

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

EFEITO PROTETOR DA ENZIMA FOSFATIDILINOSITOL 3-QUINASE (PI3K) EM
EXCITOTOXICIDADE E SEU ENVOLVIMENTO NO MECANISMO DE AÇÃO
ANTICONVULSIVANTE E NEUROPROTETOR DO CANABIDIOL

ISABEL VIEIRA DE ASSIS LIMA

BELO HORIZONTE, 2017

ISABEL VIEIRA DE ASSIS LIMA

**EFEITO PROTETOR DA ENZIMA FOSFATIDILINOSITOL 3-QUINASE (PI3K) EM
EXCITOTOXICIDADE E SEU ENVOLVIMENTO NO MECANISMO DE AÇÃO
ANTICONVULSIVANTE E NEUROPROTETOR DO CANABIDIOL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Ciências Biológicas - Área de Concentração: Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira

Co-orientador: Prof. Dr. Fabrício de Araújo Moreira

BELO HORIZONTE, 2017


**"EFEITO PROTETOR DA ENZIMA FOSFATIDILINOSITOL 3-
QUINASE (PI3K) EM EXCITOTOXICIDADE E SEU
ENVOLVIMENTO NO MECANISMO ANTICONVULSIVANTE E
NEUROPROTETOR DO CANABIDIOL"**

ISABEL VIEIRA DE ASSIS LIMA

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia 12 de abril de 2017, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



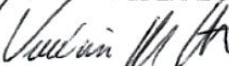
PROF. DR. CLEITON LOPES AGUIAR
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROFA. DR^a. FABIÓLA MARA RIBEIRO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



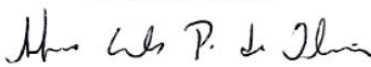
PROF. DR. GABRIEL MAISONNAVE ARISI
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO



PROF. DR. VINÍCIUS ROSA COTA
UNIVERSIDADE FEDERAL SÃO JOÃO DEL-REI



PROF. DR. FABRÍCIO DE ARAUJO MOREIRA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
CO-ORIENTADOR



PROF. DR. ANTÔNIO CARLOS PINHEIRO DE OLIVEIRA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ORIENTADOR

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 12 de abril de 2017

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao
meu querido avô, Idyllo de Assis,
exemplo de bondade e sabedoria.

“Quando aprendemos a usar a inteligência e a bondade ou afeto juntos, todos os atos humanos passam a ser construtivos. ”

Dalai Lama

AGRADECIMENTOS

A Deus, autor da vida e fonte de todo o conhecimento.

À minha família, pelo apoio constante, paciência e entendimento durante meus momentos de ausência.

Ao meu marido e maior incentivador, João Pablo, pelo amor e apoio incondicionais.

Ao meu orientador, Dr. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira, pelos valiosos ensinamentos, confiança, paciência, incentivo e amizade.

Ao meu co-orientador, Dr. Fabrício de Araújo Moreira, pelos valiosos ensinamentos e excelentes sugestões. E aos demais membros do LNP, em especial à professora Dra. Daniele Cristina de Aguiar e aos antigos e atuais alunos Pedro, Luciano, Thércia, Ana Flávia e Juliana e Júlia, pela amizade, por me proporcionarem momentos agradáveis e por me ajudarem sempre que precisei.

Aos professores Dr. Helton José dos Reis e Dra. Luciene Bruno Vieira e a todos os colegas do Laboratório de Neurofarmacologia, especialmente à querida amiga Paula, Ivan, Flávia, Rebeca, Carla e Giovanni, pela amizade, ajuda e conhecimentos compartilhados durante todos esses anos de convivência.

Ao professor Dr. Márcio Flávio Dutra Moraes e a sua aluna Hyorrana, pelas excelentes sugestões e por terem me possibilitado a realização dos registros eletroencefalográficos presentes neste trabalho.

À professora Fabíola Mara Ribeiro e à querida amiga Edleusa, por terem me possibilitado a realização dos experimentos de cultura de células presentes neste trabalho.

Às professoras Dra. Aline Miranda e Dra. Talita Ferreira-Vieira, pelas excelentes sugestões e contribuição para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Steve Danzer, pelos ensinamentos, paciência e por ter me possibilitado a realização do estágio sanduíche em seu laboratório, me proporcionando grande aprendizado na área de epilepsia. E aos seus alunos e funcionários Shadi, Salwa, Ray, Bethany, Shane, Candi e Mary, pelos ensinamentos, paciência e amizade.

À banca examinadora, por investir tempo e conhecimento na avaliação desta tese.

Aos professores do Departamento de Farmacologia e do Departamento de Fisiologia e Biofísica, por contribuírem imensamente para meu desenvolvimento profissional.

Aos funcionários técnico-administrativos Cintya, Rodner, Jorge, Rinaldo e Webster, pela disponibilidade e atenção.

E às agências de fomento CNPq, CAPES e FAPEMIG, pelo auxílio financeiro.

APOIO FINANCEIRO

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) -Programa de Primeiros Projetos - Processo número CBBAPQ- 04389-10; Programa Pesquisador Mineiro - Processo número PPM-00372-13; Programa de Apoio a Núcleos Emergentes de Pesquisa - Processo número CBB-APQ-04625-10.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – número 479254/2013-3.

RESUMO

Introdução: A via fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K)/proteína quinase B (PKB/Akt)/alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) tem sido associada a várias desordens do sistema nervoso central (SNC), inclusive na epilepsia. No entanto, o papel específico da enzima PI3K γ na modulação de crises convulsivas e eventos pós-ictais é pouco conhecido. O fitocanabinoide extraído das folhas de *Cannabis sativa*, canabidiol (CBD), apresenta efeito anticonvulsivante em modelos animais e estudos clínicos. No entanto, o mecanismo de ação anticonvulsivante e neuroprotetor do CBD ainda não foi elucidado. **Objetivos:** Testar a hipótese de que a PI3K γ reduz a excitotoxicidade e suas consequências, assim como sua via de sinalização modula os efeitos anticonvulsivante e neuroprotetor do CBD. **Metodologia:** Os experimentos *in vitro* e *in vivo* foram realizados em camundongos C57Bl/6 (WT) e PI3K γ ^{-/-}. O *status epilepticus* (SE) foi induzido pela microinjeção intra-hipocampal bilateral de pilocarpina (PILO). Após 8h, os animais tiveram seus hipocampus removidos, para posterior análise dos níveis dos fatores neurotróficos BDNF, NGF e GDNF. Após 24 h, os animais foram perfundidos e seus encéfalos removidos e processados, para posterior avaliação de morte neuronal e marcação microglial e astrocitária. Foram realizadas também preparações de culturas primárias de neurônios hipocampais, para posterior realização do ensaio de morte celular induzido por glutamato, bem como preparações de sinaptossomas hipocampais, para posterior análise da liberação de glutamato e do conteúdo de cálcio citosólico. Por fim, crises convulsivas foram induzidas pela administração intraperitoneal de pentilenotetrazol (PTZ), para posterior análise comportamental e/ou eletroencefalográfica. **Resultados:** O SE induzido por PILO promoveu, nos animais WT e PI3K γ ^{-/-}, algumas alterações pós-ictais, tais como aumento de morte neuronal e da ativação microglial e astrocitária. A inibição farmacológica de PI3K γ promoveu alterações tempo e dose dependentes no ensaio morte celular induzido por glutamato e, a inibição genética ou farmacológica de PI3K γ aumentou a liberação de glutamato e o conteúdo de cálcio citosólico, em preparações de sinaptossomas hipocampais estimulados com KCl. Além disso, foram observadas alterações comportamentais e eletroencefalográficas entre os animais WT e PI3K γ ^{-/-} submetidos ao modelo de indução de crises convulsivas por PTZ. Posteriormente, verificou-se um significativo efeito anticonvulsivante do CBD no modelo de PILO, acompanhado pela redução da morte neuronal e da ativação microglial e astrocitária hipocampal. O pré-tratamento com o antagonista de receptores CB₁, AM251, com o inibidor da mTOR, rapamicina, ou em animais PI3K γ ^{-/-}, reduziu o efeito anticonvulsivante do CBD. Ainda, foi observado uma redução do efeito neuroprotetor *in vivo* e *in vitro* do CBD, mediante inibição genética ou farmacológica de PI3K γ , bem como alterações nos níveis hipocampais de BDNF, NGF e GDNF. O efeito anticonvulsivante do CBD também foi demonstrado no modelo de PTZ, sendo este efeito também reduzido mediante deleção genética de PI3K γ , bem como inibição farmacológica da via PI3K/Akt/mTOR. **Conclusão:** De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, sugerimos que a enzima PI3K γ apresenta um papel protetor frente à excitotoxicidade. Além disso, a modulação da via PI3K/Akt/mTOR está envolvida no efeito anticonvulsivante e neuroprotetor do CBD.

Palavras-chave: Crises convulsivas; PI3K/Akt/mTOR; Canabidiol

ABSTRACT

Introduction: The phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (PKB/Akt) /mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway has been associated with several pathologies in the central nervous system (CNS), including in epilepsy. However, the specific role of PI3K γ in modulating seizures and post-ictal events is poorly understood. In addition, a phytocannabinoid extracted from *Cannabis sativa* leaves, cannabidiol (CBD), exhibit a powerful anticonvulsant effect in animal models and clinical studies. However, the anticonvulsant and neuroprotective mechanisms of action of CBD have not yet been elucidated. **Aims:** To test the hypothesis that PI3K γ reduces excitotoxicity and its consequences, as well as its signaling pathway mediates the anticonvulsant and neuroprotective effects of CBD. **Methods:** *In vitro* and *in vivo* experiments were performed on C57Bl/6 (WT) and PI3K γ ^{-/-} mice. *Status epilepticus* (SE) was induced by bilateral intra-hippocampal pilocarpine (PILO) microinjection. After 8 h, the animals had their hippocampus removed, for further analysis of the neurotrophic factors BDNF, NGF and GDNF levels. After 24 h, animals were perfused and their brains removed and processed, for further histological techniques to evaluate neuronal death, microglia and astrocyte staining. Primary cultures of hippocampal neurons were used for glutamate induced cell death assay, as well as hippocampal synaptosomal preparations were used for analysis of glutamate release and cytosolic calcium content. Finally, pentylenetetrazole (PTZ)-induced seizures was performed by intraperitoneal route, for further behavioral and/or electroencephalographic analysis. **Results:** PILO-induced SE promoted some post-ictal changes in WT and PI3K γ ^{-/-} animals, such as increased neuronal death and microglial and astrocytic activation. Pharmacological inhibition of PI3K γ promoted time and dose-dependent changes in the glutamate-induced cell death assay, and the genetic or pharmacological inhibition of PI3K γ increased glutamate release and cytosolic calcium content induced by KCl in preparations of hippocampal synaptosomes. In addition, behavioral and electroencephalographic alterations were observed between the WT and PI3K γ ^{-/-} animals, submitted to the PTZ model of seizures. Subsequently, a potent anticonvulsant effect of CBD was observed in the PILO model, followed by hippocampal reduction of neuronal death and microglial and astrocytic activation. Pretreatment with the CB₁ receptor antagonist, AM251, with the mTOR inhibitor, rapamycin, or in PI3K γ ^{-/-} animals, reduced the anticonvulsant effect of CBD. In addition, it was observed a reduction in *in vivo* and *in vitro* neuroprotective effects of CBD, through genetic and pharmacological PI3K γ inhibition, as well as alterations in the hippocampal levels of BDNF, NGF and GDNF. The anticonvulsant effect of CBD was also demonstrated in PTZ model, and this effect was also reduced by genetic deletion of PI3K γ as well as by pharmacological inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. **Conclusion:** According to the results, we suggest that the enzyme PI3K γ has a protective role against excitotoxicity. In addition, the modulation of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway is involved in the anticonvulsive and neuroprotective effects of CBD.

Keywords: Seizures; PI3K/Akt/mTOR; Cannabidiol

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema demonstrando a formação hipocampal e as vias responsáveis pelo fluxo de informações nessa estrutura (via trissináptica excitatória hipocampal). Modificado de DENG et al, 2010.

Figura 2: Evolução cronológica das alterações estruturais, neuroquímicas e celulares que ocorrem durante a epileptogênese, na ELT humana e no modelo de pilocarpina (FERNANDES, 2013).

Figura 3: Componentes da via de sinalização intracelular PI3K/Akt/mTOR. Modificado de OH et al, 2014.

Figura 4: Representação esquemática do sistema endocanabinoide e de seus principais componentes (BATISTA et al, 2014).

Figura 5: Análise da morte neuronal no hipocampo de animais WT e $PI3K\gamma^{-/-}$ 24 h após a administração de PILO (II e IV) ou veículo (Veic; I e III).

Figura 6: Análise da morte neuronal no núcleo septal lateral de animais WT e $PI3K\gamma^{-/-}$ 24 h após a administração de PILO (II e IV) ou veículo (Veic; I e III).

Figura 7: Efeito do pré-tratamento com o inibidor da $PI3K\gamma$, AS605240 (0,01; 0,1 ou 1 μ M), no ensaio de morte celular induzida por glutamato em cultura de neurônios hipocampais.

Figura 8: Análise da liberação de glutamato (A) e do conteúdo de cálcio citosólico (B) de preparações de sinaptossomas obtidas do hipocampo de animais WT e $PI3K\gamma^{-/-}$ e, de animais WT pré-tratadas com o inibidor seletivo de $PI3K\gamma$, AS605240 (1, 10 ou 100nM), estimuladas com KCl.

Figura 9: Análise da marcação microglial (células Iba-1⁺) no hipocampo de animais WT e PI3K γ ^{-/-} 24 h após a administração de PILO (II e IV) ou veículo (Veic; I e III).

Figura 10: Análise da marcação microglial (células Iba-1⁺) no córtex pré-frontal de animais WT e PI3K γ ^{-/-} 24 h após a administração de PILO (II e IV) ou veículo (Veic; I e III).

Figura 11: Análise da marcação astrocitária (células GFAP⁺) no hipocampo de animais WT e PI3K γ ^{-/-} 24 h após a administração de PILO (II e IV) ou veículo (Veic; I e III).

Figura 12: Efeito da deleção genética de PI3K γ em modelo de crises convulsivas induzidas por PTZ.

Figura 13: Efeito do pré-tratamento com CBD (30, 60 ou 90 mg/kg) sobre o SE induzido pela administração de PILO em animais WT.

Figura 14: Efeito do pré-tratamento com CBD (30, 60 ou 90 mg/kg) sobre a morte neuronal hipocampal induzida por PILO em animais WT.

Figura 15: Análise do efeito neuroprotetor do CBD (0,1; 1 ou 10 μ M) no ensaio de morte celular induzida por glutamato em cultura de neurônios hipocampais de animais WT.

