Teste	Wistar	WAR	p-Valor
Índice de gravidade comportamental (quimpirole)	0,9594 ± 0,003125	0,5657 ± 0,4129	0,0035
Índice de gravidade comportamental (SKF-38393)	0,08000 ± 0,01000	0,2531 ± 0,08188	0,0559