Figura 16: Efeito do pré-tratamento com CBD (30, 60 ou 90 mg/kg) sobre a marcação microglial (células Iba-1⁺) induzida por PILO no hipocampo de animais WT.

Figura 17: Efeito do pré-tratamento com CBD (30, 60 ou 90 mg/kg) sobre a marcação astrocitária (células GFAP⁺) induzida por PILO no hipocampo de animais WT.

Figura 18: Efeito do antagonista de receptores CB1, AM251 (0,3; 1 ou 3 mg/kg), sobre crises convulsivas induzidas por PILO.

Figura 19: Efeito do pré-tratamento com o AM251 (0,3 mg/kg) sobre o efeito anticonvulsivante do CBD (30 mg/kg) no modelo de crises convulsivas induzidas por PILO.

Figura 20: Análise do efeito anticonvulsivante do CBD (30 mg/kg), em animais $PI3K\gamma^{-/-}$ submetidos ao modelo de crises convulsivas induzidas por PILO.

Figura 21: Efeito do pré-tratamento com CBD (30 mg/kg) sobre a morte neuronal hipocampal induzida por PILO em animais $PI3K\gamma^{-/-}$.

Figura 22: Análise do efeito neuroprotetor do CBD (0,1 μ M) no ensaio de morte celular induzida por glutamato em cultura de neurônios hipocampais de animais $PI3K\gamma^{-/-}$.

Figura 23: Efeito do pré-tratamento com o inibidor da $PI3K\gamma$, AS605240 (0,01 μ M), sobre o efeito neuroprotetor do CBD no ensaio de morte celular induzida por glutamato em cultura de neurônios hipocampais.

Figura 24: Efeito do pré-tratamento com CBD (30 mg/kg) sobre os níveis dos fatores neurotróficos BDNF, NGF e GDNF no hipocampo de animais WT e $PI3K\gamma^{-/-}$ submetidos ao modelo de SE induzido por PILO.

Figura 25: Efeito do pré-tratamento com CBD (30 mg/kg) sobre a ativação microglial induzida por PILO no hipocampo de animais $PI3K\gamma^{-/-}$.

Figura 26: Efeito do pré-tratamento com CBD (30 mg/kg) sobre a ativação astrocitária induzida por PILO no hipocampo de animais $PI3K\gamma^{-/-}$.

Figura 27: Análise do efeito da rapamicina (0,3; 1 ou 3 mg/kg) sobre crises convulsivas induzidas por PILO.

Figura 28: Efeito do pré-tratamento com rapamicina (3 mg/kg) sobre o efeito anticonvulsivante do CBD (30 mg/kg), no modelo de crises convulsivas induzidas por PILO.

Figura 29: Análise da deleção genética de $PI3K\gamma^{-/-}$ sobre o efeito do CBD (30 mg/kg) em modelo de crises convulsivas induzidas por PTZ.

Figura 30: Análise do efeito do pré-tratamento com o inibidor de PI3K e de mTOR, LY294002 (25 mg/kg), sobre o efeito do CBD (30 mg/kg) em modelo de crises convulsivas induzidas por PTZ.

Figura 31: Representação esquemática da conclusão do estudo.

LISTA DE ABREVIATURAS

- 2-AG:** 2-aracdonoilglicerol
- ACh:** acetilcolina
- AEA:** aracdonoil etanolamida (anandamida)
- Akt:** proteína quinase B
- AMPA:** α -amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiônico
- ANOVA:** análise de variância
- ATP:** trifosfato de adenosina
- BDNF:** fator neurotrófico derivado do cérebro
- BSA:** soroalbumina bovina
- Ca²⁺:** íon cálcio
- CA1, CA2 e CA3:** Corno de Ammon - regiões 1, 2 e 3
- CaMKII:** proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina II
- CB₁:** receptor canabinoide do tipo 1
- CB₂:** receptor canabinoide do tipo 2
- CE:** córtex entorrinal
- CEBIO:** Centro de Bioterismo
- CEUA:** Comissão de Ética no Uso de Animais
- CREs:** crises recorrentes espontâneas
- DAB:** 3,3- diaminobenzidina
- DG:** diacilglicerol
- EAAT:** transportador de aminoácido excitatório
- ECBs:** endocanabinoides
- EDTA:** ácido etil-diamino-tetra-acético
- EEG:** eletroencefalograma
- EGTA:** ácido etileno-bis (β -amino-etil-éter)-N,N,N',N'-tetracético
- ELISA:** ensaio de imunoabsorção enzimática
- ELT:** Epilepsia do Lobo Temporal
- EthD-1:** homodímero de etídeo-1
- EtOH:** etanol
- FAAH:** hidrolase de amidas de ácidos graxos
- FJC:** Fluoro-Jade C

FLC: fosfolipase C

GABA: ácido gama-aminobutírico

GD: giro denteado

GDNF: fator neurotrófico derivado de células da glia

GFAP: proteína glial fibrilar ácida (do inglês: *glial fibrillary acidic protein*)

GLT1: transportador de glutamato do tipo 1

GluRs: receptores glutamatérgicos

GSK-3: glicogênio sintase quinase-3

Iba-1: molécula adaptadora ligante de cálcio ionizado 1 (do inglês: *ionized calcium binding adaptor molecule 1*)

iGluRs: receptores ionotrópicos para glutamato

IL: interleucina

ILAE: Liga Internacional Contra a Epilepsia (do inglês: *International League Against Epilepsy*)

IP₃: inositol trifosfato

K⁺: íon potássio

KA: ácido caínico/cainato

KCl: cloreto de potássio

KRH: Krebs-Ringer-Hepes

LTD: depressão de longa duração

LTP: potenciação de longa duração

MAPKs: proteína quinase associada a mitógenos

Mg²⁺: íon magnésio

MGL: monoacilglicerol lipase

mGluRs: receptores metabotrópicos para glutamato

mTOR: alvo da rapamicina em mamíferos

Na⁺: íon sódio

NADP⁺: β-nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NADPH: β-nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, reduzido

NGF: fator de crescimento neural

NMDA: N-metil-D-aspartato

NMDAR: receptor do tipo NMDA

PBS: tampão fosfato-salina

PFA: paraformaldeído
PI3K: fosfatidilinositol 3-quinase
PIP₂: 4,5-fosfatidilinositol
PIP₃: 3,4,5-fosfatidilinositol
PK: proteína quinase
PTEN: fosfatase homóloga a tensina
PTZ: pentilenotetrazol
SE: *status epilepticus*
SNC: sistema nervoso central
Δ⁹-THC: Δ⁹-tetrahydrocannabinol
TNF-α: fator de necrose tumoral alfa
TRPA₁: potencial transitório anquirina 1
WT: selvagem

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1 Aspectos gerais da epilepsia	21
1.2 Epilepsia do Lobo Temporal	23
1.3 Tratamento da ELT	27
1.4 Modelos experimentais para o estudo de epilepsias e crises convulsiva	28
1.5 Estudo da transdução de sinal na epilepsia	32
1.5.1 Papel da via de sinalização PI3K/Akt/mTOR na epilepsia	32
1.6 Papel do sistema endocanabinoide na epilepsia	36
1.7 Via de sinalização PI3K/Akt/mTOR e CBD	40
2. JUSTIFICATIVA	42
3. OBJETIVOS	43
3.1 Objetivo geral	43
3.2 Objetivos específicos	43
4. MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1 Animais	44
4.2 Drogas	44
4.3 Cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas e procedimento de microinjeção	43
4.4 Análise comportamental do <i>status epilepticus</i> induzido pela administração de PILO	44
4.5 Perfusão e preparo dos cortes	44
4.6 Marcação com Fluoro-Jade C para avaliação de morte neuronal	45
4.7 Marcação de células Iba-1 ⁺ e GFAP ⁺ por imunofluorescência	46
4.8 Análise das imagens	47
4.9 Cultura primária de neurônios hipocâmpais	48
4.10 Ensaio de morte celular	49
4.11 Preparação de sinaptossomas hipocâmpais	50
4.12 Ensaio para liberação de glutamato	51
4.13 Medida da concentração de cálcio livre intrasinaptossomal	52
4.14 Medida dos níveis hipocâmpais de fatores neurotróficos	53

4.15	Análise comportamental das crises convulsivas induzidas pela administração intraperitoneal de PTZ	53
4.16	Cirurgia para implantação de eletrodos corticais	54
4.17	Análise comportamental e eletroencefalográfica das crises convulsivas induzidas pela administração intraperitoneal de PTZ	55
4.18	Protocolos experimentais na forma de esquema	56
4.18.1	Esquema 1: Avaliação das crises convulsivas, morte neuronal e marcação microglial e astrocitária induzidas por PILO, na presença ou ausência de PI3K γ	56
4.18.2	Esquema 2: Avaliação da inibição farmacológica de PI3K γ no ensaio de morte neuronal induzida por glutamato <i>in vitro</i>	56
4.18.3	Esquema 3: Avaliação da liberação de glutamato e do conteúdo de cálcio citosólico em preparações de sinaptossomas hipocâmpais, mediante inibição farmacológica ou deleção genética de PI3K γ	57
4.18.4	Esquema 4: Avaliação das crises convulsivas induzidas por PTZ na presença ou ausência de PI3K γ	57
4.18.5	Esquema 5: Avaliação do efeito do CBD sobre crises convulsivas, morte neuronal e marcação microglial e astrocitária induzidas por PILO, na presença ou ausência de PI3K γ	58
4.18.6	Esquema 6: Avaliação do antagonismo de receptores CB1 sobre o efeito anticonvulsivante do CBD em modelo de crises induzidas por PILO	58
4.18.7	Esquema 7: Avaliação da inibição genética e farmacológica de PI3K γ sobre o efeito neuroprotetor do CBD no ensaio de morte neuronal induzida por glutamato <i>in vitro</i>	59
4.18.8	Esquema 8: Avaliação do antagonismo de receptores CB1 sobre o efeito anticonvulsivante do CBD em modelo de crises induzidas por PILO	59
4.18.9	Esquema 9: Avaliação da deleção genética de PI3K γ sobre o efeito anticonvulsivante do CBD em modelo de crises induzidas por PTZ	60

4.18.10 Esquema 10: Avaliação da inibição farmacológica de PI3K e de mTOR sobre o efeito anticonvulsivante do CBD em modelo de crises induzidas por PTZ	60
4.19 Análise estatística	60
5. RESULTADOS	62
5.1 Análise da degeneração de neurônios hipocâmpais e do núcleo septal lateral de animais WT e PI3K γ ^{-/-} submetidos ao <i>status epilepticus</i> induzido pela administração intra-hipocâmpal de PILO	62
5.2 Análise do pré-tratamento com o inibidor da PI3K γ , AS605240, no ensaio de morte celular induzida por glutamato em cultura de neurônios hipocâmpais	65
5.3 Envolvimento de PI3K γ na liberação de glutamato e no conteúdo de cálcio citosólico em preparações de sinaptossomas hipocâmpais	67
5.4 Análise da marcação microglial e astrocitária de animais WT e PI3K γ ^{-/-} submetidos ao <i>status epilepticus</i> induzido pela administração intra-hipocâmpal de PILO	68
5.5 Análise comportamental e eletroencefalográfica das crises convulsivas induzidas por PTZ em animais WT e PI3K γ ^{-/-}	75
5.6 Avaliação do efeito anticonvulsivante do CBD sobre crises convulsivas induzidas pela administração intrahipocâmpal de PILO	77
5.7 Análise do efeito do canabidiol sobre a degeneração de neurônios hipocâmpais após a administração de PILO	79
5.8 Análise do pré-tratamento com canabidiol no ensaio de morte celular induzida por glutamato em cultura de neurônios hipocâmpais	81
5.9 Análise do efeito do canabidiol sobre a marcação microglial e astrocitária no hipocampo de animais após a administração de PILO	83
5.10 Efeito do pré-tratamento com AM251 sobre o efeito anticonvulsivante do CBD	87
5.11 Efeito da deleção genética da enzima PI3K γ sobre o efeito anticonvulsivante do CBD	89
5.12 Análise da deleção genética de PI3K γ sobre o efeito do CBD na degeneração de neurônios hipocâmpais, após a administração de PILO	90
5.13 Análise da deleção genética e farmacológica de PI3K γ sobre o efeito do CBD no ensaio de morte celular induzida por glutamato em cultura de neurônios	

hipocampais	93
5.14 Avaliação do efeito do CBD sobre os níveis hipocampais dos fatores neurotróficos BDNF, NGF e GDNF em animais WT e PI3K γ ^{-/-} após a administração de PILO	96
5.15 Análise da deleção genética de PI3K γ sobre o efeito do CBD nas marcações microglial e astrocitária no hipocampo de animais após a administração de PILO	99
5.16 Efeito do pré-tratamento com rapamicina sobre o efeito anticonvulsivante do CBD	103
5.17 Efeito da deleção genética de PI3K γ ^{-/-} e do bloqueio farmacológico de PI3K sobre o efeito do CBD no modelo de crises convulsivas induzidas por PTZ ...	105
6. DISCUSSÃO	108
7. CONCLUSÃO	117
8. REFERÊNCIAS	118

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais da epilepsia

O termo “Epilepsia” deriva do verbo “*epilambaneim*”, que significa “apreender, atacar ou possuir”, teve origem na Grécia antiga (LEES; JONES; MCNAMARA, 2000). Na antiguidade, tal condição patológica era vista como uma possessão demoníaca, cujo diagnóstico estava associado a forças malignas e sobrenaturais. Por volta de 400 a.C., Hipócrates afirmou que a epilepsia não possuía nenhuma conotação divina, tratando-se de uma patologia que acometia especificamente o encéfalo (ENGEL, 1995). Esse misticismo em torno da epilepsia esteve presente na sociedade por muito tempo, com vestígios ainda nos dias atuais, mesmo após grandes avanços na medicina e na pesquisa.

Atualmente, a epilepsia é definida por uma desordem neurológica caracterizada por uma predisposição duradoura do portador em gerar crises epilépticas, e pelas consequências neurobiológicas, cognitivas e sociais associadas a essa condição (FISHER et al., 2014). As crises epilépticas ocorrem de forma recorrente e espontânea, devido a um disparo hipersincronizado de populações de neurônios do sistema nervoso central (SNC) (MCNAMARA, 1994). De acordo com a Liga Internacional Contra a Epilepsia (*International League Against Epilepsy* – ILAE), as crises epilépticas podem ser classificadas em focais (motora ou não-motora), quando há uma região de atividade excessiva em determinada rede cerebral restrita a um dos hemisférios; generalizadas (motora ou de ausência), quando se originam em algum ponto específico, mas rapidamente se espalham para redes em ambos os hemisférios; e crises com início desconhecido (motora ou não-motora), quando não é possível definir se a crise é focal ou generalizada (FISHER et al., 2017).

Essas alterações encefálicas que culminam em hiperexcitabilidade e hipersincronismo da atividade neural, dão origem a mais de 40 tipos distintos de epilepsia, dependendo dos substratos neurais envolvidos (ENGEL, 1995). Apresentam etiologia diversificada, podendo ser genética, estrutural, metabólica, imune, infecciosa ou desconhecida (SCHEFFER et al., 2016). Estima-se que mais de 50 milhões de pessoas sejam portadoras de epilepsia em todo o mundo e 30% desses são refratários aos fármacos anticonvulsivantes disponíveis no mercado (KWAN; SCHACHTER; BRODIE, 2011). Segundo a ILAE, para se estabelecer o diagnóstico clínico de epilepsia, o paciente precisa apresentar pelo menos duas crises espontâneas (ou reflexas) em um intervalo maior que 24 h; apresentar uma crise espontânea e a probabilidade de recorrência de outras crises semelhantes após duas crises não provocadas, ocorrendo nos próximos 10 anos; apresentar um diagnóstico de síndrome epiléptica (FISHER et al., 2014).

Fatores genéticos ou adquiridos podem promover uma série de alterações no SNC, tais como morte neuronal, neurogênese, gliose, remodelamento axonal e dendrítico, neuroinflamação, que podem alterar redes neurais e produzir um foco gerador de descargas epiléticas. No período compreendido entre o insulto epileptogênico e a ocorrência da primeira crise convulsiva, inicia-se um importante fenômeno denominado epileptogênese (TEMKIN, 2009). Este fenômeno é caracterizado por intensas alterações no SNC, capazes de gerar crises recorrentes espontâneas, resultando no desenvolvimento de uma condição epilética e/ou progressão da epilepsia previamente estabelecida (PITKANEN, 2010; PITKANEN et al., 2015).

1.2 Epilepsia do Lobo Temporal

A Epilepsia do Lobo Temporal (ELT) é o tipo mais comum de epilepsia na população adulta, sendo responsável por cerca de 40% de todos os casos de epilepsia (WIEBE, 2000). O portador apresenta crises focais ou secundariamente generalizadas, que se originam em estruturas do lobo temporal, especialmente na formação hipocampal (ANDRADE-VALENÇA, 2006). Esse tipo de epilepsia apresenta grande relevância clínica em razão de sua alta incidência e gravidade, sendo que cerca de 50 a 70% dos pacientes são refratários a farmacoterapia disponível (NEARING; MADHAVAN; DEVINSKY, 2007). Na maioria dos portadores, as lesões e alterações funcionais da ELT iniciam-se na infância após um insulto precipitante inicial como convulsão febril, *status epilepticus* (SE), encefalite ou trauma (ENGEL, 1995).

A formação hipocampal, estrutura mais acometida em portadores de ELT, compreende quatro regiões cerebrais: o giro denteado (GD), regiões do corno de amon (CA)1, CA2 e CA3, complexo subicular e córtex entorrinal (CE) (SCHULTZ; ENGELHARDT, 2014). Esta estrutura é formada por uma camada principal, composta por camadas de células granulares e piramidais e, por camadas moleculares, constituídas por dendritos basais e apicais dos neurônios principais. (AMARAL; WITTER, 1989).

A circuito hipocampal segue uma via unidirecional, denominada via trisináptica excitatória hipocampal. Nela, neurônios do CE se projetam para os dendritos apicais das células granulares do GD, constituindo a via perfurante. Logo, os axônios das células granulares (fibras musgosas) estabelecem sinapses com os neurônios piramidais da região CA3. Os neurônios piramidais de CA3 e seus axônios (colaterais de Schaffer) inervam os dendritos apicais de CA1. Os axônios

dos neurônios piramidais de CA1 enviam projeções de volta ao CE. As células piramidais de CA3 também estabelecem um circuito de fibras recorrentes que inervam outras células de CA3, facilitando a geração de atividade sincronizada. A região de CA1 também recebe conexões diretas do CE, constituindo a via temporoamônica (Figura 1) (DENG; AIMONE; GAGE, 2010; MCNAMARA, 1994; NEVES; COOKE; BLISS, 2008).

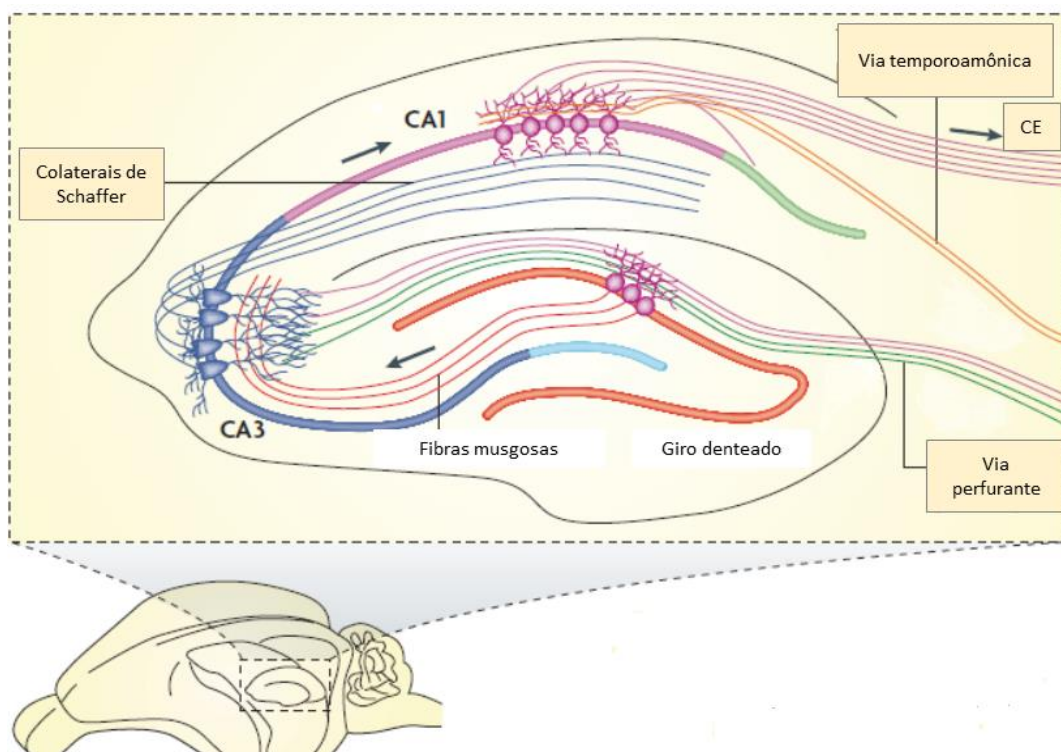


Figura 1: Esquema demonstrando a formação hipocampal e as vias responsáveis pelo fluxo de informações nessa estrutura (via trissináptica excitatória hipocampal). Modificado de DENG et al, 2010.

Glutamato é o principal neurotransmissor excitatório da circuitaria hipocampal, participando de importantes funções fisiológicas, tais como mecanismos de aprendizagem e memória. Ele pode atuar de forma pré- e pós-sináptica em dois tipos de receptores para glutamato (GluRs): ionotrópicos (iGluRs) e metabotrópicos (mGluRs). As concentrações sinápticas e extra-sinápticas desse neurotransmissor

são estritamente controladas por mecanismos envolvendo enzimas e transportadores de glutamato em neurônios e células da glia (DANBOLT, 2001). No entanto, em algumas condições patológicas, esses mecanismos são ineficazes em manter as concentrações fisiológicas de glutamato no SNC, que em elevadas concentrações se torna neurotóxico. Conseqüentemente, os iGluRs são superativados, desencadeando um processo excitotóxico, associado a morte celular (CHOI, D. W., 1994).

Os iGluRs mediam a neurotransmissão excitatória direta e rápida. São proteínas transmembrana constituídas por um complexo de diferentes subunidades, em diferentes combinações, conferindo ao receptor maior ou menor permeabilidade ao influxo dos íons Na^+ e Ca^{2+} . São classificados de acordo com seus agonistas em N-metil-D-aspartato (NMDA), α -amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA) e cainato (KA) (TRAYNELIS et al., 2010). Os mGluRs ajustam a excitabilidade neuronal e/ou controlam a liberação de glutamato. São receptores acoplados à proteína G e participam de mecanismos de respostas celulares através de segundos mensageiros, sendo classificados em três grupos: Grupo I, que inclui os subtipos mGluRs 1 e 5; Grupo II, que inclui os subtipos mGluRs 2 e 3; Grupo III, que inclui os subtipos mGluRs 4, 6, 7 e 8 (NISWENDER; CONN, 2010).

Esse circuito excitatório também é modulado por interneurônios que secretam o neurotransmissor inibitório ácido gama-aminobutírico (GABA). Esses interneurônios são responsáveis por cerca de 10% das sinapses hipocámpais e estão presentes, principalmente, nas camadas granulares do GD. Dessa forma, o controle do fluxo de informação é altamente regulado, evitando uma potencialização da excitação de maneira desnecessária (SPRUTSON; MCBAIN, 2007).

Na ELT, vários fatores podem promover um desequilíbrio da neurotransmissão glutamatérgica e/ou GABAérgica, levando a uma excessiva liberação de glutamato na fenda sináptica. Tal fato promove excitotoxicidade, que é acompanhada de uma intensa microgliose e astrogliose, resultando no fenômeno denominado esclerose hipocampal (BABB et al., 1991). Essas alterações também podem acometer estruturas adjacentes ao hipocampo, tais como núcleo amigdalóide, giro parahipocampal e CE (MCNAMARA, 1994; MELDRUM; BRUTON, 1992). Um exemplo de fator causador de desequilíbrio da neurotransmissão glutamatérgica está relacionado aos transportadores de glutamato dependentes de Na^+ , expressos em neurônios e astrócitos. Eles são denominados transportadores de aminoácido excitatório (EAAT) e são amplamente responsáveis pela remoção do glutamato das sinapses. A diminuição da expressão e/ou inibição desses transportadores, por exemplo, promove uma intensa hiperexcitabilidade, contribuindo para a patogênese da TLE (BONANSCO; FUENZALIDA, 2016).

A neurotransmissão colinérgica, mediada pelo neurotransmissor acetilcolina (ACh), também exerce importantes efeitos na modulação da transmissão sináptica hipocampal. A atividade colinérgica fisiológica é iniciada e propagada através do hipocampo, via circuito excitatório trissináptico. Estudos sugerem que a ACh, agindo via receptores colinérgicos muscarínicos, pode modular de forma diferente as neurotransmissões excitatória e inibitória em vários sítios ao longo do circuito hipocampal (ROUSE et al., 1999). No contexto da ELT, tal fato influencia diretamente a excitabilidade neuronal, alterando o limiar para a ocorrência de novas crises epiléticas, contribuindo assim para a progressão dessa condição patológica.

1.3 Tratamento da ELT

Muitos portadores de ELT são refratários aos fármacos disponíveis no mercado (ANDRADE-VALENÇA, 2006), sendo a lobectomia temporal o tratamento mais indicado em candidatos selecionados. No entanto, cerca de 30% dos pacientes continuam apresentando crises convulsivas após a cirurgia de remoção do lobo temporal (CENDES et al., 2014). Além disso, a lobectomia temporal só é bem tolerada se o hipocampo contralateral é normalmente funcional. Assim, além de se assegurar de que as estruturas contralaterais ao foco epilético são capazes de assumir a maior parte das funções mnésicas, é importante também determinar o grau de funcionamento da região a ser retirada para que não ocorram perdas cognitivas (NETO et al., 2001).

Tradicionalmente, após o diagnóstico de ELT, inicia-se o tratamento farmacológico com carbamazepina, fenitoína ou oxcarbazepina em monoterapia, preferencialmente. No caso de insucesso no controle das crises ou impossibilidade de uso desses fármacos, o paciente pode fazer o uso de lamotrigina, topiramato, valproato ou derivados benzodiazepínicos, como o clobazam. No entanto, a refratariedade associada aos efeitos adversos da terapia impõem sérias restrições ao uso desses fármacos (SCHMIDT; SCHACHTER, 2014).

Muitos fármacos anticonvulsivantes utilizados atualmente na clínica são eficazes no controle das crises convulsivas, mas não são capazes de curar ou modificar o curso da doença. Nesse sentido, torna-se necessário o desenvolvimento de fármacos anti-epileptogênicos, ou seja, capazes de impedir que um cérebro normal se torne epilético após um insulto (LOSCHER, 2012). A fim de se identificar possíveis efeitos anti-epileptogênicos nesses fármacos utilizados na clínica, alguns estudos, que utilizaram modelos experimentais de indução do SE, mostraram que a

administração aguda de diazepam após o SE promoveu efeitos neuroprotetores e de prevenção de crises recorrentes espontâneas (PITKANEN et al., 2005). Além disso, o tratamento crônico com os fármacos gabapentina e valproato promoveram a prevenção das crises recorrentes espontâneas e melhora do déficit cognitivo, nos modelos animais utilizados (BOLANOS et al., 1998; CILIO et al., 2001). No entanto, vários outros fármacos, tais como carbamazepina, lamotrigina, fenobarbital e topiramato foram testados e não apresentaram efeitos anti-epileptogênicos (RADZIK et al., 2015), o que torna necessário a realização de estudos visando desenvolvimento de fármacos antiepilépticos.

1.4 Modelos experimentais para o estudo de epilepsias e crises convulsivas

Os modelos experimentais de epilepsia contribuem para um melhor entendimento de sua fisiopatologia e de suas comorbidades, bem como para o desenvolvimento de novos tratamentos antiepilépticos (AUVIN; DUPUIS, 2014; MULA, 2012; SIMONATO et al., 2012). Dentre os modelos experimentais de ELT, o mais utilizado é o modelo de epilepsia induzido por pilocarpina (PILO) devido às semelhanças fisiopatológicas encontradas com a ELT humana (CAVALHEIRO, 1995).

A PILO, um alcalóide extraído das folhas de *Pilocarpus jaborandi*, atua como agonista de receptores muscarínicos colinérgicos e apresenta potente ação pró-convulsivante (TURSKI et al., 1983). Ela pode atuar sobre os receptores muscarínicos do tipo M_1 e M_2 . Ativando os receptores pré-sinápticos M_2 , ocorre a inibição de adenilato ciclase, diminuindo a liberação de ACh e a excitabilidade neuronal. Por outro lado, ativando receptores pós-sinápticos M_1 , a PILO ativa a fosfolipase C (FLC) e, portanto, produz diacilglicerol (DG) e inositol trifosfato (IP_3),

resultando na alteração da corrente dos íons Ca^{2+} e K^+ , o que aumenta a excitabilidade neuronal (SEGAL, 1988).

Esse aumento da excitabilidade ocorre, provavelmente devido a uma diminuição da atividade das enzimas que hidrolisam o trifosfato de adenosina (ATP), tais como a Na^+ , K^+ ATPase hipocampal, impedindo a repolarização da membrana plasmática, bem como a extrusão de Ca^{2+} (FERNANDES, M. J.; NAFFAH-MAZZACORATTI; CAVALHEIRO, 1996). A alta concentração de Ca^{2+} promove a liberação elevada de glutamato, induzindo o SE. Este neurotransmissor, atuando em receptores do tipo AMPA/KA, permite a entrada de íons Na^+ e Ca^{2+} na célula, promovendo assim a remoção de Mg^{2+} dos receptores do tipo NMDA (NMDAR). Uma vez removido, ocorre a ativação deste receptor pelo glutamato, permitindo a entrada de mais Ca^{2+} na região pós-sináptica da célula, que induzirá excitotoxicidade e morte celular (SCORZA et al., 2009). Dessa forma, a iniciação das crises epiléticas é induzida por agonistas colinérgicos, enquanto que agonistas glutamatérgicos são responsáveis pela manutenção das crises. Esse mecanismo pôde ser sugerido após a demonstração de que o pré-tratamento com antagonistas colinérgicos é capaz de bloquear as crises epiléticas, enquanto que se o tratamento ocorrer após a manutenção do SE, não há reversão das crises (TURSKI et al., 1984).

A administração sistêmica de PILO promove uma sequência de automatismos faciais associados à salivação moderada, acinesia e tremores generalizados. Esses sinais são seguidos de crises motoras límbicas, em que os animais apresentam salivação intensa, clonia das patas dianteiras e, finalmente, queda, podendo em alguns casos chegar a crises tônicas. Estas crises límbicas culminam no chamado *status epilepticus* (SE), fenômeno no qual o animal apresenta uma sequência de

crises convulsivas, que pode perdurar por várias horas, caracterizando assim fase aguda do modelo (TURSKI et al., 1983).

As crises prolongadas induzidas por PILO promovem um desequilíbrio metabólico, que é acompanhado de uma intensa liberação de substâncias excitatórias, resultando em lesão de estruturas cerebrais sensíveis, como por exemplo, o hipocampo. Após um período de ausência de alterações comportamentais, chamado de “fase latente”, as redes neuronais tornam-se epileptogênicas, isto é, capazes de gerar crises recorrentes espontâneas (CREs). Essa evolução também é observada na ELT humana (LEITE; BORTOLOTTI; CAVALHEIRO, 1990; TURSKI et al., 1983).

As alterações estruturais, neuroquímicas e celulares observadas no modelo de PILO são semelhantes às observadas em pacientes com ELT, com a vantagem de podermos observá-las após semanas, enquanto que no paciente essas alterações demoram anos para aparecer (CURIA et al., 2008; FERNANDES, M. J. D. S., 2013). Tais alterações incluem neurodegeneração, microgliose, astrogliose, além do rearranjo das conexões sinápticas e alterações nas propriedades intrínsecas das células nervosas, que são importantes para a epileptogênese (KURUBA; HATTIANGADY; SHETTY, 2009; PITKANEN; SUTULA, 2002) (Figura 2). Elas acometem inúmeras áreas cerebrais, tais como formação hipocampal, córtex entorrinal e piriforme, e núcleo amigdalóide (LEITE et al., 1990).

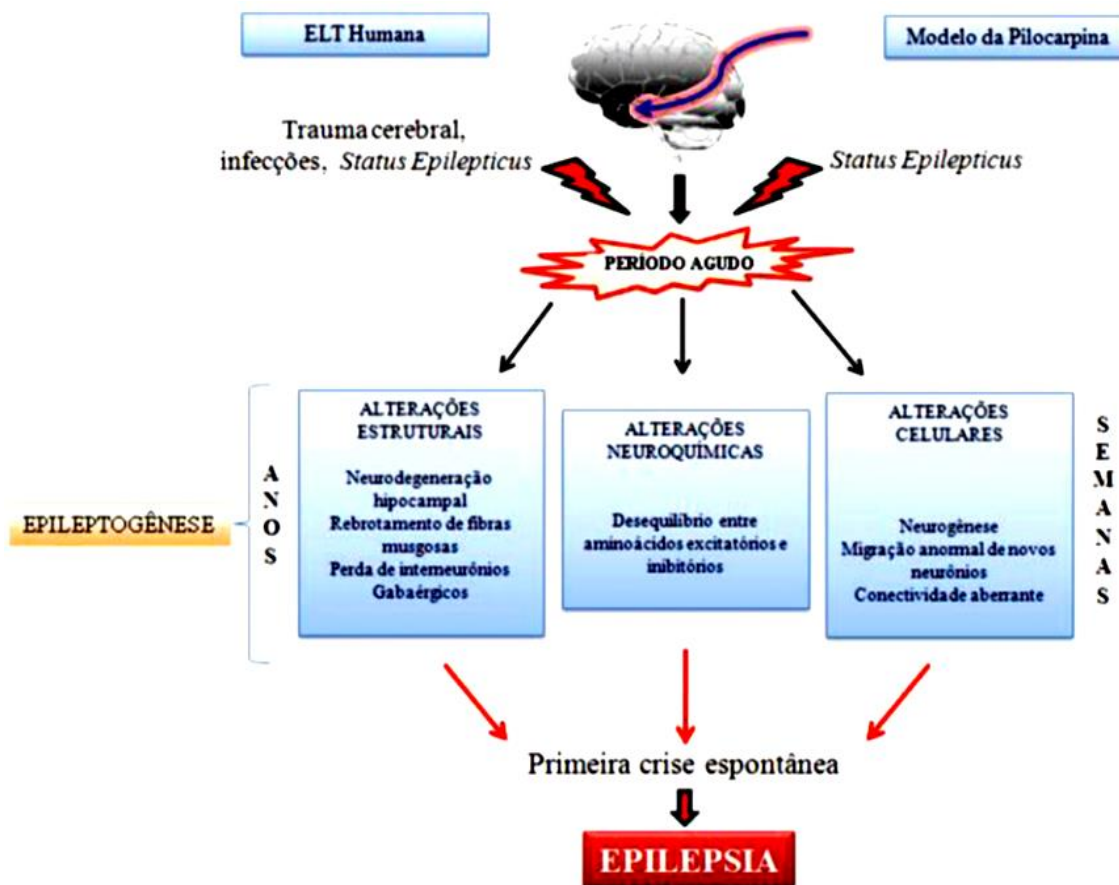


Figura 2: Evolução cronológica das alterações estruturais, neuroquímicas e celulares que ocorrem durante a epileptogênese na ELT humana e no modelo de pilocarpina (FERNANDES, 2013).

A excitotoxicidade presente nesse modelo, que é responsável pelas amplas lesões observadas, contribui, juntamente com os efeitos periféricos da PILO, para uma alta mortalidade dos animais (SHARMA et al., 2007). Nesse sentido, foi desenvolvido um modelo de ELT induzido pela administração intra-hipocampal de PILO em ratos, o qual mimetiza características comportamentais agudas e crônicas, eletroencefalográficas e morfológicas observadas no modelo de administração sistêmica, porém com uma baixa taxa de mortalidade dos animais (FURTADO et al., 2002). Posteriormente, nosso grupo de pesquisa desenvolveu um modelo de crises convulsivas induzido pela microinjeção intra-hipocampal de PILO em camundongos,

no qual foram observadas várias características comportamentais e morfológicas semelhantes às observadas no modelo sistêmico, com a vantagem de não promover a mortalidade dos animais com doses capazes de promover SE (LIMA et al., 2016).

O pentilenotetrazol (PTZ) é uma outra substância pró-convulsivante, muito utilizada na triagem pré-clínica de novos fármacos anticonvulsivantes. Ele atua inibindo os receptores GABA_A, que, dependendo da dose administrada, induz dois tipos de crises convulsivas: as crises clônicas (crises mínimas), que se manifestam por espasmos, mastigação, clonias de cabeça e membros, elevação e queda, estando envolvidas estruturas do sistema límbico, como o hipocampo (BREVARD et al., 2006) e as crises tônico-clônicas generalizadas (crises máximas), que se manifestam por convulsões tônico-clônicas e envolvem estruturas por todo encéfalo, principalmente áreas de tronco encefálico (VELISEK et al., 1992). As crises clônicas são acompanhadas por atividade eletroencefalográfica aberrante, disparos generalizados em várias frequências, enquanto as crises tônico-clônicas são acompanhadas por atividade cortical isoeétrica (KLIOUEVA et al., 2001).

1.5 Estudo da transdução de sinal na epilepsia

O estudo dos aspectos neuroquímicos e de vias de sinalização inter e intracelulares relacionados às epilepsias visa a ampliação do conhecimento sobre os mecanismos envolvidos em sua fisiopatologia, bem como a descoberta de possíveis alvos farmacológicos, para posterior desenvolvimento de fármacos anticonvulsivantes e/ou antiepilépticos.

Como descrito anteriormente, as neurotransmissões glutamatérgica e GABAérgica desempenham papéis cruciais na fisiopatologia das epilepsias (ROWLEY et al., 2012). Estudos demonstram também um importante envolvimento

das monoaminas nessa desordem neurológica, tais como serotonina (BAGDY et al., 2007; GUIARD; DI GIOVANNI, 2015), dopamina (BOZZI; BORRELLI, 2013), noradrenalina (GIORGI et al., 2004), histamina (BHOWMIK; KHANAM; VOHORA, 2012) e melatonina (BRIGO; IGWE, 2016; TCHEKALAROVA et al., 2015).

A ativação dos receptores pelos neurotransmissores supracitados regula, conseqüentemente, vias de sinalização intracelulares. De fato, uma série de proteínas envolvidas em vias de sinalização, tais como as proteínas quinases (PK) PKA (LIU, S.; ZHENG, 2013), PKB (ou Akt) (ROMERO-LEGUIZAMON et al., 2016), PKC (CHEN, S. J. et al., 1992), proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina II (CaMKII) (LIU, X. B.; MURRAY, 2012) e proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) (BEN et al., 2013) também exercem importantes papéis tanto na modulação de crises convulsivas, quanto nos aspectos relacionados às epilepsias.

Nesse sentido, é crescente o número de estudos demonstrando que a modulação de receptores para neurotransmissores e de vias de sinalização intracelulares nas epilepsias são estratégias importantes, capazes de modificar de forma considerável o curso da doença.

1.5.1 Papel da via de sinalização PI3K/Akt/mTOR na epilepsia

A via de sinalização intracelular da enzima fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) está envolvida em uma grande variedade de processos biológicos, tais como na modulação da expressão de mediadores inflamatórios e de vários processos neuronais, incluindo crescimento, sobrevivência e diferenciação neuronais, neuroproteção e plasticidade sináptica (ACEBES; MORALES, 2012; LAINE et al., 2002).

A ativação da PI3K estimula a conversão de 4,5-fosfatidilinositol (PIP_2) em 3,4,5-fosfatidilinositol (PIP_3) (VANHAESEBROECK et al., 2001). Na direção oposta, a fosfatase homóloga a tensina (PTEN) desfosforila PIP_3 na posição 3, reduzindo a ação da PI3K (MAEHAMA; DIXON, 1998). A PIP_3 é crucial para o recrutamento e, subsequente ativação de Akt, que, por sua vez, leva ao estímulo de novos substratos e enzimas, tais como a proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) (Figura 3) (CANTLEY, 2002; OH et al., 2014).

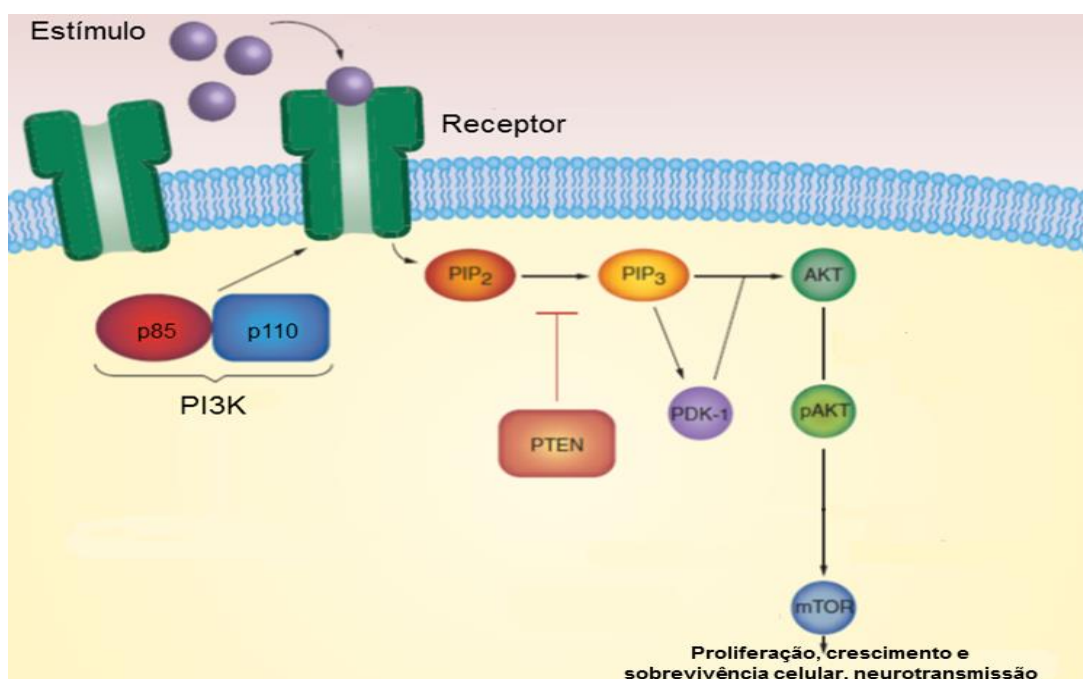


Figura 3: Componentes da via de sinalização intracelular PI3K/Akt/mTOR. Modificado de OH et al., 2014.

As PI3Ks são agrupadas em três classes (I, II e III) com base em suas características bioquímicas. A classe I é a mais estudada. São formadas por heterodímeros de quatro subunidades catalíticas de 110 kDa e duas subunidades regulatórias, categorizadas em classes IA e IB. A PI3Ks pertencentes a classe IA ($PI3K\alpha$, $PI3K\beta$ e $PI3K\delta$) possuem como subunidades catalíticas dímeros de $p110\alpha$, $p110\beta$ ou $p110\delta$ e subunidades regulatórias $p50-55/p85$, sendo usualmente ativadas por receptores tirosina-quinase. Por outro lado, as PI3Ks pertencentes a classe IB

(PI3K γ) possuem dímeros de p110 γ formando a subunidade catalítica e subunidades p101 ou p84 (também conhecidas como p87), sendo usualmente ativadas por receptores acoplados a proteína G (HAWKINS et al., 2006; WYMAN; PIROLA, 1998).

A PI3K γ é somente detectada no sistema imune, cardiovascular e SNC, embora todas as outras isoformas das PI3Ks classe IA sejam expressas de forma ubíqua. Devido a sua localização neuronal, sugere-se que tal quinase apresenta um papel específico no SNC. No entanto, as funções centrais de PI3K γ ainda são pouco estudadas.

As PI3Ks atuam como importantes mensageiros intracelulares, podendo ativar proteínas sinalizadoras envolvidas na expressão hipocampal da potenciação de longa duração (LTP) e depressão de longa duração (LTD) (SANNA et al., 2002; YANG et al., 2008). Foi demonstrado que inibidores não-seletivos de PI3K bloqueiam a LTP na região CA1 do hipocampo (SANNA et al., 2002) e que a atividade de PI3K está envolvida no prejuízo da LTP e potenciação da LTD hipocampais, ambos induzidos por estresse (YANG et al., 2008). Além disso, o bloqueio genético e farmacológico de PI3K γ estão especialmente envolvidos na LTD dependente de NMDAR e na flexibilidade comportamental hipocampal (KIM et al., 2011). Outro estudo demonstrou que a superexpressão da subunidade catalítica p110 γ na região CA1 do hipocampo de camundongos, prejudica a LTD dependente de NMDAR e a memória espacial. Em contrapartida, a LTP e a memória aversiva não foram afetadas pela superexpressão de p110 γ (CHOI, J. H. et al., 2014).

Alguns estudos têm demonstrado um aumento da fosforilação de Akt no hipocampo de pacientes com ELT (SHINODA et al., 2004) e no córtex de ratos submetidos a injeção do agente pró-convulsivante ácido cáinico no núcleo

basolateral da amígdala (ARAKI et al., 2002). Outros demonstram que o bloqueio de mTOR pela rapamicina parece ter efeitos antiepiléptogênicos, embora os estudos apresentem resultados controversos (BUCKMASTER; INGRAM; WEN, 2009; BUCKMASTER; LEW, 2011; HUANG et al., 2010). Trabalhos recentes demonstram ainda que a supressão da enzima PTEN em apenas um subconjunto de células granulares do GD do hipocampo, é capaz de desencadear crises espontâneas nos animais, bem como achados patológicos semelhantes a pacientes com ELT (LASARGE; SANTOS; DANZER, 2015; PUN et al., 2012).

De forma complementar, trabalhos conduzidos por nosso grupo têm demonstrado que a inibição de PI3K aumenta a produção de mediadores inflamatórios em cultura de células microgliais ativadas por estímulos inflamatórios e em hipocampo e córtex de animais submetidos a administração de PILO (DE OLIVEIRA et al., 2008; DE OLIVEIRA et al., 2012; LIMA et al., 2015). Além disso, animais knockout para a enzima PI3K γ (PI3K $\gamma^{-/-}$) apresentam um SE mais intenso, bem como o aumento de alguns parâmetros neuroinflamatórios e neurodegenerativos, quando comparados com animais selvagens (LIMA et al., 2015). Desta forma, pode-se concluir que as enzimas PI3K e mTOR poderiam tanto controlar as crises convulsivas e alterações pós-ictais, quanto estar envolvidas nas ações anticonvulsivantes e antiepiléticas de drogas.

1.6 Papel do sistema endocanabinoide na epilepsia

Como descrito anteriormente, diferentes sistemas neuroquímicos parecem participar de processos relacionados a ictogênese e epileptogênese. Dentro dessa linha, diferentes estudos demonstram que o sistema endocanabinoide possui importantes papéis na regulação de uma variedade de desordens neurológicas,

inclusive nas epilepsias (DEVINSKY; WHALLEY; DI MARZO, 2015). Ele tem como função chave regular a transmissão sináptica e plasticidade neuronal no SNC (KATONA; FREUND, 2008).

O estudo farmacológico do sistema endocanabinoide teve seu início na década de 1960, quando o grupo de pesquisa do professor Raphael Mechoulam começou a identificar as estruturas dos principais componentes químicos da *Cannabis sativa*, dentre eles o composto Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), principal responsável pelos efeitos psicoativos da planta (GAONI; MECHOULAM, 1964). Atualmente, já se sabe que as respostas induzidas pelo Δ^9 -THC são mediadas pelos receptores canabinoides CB₁ e CB₂ (DEVANE et al., 1988; MUNRO; THOMAS; ABU-SHAAR, 1993).

Esse sistema é composto pelos receptores canabinoides CB₁ e CB₂, pelos seus ligantes endógenos, denominados endocanabinoides (ECBs), e pelas enzimas envolvidas na síntese e degradação dos ECBs. Inicialmente, acreditava-se que os receptores CB₁ eram expressos somente no cérebro, enquanto os receptores CB₂ estavam restritos a células e tecidos periféricos relacionados ao sistema imune. No entanto, estudos mais recentes têm demonstrado a expressão de receptores CB₁ na periferia e os receptores CB₂ também têm sido encontrados no SNC, tanto em neurônios quanto em células da glia (ONAIVI et al., 2012).

Ambos receptores estão confinados em terminais pré-sinápticos e são ativados principalmente pelos ligantes endógenos aracdonoiletanolamida (anandamida, AEA) e 2-aracdonoil glicerol (2-AG). Acredita-se que os endocanabinoides atuem como mensageiros retrógrados no SNC, uma vez que a modulação dos receptores canabinoides promove uma regulação na ação de outros neurotransmissores, usualmente inibindo a liberação dos mesmos (WILSON;

NICOLL, 2002). De modo simplificado, esses agonistas endógenos são liberados de neurônios pós-sinápticos, após despolarização, e ativam receptores canabinoídeos pré-sinápticos (PIOMELLI, 2003). Dessa forma esses ligantes endógenos comportam-se como neuromoduladores (WILSON; NICOLL, 2002).

Ao contrário dos neurotransmissores clássicos, que são sintetizados e estocados em vesículas, a síntese dos ECBs é feita sob demanda, mediante um influxo de cálcio, secundário à ativação de GluRs (BATISTA et al., 2014). A degradação desses ligantes é realizada por enzimas específicas, sendo a monoalçilglicerol lípase (MGL) responsável por hidrolisar o 2-AG e a hidrolase de amida de ácidos graxos (FAAH) por hidrolisar a anandamida (Figura 4). Dessa forma, manipulações farmacológicas dos níveis dos ECBs podem ser feitas por meio da inibição dessas enzimas (CRAVATT et al., 1996; NOMURA et al., 2008).

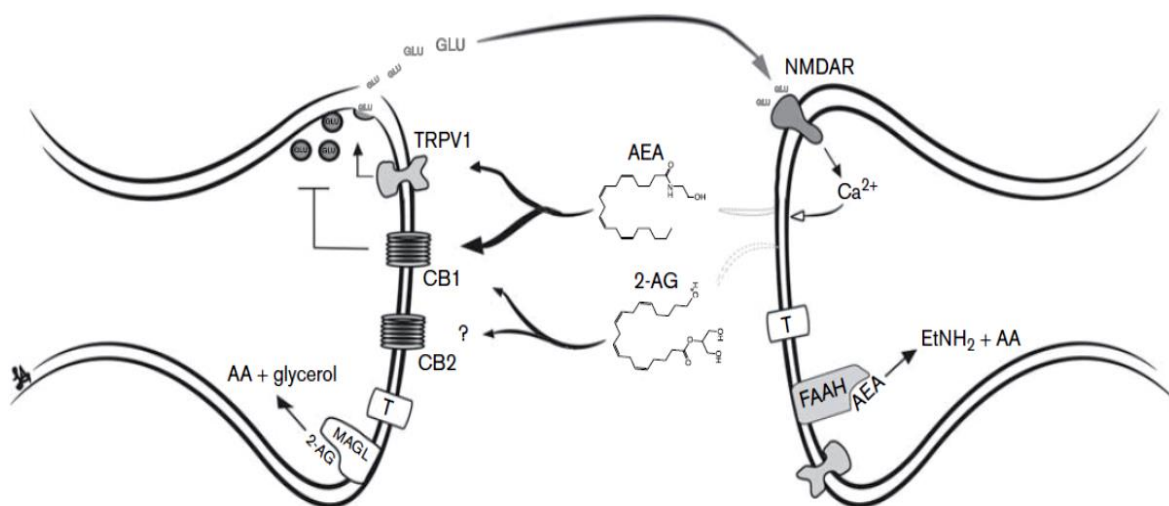


Figura 4: Representação esquemática do sistema endocanabinoide e de seus principais componentes (BATISTA et al., 2014).

Vários estudos têm demonstrado o efeito da planta *Cannabis sativa* e/ou de seus constituintes sobre crises convulsivas. Dentre os mais de 400 constituintes da

Cannabis, o Δ^9 -trans-tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) é o fitocanabinoide que apresenta os efeitos psicoativos mais pronunciados (ASHTON, 2001). O canabidiol (CBD) é outro importante fitocanabinoide que apresenta vários efeitos farmacológicos, sem, no entanto, apresentar efeitos psicotrópicos. Apesar de o CBD ter sido isolado pela primeira vez na década de 1940 e ter sua estrutura química identificada em 1963 (MECHOULAM; SHVO, 1963), seu (s) mecanismo (s) de ação, bem como seu envolvimento com o sistema endocanabinoide ainda não são completamente elucidados. Alguns estudos sugerem que seus efeitos não sejam diretamente dependentes de receptores $CB_{1/2}$ (MCPARTLAND; GLASS; PERTWEE, 2007; MECHOULAM; HANUS, 2002). O CBD apresenta baixa afinidade pelos receptores $CB_{1/2}$, mas foi sugerido que pode antagonizar receptores $CB_{1/2}$ (PERTWEE, 2006; THOMAS et al., 2007). Outro estudo demonstrou que o CBD apresenta baixa afinidade como ligante ortostérico de receptores CB_1 , mas pode afetar a atividade deste receptor via mecanismo indireto (MCPARTLAND et al., 2015). Ele também inibe a captação de anandamida em concentrações micromolares e inibe sua hidrólise enzimática. Ainda, o CBD antagoniza um novo receptor para canabinoide, o GPR55, em concentrações nanomolares (DEVINSKY et al., 2014).

Além de atuar no sistema endocanabinoide, o CBD apresenta numerosos alvos de ação, tais como sobre receptores de adenosina (CARRIER; AUCHAMPACH; HILLARD, 2006) receptores glicinérgicos (AHRENS et al., 2009) e receptores serotoninérgicos (RESSTEL et al., 2009; ZANELATI et al., 2010).

Os primeiros estudos sobre as propriedades farmacológicas do CBD datam da década de 1970 e relatam sua potente ação anticonvulsivante em modelos animais (CARLINI et al., 1973; CONSROE; WOLKIN, 1977; IZQUIERDO; ORSINGHER; BERARDI, 1973). Posteriormente, outros estudos também

demonstraram o efeito anticonvulsivante do CBD nos modelos de crises induzidas pela administração de PILO e por penicilina (DO VAL-DA SILVA et al., 2017; JONES et al., 2012), bem como nos modelos de indução de crises por eletrochoque e pela administração PTZ (SHIRAZI-ZAND et al., 2013). Além disso, alguns estudos clínicos também demonstraram seu efeito anticonvulsivante (CUNHA et al., 1980; MECHOULAM; CARLINI, 1978), incluindo pacientes refratários ao tratamento farmacológico tradicional (DEVINSKY et al., 2016). Apesar dos estudos descreverem o notável efeito anticonvulsivante do CBD, nenhum deles abordou o(s) mecanismo(s) de ação envolvidos nesse efeito. Portanto, justifica-se o estudo de possíveis alvos farmacológicos do CBD no controle das crises convulsivas.

1.7 Via de sinalização PI3K/Akt/mTOR e CBD

Alguns estudos têm demonstrado que os fitocanabinoides podem proteger as células neurais frente a diferentes insultos, tais como excitotoxicidade glutamatérgica, estresse oxidativo, traumatismo e isquemia (GUZMAN, 2005). Alguns desses efeitos estão relacionados com a ativação da via da PI3K/Akt, a qual está envolvida na via de sobrevivência de muitos tipos celulares, incluindo os neurônios. Os fitocanabinoides podem ativar a via da PI3K/Akt através da ativação dos receptores CB_{1/2} (SANCHEZ et al., 2003), embora seus efeitos protetores em cultura primária de astrócitos (GOMEZ DEL PULGAR et al., 2002) e de oligodendrócitos (MOLINA-HOLGADO, E. et al., 2002) sejam dependentes somente de receptores CB₁. A estimulação desta via também é necessária para o efeito neuroprotetor do canabinoide sintético HU-210 em culturas primárias de neurônios corticais (MOLINA-HOLGADO, F. et al., 2005). Dentro desta linha, foi demonstrado recentemente que o efeito anticonvulsivante do CBD no modelo de crises induzidas

por overdose de cocaína foi abolido pela administração do inibidor de mTOR, rapamicina, indicando o possível envolvimento dessa via de sinalização intracelular no mecanismo de ação anticonvulsivante do CBD (GOBIRA et al., 2015). No entanto, mais estudos são necessários a fim de verificar o papel do CBD em crises convulsivas e eventos pós-ictais e o envolvimento da via PI3K/Akt/mTOR sobre tais efeitos.

2. JUSTIFICATIVA

Diante do grande número de portadores de epilepsia refratários ao tratamento medicamentoso disponível, é necessária a realização de abordagens que investiguem tanto a fisiopatologia dessa condição patológica, quanto os potenciais alvos farmacológicos. Nesse contexto, o estudo dos fatores envolvidos em crises convulsivas e em eventos pós-ictais importantes para a epileptogênese e, conseqüentemente, para as epilepsias, pode contribuir para o desenvolvimento de drogas anti-epileptogênicas.

As vias de sinalização constituem um dos fatores envolvidos nesse processo, sendo seu estudo importante para se estabelecer seu envolvimento não somente na modulação de crises convulsivas, como também em eventos pós-ictais que sejam importantes para a epileptogênese. Além disso, o conhecimento dessas vias visa estabelecer mecanismos de ação de drogas anticonvulsivantes e neuroprotetoras que podem apresentar um potencial anti-epileptogênico. Portanto, foi avaliado, no presente trabalho, o papel da enzima PI3K γ frente a diferentes estímulos convulsivos e excitotóxicos, bem como o envolvimento de sua via de sinalização na modulação do efeito anticonvulsivante e neuroprotetor do CBD.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Testar a hipótese de que a enzima PI3K γ apresenta um papel protetor em excitotoxicidade e que a sua via de sinalização contribui para o efeito anticonvulsivante e neuroprotetor do CBD.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Testar a hipótese de que o bloqueio genético ou farmacológico de PI3K γ aumenta a morte neuronal e as ativações microglial e astrocitária promovidas por estímulo excitotóxico, bem como altera a neurotransmissão glutamatérgica;

3.2.2 Testar a hipótese de que a inibição genética de PI3K γ altera os padrões comportamentais e eletroencefalográficos em animais submetidos ao modelo de crises convulsivas induzidas por PTZ;

3.2.3 Testar a hipótese de que o CBD apresenta efeito anticonvulsivante e neuroprotetor, e que essas ações são mediadas pela ativação do receptor CB₁ e da via PI3K/Akt/mTOR.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos C57Bl/6 (WT), provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG e camundongos machos *knockout* para a enzima PI3K γ (PI3K $\gamma^{-/-}$), cedidos pelo Prof. Mauro Martins Teixeira, ambos com idade entre 10 e 12 semanas, pesando em torno de 25 g. Os animais tiveram livre acesso a água e comida, sendo mantidos em ciclo claro/escuro a cada 12 h com temperatura local de 24°C. Todos os experimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos de experimentação com animais adotados pelo Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), sendo este projeto aprovado sob protocolo de nº 068/11.

4.2 Drogas

Foram utilizadas as seguintes drogas: cloridrato de pilocarpina, pentilenotetrazol, glutamato monossódico, valproato de sódio (Sigma Aldrich, EUA); diazepam (Hipolabor, Brasil), AS605240, LY294002, AM251 (Cayman Chemical, EUA); rapamicina (LC-Laboratories, EUA); canabidiol (THC-Pharma, Alemanha).

4.3 Cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas e procedimento de microinjeção

Os animais WT e PI3K $\gamma^{-/-}$ foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal (i.p.) de cetamina:xilazina (80 mg/kg:8 mg/kg; Syntec[®], Brasil) sendo, em seguida, submetidos à tricotomia do escalpo e seu crânio fixado a um aparelho estereotáxico (Insight[®], Brasil). Cânulas-guia (7 mm) foram implantadas nos hipocampus dorsais

(direito e esquerdo) e as coordenadas estabelecidas de acordo com o Atlas Paxinos & Franklin (PAXINOS; FRANKLIN, 2001): $\pm 1,5$ mm lateral; -1,3 mm dorso-ventral, -1,9 mm ântero-posterior em relação ao bregma. Os animais receberam, de forma profilática, injeções intramusculares do agente antimicrobiano de amplo espectro Pentabiótico® (0.27 g/kg; Fort Dodge, Brazil) e do analgésico e antiinflamatório Banamine® (0.025 g/kg; Schering Plough, Brazil). Ao término da cirurgia, os animais permaneceram no laboratório até completa recuperação. Em seguida, foram levados ao biotério, onde permaneceram por 5 dias e, posteriormente, submetidos aos procedimentos experimentais, especificados no item 4.18. O procedimento de microinjecao foi utilizado para a administração de PILO. Para isso, foi introduzida, pela cânula-guia, uma agulha odontológica gengival 30 G (8 mm), a qual foi conectada a um segmento de polietileno (P10) e este a uma seringa Hamilton® de 10 μ l. As injeções foram realizadas por uma bomba de infusão (Insight®, Brasil), sendo o volume por sítio injetado de 0,25 μ l, a uma taxa de infusão de 0,25 μ l/min.

4.4 Análise comportamental do *status epilepticus* induzido pela administração de PILO

Logo após a administração intrahipocampal de PILO (30 μ g/0,25 μ l/ sítio), os animais foram colocados em caixas de acrílico individuais e o comportamento dos mesmos foi gravado com auxílio de uma câmera digital (Sony DCR-SR68) durante 90 min para avaliação do SE. Durante este período foram avaliados alguns parâmetros, tais como a latência para o início das crises, bem como o número e a severidade das mesmas. As crises computadas foram aquelas que alcançaram, no mínimo, índice 3, segundo escala de Racine (RACINE, 1972). Nesta escala, o índice

varia de 1 a 5, dependendo do comportamento do animal durante o período de crise epiléptica:

- Índice 1: comportamento de imobilidade, fechamento dos olhos, abalos musculares da orelha e/ou das vibrícias, clonia facial;
- Índice 2: movimentos de flexão e extensão do pescoço associado com severa clonia facial;
- Índice 3: clonia de um membro anterior;
- Índice 4: clonia de ambos os membros anteriores com presença de “rearing”;
- Índice 5: crise clônica generalizada acompanhada de movimento de “rearing” seguida de queda de costas.

Após 90 min, os animais receberam uma injeção intraperitoneal de diazepam (10 mg/kg) para a interrupção das crises.

4.5 Perfusão e preparo dos cortes

Vinte quatro horas após a administração de PILO ou veículo, os animais WT e $PI3K\gamma^{-/-}$ foram perfundidos por via transcardíaca com tampão fosfato-salina 0,1 M, pH 7,4. (PBS) e paraformaldeído (PFA) 4% fosfatado e tamponado em PBS. Em seguida, os encéfalos foram imersos em PFA *overnight*. Posteriormente, os encéfalos foram transferidos para uma solução de sacarose 30% e mantidos até a completa saturação, sendo, em seguida, congelados em isopentano 99% e gelo seco e, estocados a - 80 °C (GAGE; KIPKE; SHAIN, 2012). Cortes de 30 μ m contendo a formação hipocampal, córtex pré-frontal e núcleo septal lateral foram obtidos com o auxílio de um criostato (Leica Biosystems Inc., USA).

4.6 Marcação com Fluoro-Jade C para avaliação de morte neuronal

Os cortes contendo a formação hipocampal e o núcleo septal lateral foram lavados em PBS 3 vezes por 30 min, e montados em lâmina gelatinizada. Após secas, as lâminas foram mergulhadas em solução básica de etanol (EtOH) 80% em hidróxido de sódio (NaOH) 1% por 5 min, EtOH 70 % por 2 min e lavadas com água destilada por 2 min. Ao abrigo da luz, as lâminas foram incubadas em solução de permanganato de potássio (KMnO₄) 0,06 % por 20 min, lavadas com água destilada por 2 min e incubadas em solução de Fluoro-Jade C (FJC) (Merck Millipore, EUA) 0,0001 % em ácido acético 0,1 % por 20 min. Posteriormente, foram novamente lavadas com água destilada 2 vezes por 1 min e colocadas em estufa a 37 °C. Após completa secagem, foram mergulhadas em xilol por 1 min e as lamínulas montadas com auxílio do meio de montagem DPX (Sigma Aldrich, EUA) (SCHMUED et al., 2005). As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência (Axio Imager A2, Carl Zeiss, Alemanha), utilizando o filtro FITC.

4.7 Marcação de células Iba-1⁺ e GFAP⁺ por imunofluorescência

Para os procedimentos de detecção de Iba-1 e GFAP, os cortes foram incubados com tampão citrato a 70 °C para recuperação antigênica. Após este período os cortes foram lavados 3 vezes com TBS. Posteriormente, os cortes foram bloqueados por 30 min em solução de bloqueio (4% soro fetal bovino e 0,5% de Triton-X 100 em TBS). Em seguida, foram incubados a 4 °C, *overnight*, com os respectivos anticorpos primários anti-Iba-1 (*ionized calcium-binding adapter molecule 1* - marcador de micróglia; 1:500 – Wako) ou GFAP (*glial fibrillary acidic protein* - marcador de astrócitos; 1:1000; Cell Signaling) e, posteriormente incubados com o respectivo anticorpo secundário por 1 h. Para Iba-1, foi usado Alexa Fluor 594

e para o GFAP, Alexa Fluor 488 (1:1000; Invitrogen, EUA). Ao término do procedimento, os cortes foram montados em lâmina/lamínula com auxílio do meio de montagem Fluoromount (Sigma-Aldrich, EUA) e analisadas em microscópio de fluorescência (Axio Imager A2, Carl Zeiss, Alemanha).

4.8 Análise das imagens

Após a realização das técnicas de FJC e de imunofluorescência, as fotomicrografias foram obtidas com o auxílio de uma câmera digital acoplada ao microscópio de fluorescência (Axio Imager A2, Carl Zeiss, Alemanha). Posteriormente, elas foram analisadas utilizando o programa ImageJ (NIH, EUA). A fim de quantificar áreas iguais em todas as fotomicrografias, uma máscara foi aplicada nas regiões anatômicas de interesse para assegurar que as medidas de densidade fossem representativas das áreas analisadas. Utilizando o ImageJ, as fotomicrografias foram convertidas para escala cinza e, uma máscara foi gerada. A intensidade do sinal (pixels/ μm^2) das células FJC⁺ foi calculada em três diferentes regiões anatômicas do hipocampo, CA1, GD e CA3, bem como na região do núcleo septal lateral. A intensidade do sinal das células Iba-1⁺ foi calculada nas três áreas hipocâmpais descritas anteriormente, bem como nas regiões do córtex pré-frontal pré-límbica, medial, motora, ventrolateral e insular agranular. A análise das células GFAP⁺ foi calculada nas três regiões hipocâmpais. Segundo o Atlas Paxinos & Franklin (PAXINOS; FRANKLIN, 2001), as injeções foram realizadas em -1.9 mm (AP). Portanto, para se evitar o dano causado perto do sítio de injeção, foram utilizados cortes contendo a formação hipocâmpal de -1,7 a -1,8 mm e de -2,1 a -2,2 mm (AP) em relação ao bregma. Para a análise do córtex pré-frontal, utilizou-se cortes de 2,4 a 2,8 mm (AP) em relação ao bregma. E para a análise do núcleo

septal lateral, utilizou-se cortes de 0,4 a 0,9 mm (AP) em relação ao bregma. Seis a oito cortes de cada região anatômica/animal foram utilizados para a realização das análises. Após a quantificação dos dois hemisférios de cada corte, foi obtido um valor médio, representativo de cada animal.

4.9 Cultura primária de neurônios hipocampais

Culturas de neurônios foram preparadas a partir da região do hipocampo de camundongos WT e PI3K γ ^{-/-} recém-nascidos, com até 2 dias de vida. Após a dissecação do tecido hipocampal, o mesmo foi submetido à digestão com tripsina, seguido por dissociação celular mecânica com auxílio de uma pipeta de Pasteur polida no fogo. As células foram adicionadas ao meio neurobasal suplementado com N2 e B27, 2 mM de GlutaMAX, 50 µg/ml de penicilina, e 50 µg/ml de estreptomicina e, em seguida plaqueadas em placas de 4 poços previamente preparadas com poli-L-ornitina. As células foram incubadas a 37 °C e 5 % de CO₂ em uma incubadora umidificada e cultivadas durante 10 a 12 dias, com troca de meio a cada 4 dias (DORIA et al., 2013).

4.10 Ensaio de morte celular

Para o ensaio de morte celular, foi utilizado o kit LIVE/DEAD (Life Technologies, Índia). O kit é composto pelos reagentes calceína-AM-AM e homodímero de etídeo-1 (EthD-1). O teste se baseia no princípio de que a calceína-AM-AM é permeável à membrana celular, porém, após ser clivada por esterases contidas em células vivas, a mesma se torna incapaz de atravessar a membrana, permanecendo retida dentro da célula e levando a um aumento da fluorescência verde ao longo do corpo celular. O EthD-1 só é capaz de permear células que

apresentem membrana danificada, ou seja, em processo de morte. Após permear a membrana celular, o EthD-1 se liga aos ácidos nucleicos, emitindo fluorescência vermelha. Os neurônios foram pré-incubados com diferentes drogas ou seus respectivos veículos. São elas: inibidor de PI3K γ , AS605240 (0,01; 0,1 ou 1,0 μ M, -15 min em relação ao CBD) e CBD (0,1; 1 ou 10 μ M, -15 min em relação ao glutamato). Posteriormente, foram incubados com glutamato (50 μ M) ou veículo. Após o tempo de incubação, os neurônios foram marcados com calceína-AM (1 μ M) e EthD-1 (2 μ M), preparado em solução PBS 1X por 15 minutos na incubadora. Em seguida, os neurônios foram lavados três vezes com PBS 1X aquecido a 37 °C. As fotos foram obtidas por meio do microscópio FLOID[®], utilizando o filtro 488 nm para as imagens verdes (calceína-AM-AM) e 633 nm para as imagens vermelhas (EthD-1). Foi considerado um número mínimo de 300 células, vivas ou mortas, contidas em 3 campos analisados por poço, utilizando o programa ImageJ (NIH, EUA). O número de células mortas foi expresso como porcentagem do número total de células analisadas. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.11 Preparação de sinaptossomas hipocampais

Animais WT e PI3K γ ^{-/-} foram decaptados e seus hipocampus removidos e transferidos para tubos contendo 10 mL de solução gradiente. O tecido foi homogeneizado e em seguida centrifugado a 1000 g, a 4 °C, por 10 min. O sobrenadante dessa centrifugação foi aplicado em um gradiente descontínuo de Percoll[®] (23%, 15%, 10 e 3% v/v em solução gradiente) (DUNKLEY et al., 1986) e submetido à centrifugação a 37000 g, a 4 °C, por 15 min. As frações P3 e P4 foram recolhidas em conjunto e submetidas à outra centrifugação a 37000 g, 4 °C, por 15 min em KRH sem cálcio, para retirada do excesso de Percoll[®]. O precipitado

resultante dessa centrifugação foi diluído em 1200 μL de KRH sem cálcio. Alíquotas de 200 μL foram transferidas para tubos cônicos de microcentrífuga e mantidas no gelo até a realização dos experimentos. Uma amostra de 50 μL foi separada e congelada à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior quantificação de proteínas (LOWRY et al., 1951).

4.12 Ensaio para liberação de glutamato

A quantidade de glutamato liberada pelo terminal pré-sináptico foi determinada realizando o experimento de liberação contínua de glutamato em sinaptossomas hipocâmpais estimulados com KCl. Esse ensaio é baseado na reação envolvendo GDH (glutamato desidrogenase), NADP⁺ (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato), NADPH e glutamato. Quando o glutamato é liberado pelos sinaptossomas, ele sofre oxidação pela enzima GDH, sendo o NADP⁺ o acceptor dos elétrons provenientes desta oxidação. O NADPH ao ser excitado por luz em comprimento de onda de 360 nm, emite luz no comprimento de onda de 450 nm, que é detectada por um fotomultiplicador no espectrofluorímetro (NICHOLLS; SIHRA; SANCHEZ-PRIETO, 1987; ROMANO-SILVA et al., 1993). Resumidamente, preparou-se uma reação contendo uma mistura de sinaptossomas (30 μg de proteína por poço), CaCl₂ (1mM), NADP⁺ (1mM), diluídos em KRH. Essa reação foi transferida para microplacas de 96 poços (300 μL /poço), para serem, posteriormente lidas em espectrofluorímetro (Synergy 2, EUA). Após 3 min, GDH (35 UI por poço) foi adicionado e a leitura foi reiniciada. Subsequentemente, foi adicionado o inibidor de PI3K γ , AS605240 (1, 10 ou 100 nM, -15 min) e/ou KCl (33 mM), em preparações sinaptossomais obtidas de animais WT. Nas preparações obtidas de animais PI3K γ ^{-/-} foi adicionado somente KCl. Curvas de calibração foram realizadas com a adição de

quantidade conhecida de glutamato (5 UI). Os experimentos foram realizados a 37 °C, com um comprimento de onda de excitação de 360 nm e de emissão de 450 nm.

4.13 Medida da concentração de cálcio livre intrasinaptossomal

A entrada de cálcio no terminal pré-sináptico foi determinada utilizando-se a preparação de sinaptossomas e a marcação com a sonda fluorescente Fura-2 AM (Sigma-Aldrich, USA). Ao cruzar a membrana citoplasmática, ela é clivada por esterases inespecíficas presentes no citoplasma e se transforma em FURA-2, que é hidrofílico o suficiente para não escapar do interior dos sinaptossomas. O processo de determinação do $[Ca^{2+}]_i$ se baseia no fato de que o FURA-2 tem sua fluorescência aumentada quando se liga ao Ca^{2+} . Cloreto de Cálcio ($CaCl_2$, 1 mM) foi adicionado à preparação de sinaptossomas aos 30 s iniciais de cada análise fluorimétrica. A preparação foi transferida para uma placa de 96 poços, a 37°C, sendo, em seguida, realizada uma leitura basal. As drogas foram então adicionadas 10 min antes da indução da despolarização da membrana com KCl (33 mM). A leitura foi realizada em espectrofluorímetro de placa (Synergy 2, BioTek, EUA), e a temperatura foi mantida a 37 °C.

O aumento da $[Ca^{2+}]_i$ induzido pela despolarização da membrana é estritamente dependente da presença de Ca^{2+} extracelular nestas condições (ROMANO-SILVA et al., 1993). O FURA-2 livre apresenta excitação máxima no comprimento de 380 nm e, quando ligado ao cálcio, de 340 nm. Portanto, os sinaptossomas foram iluminados alternadamente com luz nos comprimentos de 340 e 380 nm, e a luz emitida, no comprimento de 505 nm. Para calibração, utilizou-se o EGTA para calcular a fluorescência mínima (R_{min}) e o SDS 10% para obtenção da fluorescência máxima (R_{max}). Os pontos foram registrados em intervalos de 74 ms.

Foram quantificadas as concentrações basais e as fases inicial e a final da entrada de cálcio. A fase inicial consiste na quantidade de cálcio que entra no sinaptossoma imediatamente após o estímulo e a fase final na quantidade de cálcio que entra no sinaptossoma no intervalo de tempo total do registro, considerando para o cálculo os 10 últimos pontos registrados (GRYNKIEWICZ; POENIE; TSIEN, 1985).

4.14 Medida dos níveis hipocampais de fatores neurotróficos

Os animais WT e PI3K γ ^{-/-} tiveram seus hipocampos dissecados, 8 h após a administração de PILO ou veículo. Essas estruturas foram, então, devidamente acondicionadas e estocadas a -80 °C. Posteriormente, após o descongelamento, foram adicionadas às amostras 1,0 mL de solução inibidora de proteases [NaCl 0,4 M; Tween 20 0,05%; soroalbumina bovina (BSA) 0,5%; fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) 0,1 mM; cloreto de benzetônio 0,1 mM; EDTA 10 mM; 20 UI de aprotinina, diluídos em tampão fosfato], para extração de citocinas. As proteínas totais das amostras foram quantificadas pelo método de Bradford (Bio-Rad, EUA) e, posteriormente analisadas pelo ensaio imunoenzimático ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) para detecção da concentração do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fator de crescimento neural (NGF) e fator neurotrófico derivado de células da glia (GDNF) (R&D Systems, EUA).

4.15 Análise comportamental das crises convulsivas induzidas pela administração intraperitoneal de PTZ

Imediatamente após a administração intraperitoneal do PTZ (60 mg/kg), os animais WT e PI3K γ ^{-/-} foram monitorados durante 15 min e parâmetros, tais como a latência, duração (em segundos) e número de crises tônico-clônica generalizadas

foram mensurados. As crises tônico-clônico generalizadas foram acompanhadas pela ocorrência de corrida, pulos, perda de reflexo postural, podendo evoluir com morte do animal (VILELA et al., 2013). Todos os experimentos, especificados no item 4.18, foram gravados com auxílio de uma câmera digital (Sony DCR-SR68), para posterior análise comportamental.

4.16 Cirurgia para implantação de eletrodos corticais

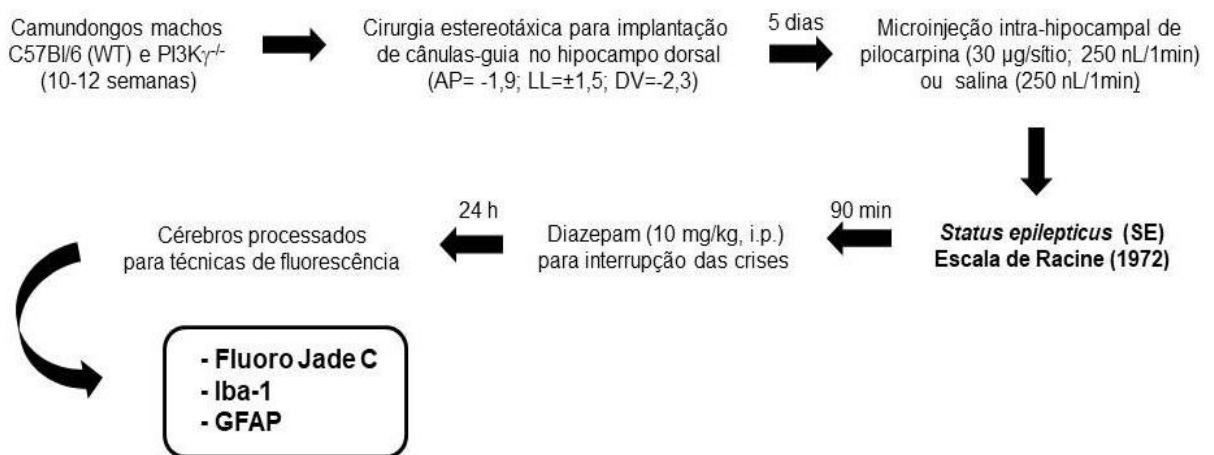
Os animais WT e PI3K γ ^{-/-} foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal (i.p.) de cetamina:xilazina (80 mg/kg:8 mg/kg; Syntec[®], Brasil) sendo, em seguida, submetidos à tricotomia do escalpo e seu crânio fixado a um aparelho estereotáxico (Insight[®], Brasil). Eletrodos aderidos a parafusos de aço inoxidável foram implantados no córtex parietal dos animais, de acordo com as coordenadas estabelecidas pelo Atlas Paxinos & Franklin (PAXINOS; FRANKLIN, 2001): \pm 2,0 mm médio-lateral e -2,0 mm ântero-posterior, em relação ao bregma. Um eletrodo de referência e um de aterramento foram implantados no osso nasal. Em seguida, os eletrodos foram fixados ao crânio com cimento de zinco e soldados a um conector modelo barra de pinos. Os animais receberam, de forma profilática, injeções intramusculares do agente antimicrobiano de amplo espectro Pentabiótico[®] (0.27 g/kg; Fort Dodge, Brazil) e do analgésico e antiinflamatório Banamine[®] (0.025 g/kg; Schering Plough, Brazil). Ao término da cirurgia, os animais permaneceram no laboratório até completa recuperação. Em seguida, foram levados ao biotério, onde permaneceram por 5 dias e, posteriormente, submetidos ao protocolo de vídeo-EEG.

4.17 Análise comportamental e eletroencefalográfica das crises convulsivas induzidas pela administração intraperitoneal de PTZ

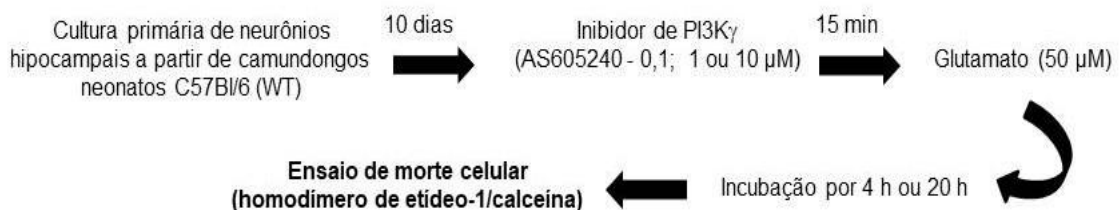
O protocolo de gravação do vídeo-EEG foi iniciado 3 min antes da administração de PTZ (60 mg/kg; i.p.) para o registro da leitura basal, permanecendo por mais 15 min. Os animais foram colocados em caixas individuais com isolamento acústico, para posterior análise simultânea do comportamento e do perfil eletroencefalográfico das crises convulsivas. As crises tônico-clônico generalizadas foram acompanhadas pela ocorrência de corrida, pulos, perda de reflexo postural, podendo evoluir com morte do animal (VILELA et al., 2013). O sinal do EEG foi amplificado (1000X), filtrado (1 Hz alta frequência e 200 Hz baixa frequência) e digitalizado utilizando um conversor A/D (Kananda® Ltda, Brazil), ajustado a uma taxa de amostragem de 1 kHz e estocado em computador convencional. Os dados foram analisados off-line de acordo com os seguintes parâmetros: latência para o início da primeira crise eletroencefalográfica tônico-clônica; duração da crise eletroencefalográfica tônico-clônica e número de crises tônico-clônicas.

4.18 Protocolos experimentais no formato de esquema

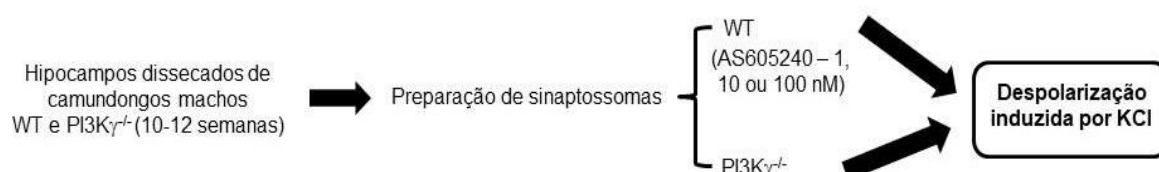
4.18.1 Esquema 1: Avaliação das crises convulsivas, morte neuronal e marcação microglial e astrocitária induzidas por PILO, na presença ou ausência de PI3K γ



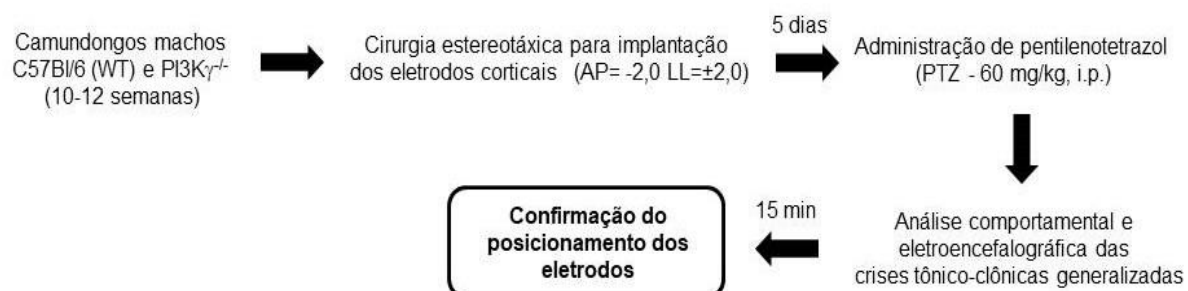
4.18.2 Esquema 2: Avaliação da inibição farmacológica de PI3K γ no ensaio de morte neuronal induzida por glutamato *in vitro*



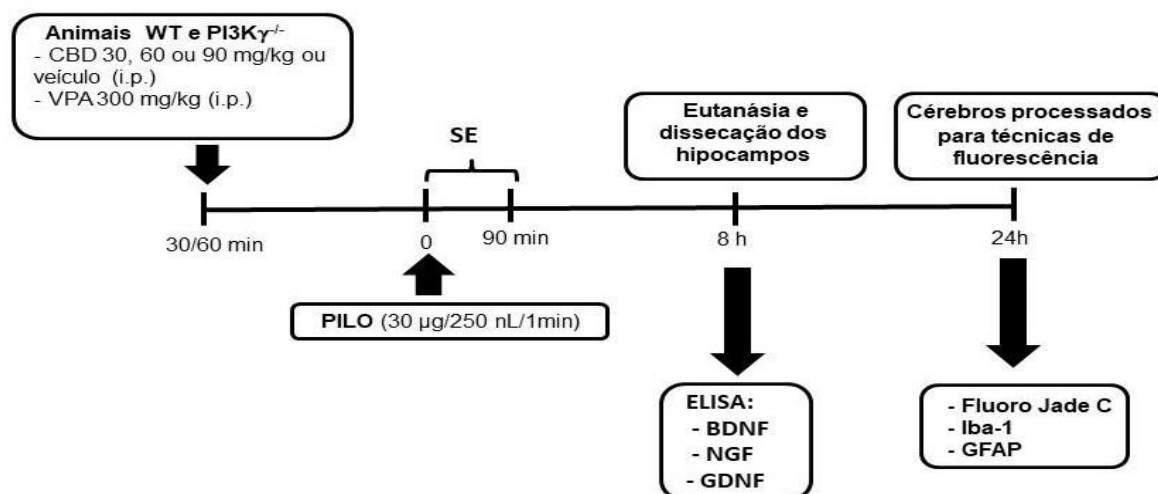
4.18.3 Esquema 3: Avaliação da liberação de glutamato e do conteúdo de cálcio citosólico em preparações de sinaptossomas hipocampais, mediante inibição farmacológica ou deleção genética de PI3K γ



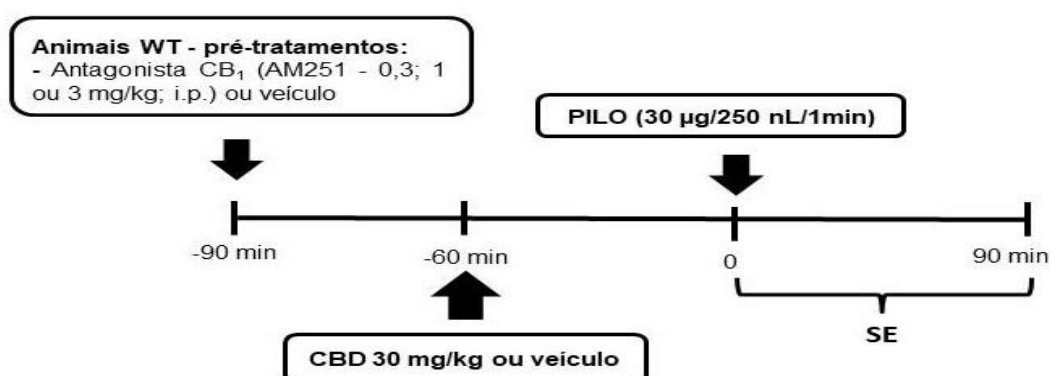
4.18.4 Esquema 4: Avaliação das crises convulsivas induzidas por PTZ na presença ou ausência de PI3K γ



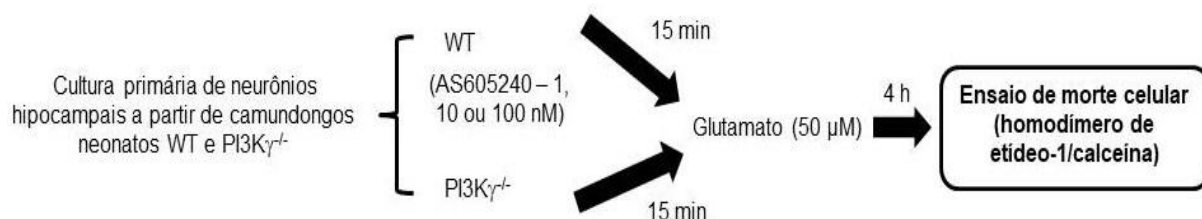
4.18.5 Esquema 5: Avaliação do efeito do CBD sobre crises convulsivas, morte neuronal e marcação microglial e astrocitária induzidas por PILO, na presença ou ausência de PI3K γ



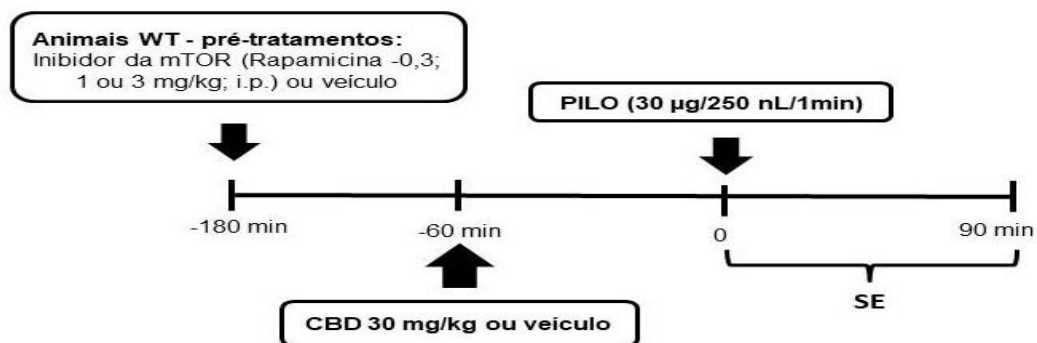
4.18.6 Esquema 6: Avaliação do antagonismo de receptores CB1 sobre o efeito anticonvulsivante do CBD em modelo de crises induzidas por PILO



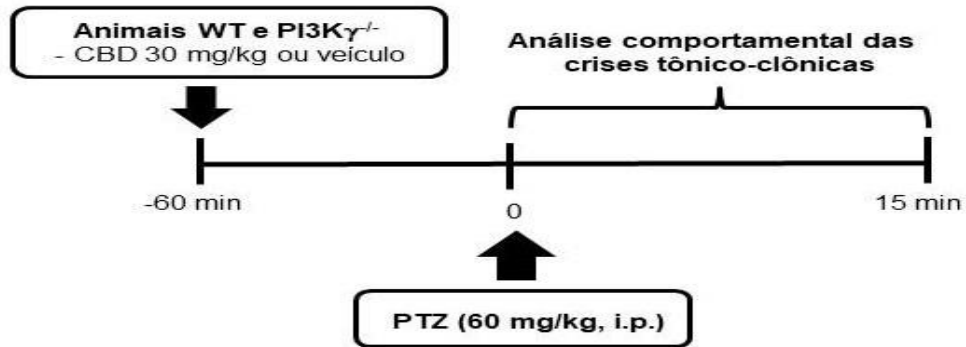
4.18.7 Esquema 7: Avaliação da inibição genética e farmacológica de PI3K γ sobre o efeito neuroprotetor do CBD no ensaio de morte neuronal induzida por glutamato *in vitro*



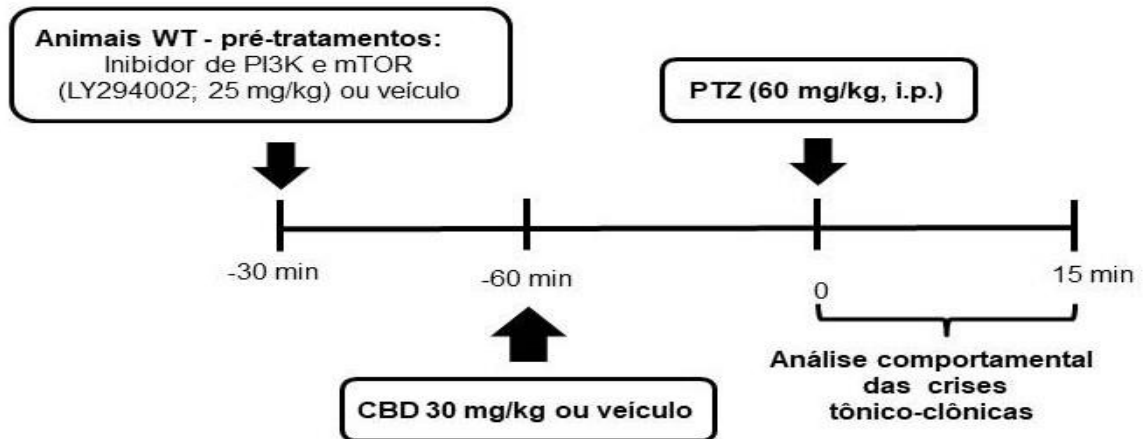
4.18.8 Esquema 8: Avaliação do antagonismo de receptores CB1 sobre o efeito anticonvulsivante do CBD em modelo de crises induzidas por PILO



4.18.9 Avaliação da deleção genética de PI3K γ sobre o efeito anticonvulsivante do CBD em modelo de crises induzidas por PTZ



4.18.10 Esquema 10: Avaliação da inibição farmacológica de PI3K e de mTOR sobre o efeito anticonvulsivante do CBD em modelo de crises induzidas por PTZ



4.19 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa estatístico Prism 5.0 (GraphPad, EUA). Os dados comportamentais foram analisados pelo Teste t de student, análise de variância de uma via (One-way ANOVA) ou de duas vias (Two-way ANOVA), seguidos pelo teste de Bonferroni para variáveis com distribuição paramétrica. Os dados de cultura de células foram analisados por One-way ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls. E os dados histológicos foram analisados por One-way ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls ou Two-way ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni para variáveis com distribuição paramétrica. Os dados foram apresentados como média \pm erro-padrão (EP). O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Análise da degeneração de neurônios hipocampais e do núcleo septal lateral de animais WT e PI3K γ ^{-/-} submetidos ao *status epilepticus* induzido pela administração intra-hipocampal de PILO.

Trabalho prévio realizado pelo nosso grupo demonstrou que os animais WT e PI3K γ ^{-/-} apresentaram diferenças no perfil de SE induzido pela administração intra-hipocampal de PILO. Os animais PI3K γ ^{-/-} apresentaram um SE mais severo que os animais WT, sendo observado nos animais *knockout* uma menor latência para o início das crises e um maior número de crises convulsivas (índices 4 e 5 da Escala de Racine) (LIMA et al., 2015). Diante desses resultados, verificou-se, no presente trabalho, possíveis diferenças em algumas alterações histopatológicas agudas promovidas pela indução do SE.

Para isso, inicialmente, foi avaliada a degeneração neuronal, pela técnica de Fluoro-Jade C, no hipocampo e no núcleo septal lateral de animais WT e PI3K γ ^{-/-}, 24 h após a administração intra-hipocampal de PILO (30 μ g/0,25 μ l/ sítio). Observou-se um aumento de morte neuronal nas regiões hipocampais CA1 [fator tratamento vs genótipo (F(1,16)=23,94; p<0,001), fator tratamento (F(1,16)=299,61; p<0,0001) e fator genótipo (F(1,16)=24,56; p<0,0001)], GD [fator tratamento vs genótipo (F(1,16)=2,41; ns), fator tratamento (F(1,16)=35,87; p<0,001) e fator genótipo (F(1,16)=2,62; ns)] e CA3 [fator tratamento vs genótipo (F(1,16)=0,13; ns), fator tratamento (F(1,16)=28,03; p<0,0001) e fator genótipo (F(1,16)=0,37; ns)] de animais WT e PI3K γ ^{-/-}, submetidos ao SE induzido pela administração intra-hipocampal de PILO (Figura 5). Ainda, foi observado um aumento mais pronunciado de morte

neuronal induzida por PILO na região CA1 dos animais $PI3K\gamma^{-/-}$ em relação aos animais WT (Figuras 5A e 5B).

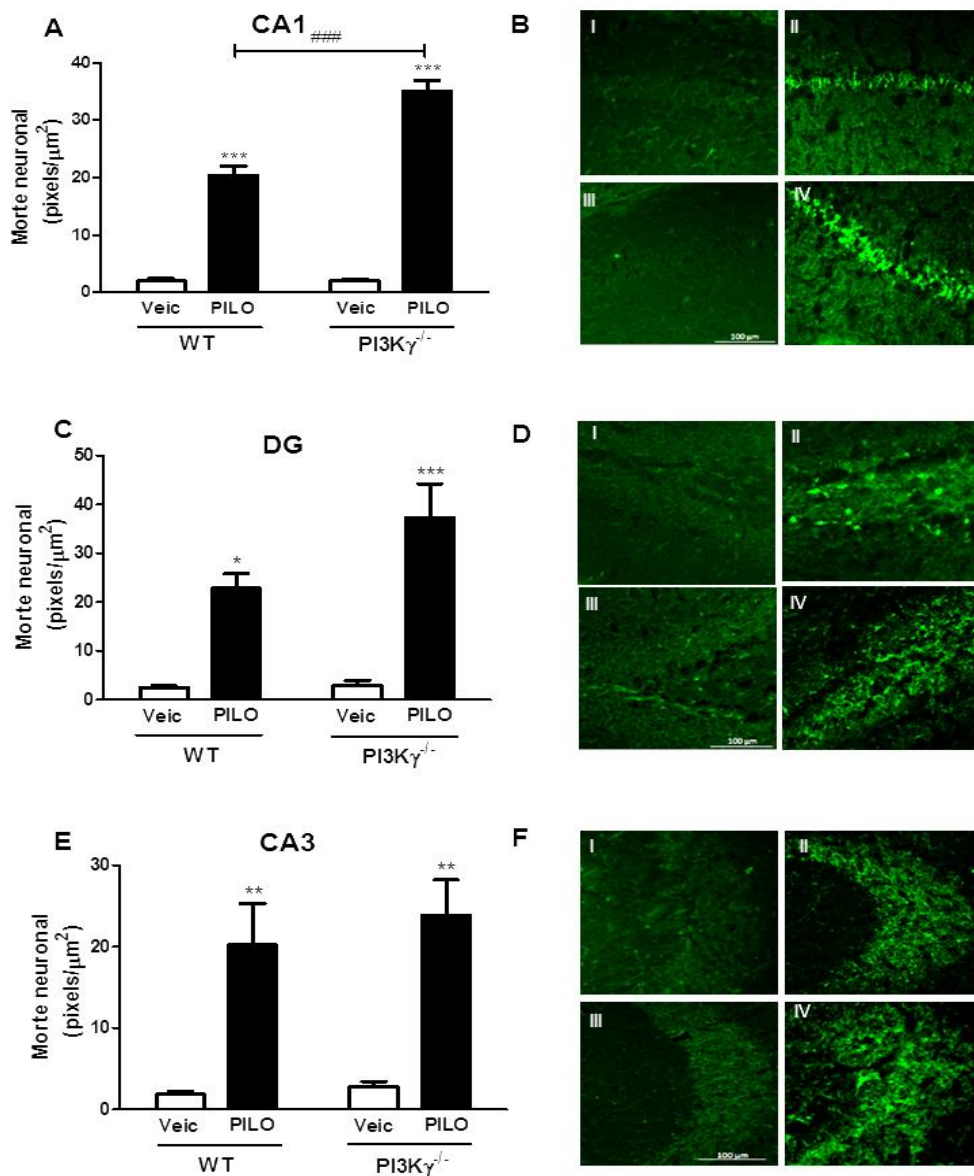


Figura 5: Análise da morte neuronal no hipocampo de animais WT e $PI3K\gamma^{-/-}$ 24 h após a administração de PILO (II e IV) ou veículo (Veic; I e III). Foram analisadas as regiões CA1 (A, B), GD (C, D) e CA3 (E, F), gráficos e fotomicrografias representativas, respectivamente. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Bonferroni; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** ### $p < 0,001$.

A área septal é constituída pelos núcleos septais e situa-se imediatamente à frente da comissura anterior. Essa região recebe projeções ascendentes e descendentes, principalmente do hipocampo, via fímbria e fórnix. O núcleo septal lateral recebe projeções descendentes do hipocampo (SHEEHAN; CHAMBERS; RUSSELL, 2004). Nesse contexto, avaliou-se se uma hiperestimulação hipocampal poderia induzir morte nessa região. De modo semelhante ao hipocampo, foi observado um aumento de morte neuronal no núcleo septal lateral de animais WT e $PI3K\gamma^{-/-}$ 24 h após o SE induzido pela administração intra-hipocampal de PILO [fator tratamento vs genótipo ($F(1,16)=23,33$; $p<0,001$), fator tratamento ($F(1,16)=98,64$; $p<0,0001$) e fator genótipo ($F(1,16)=32,16$; $p<0,0001$); Figura 6]. Houve um aumento mais pronunciado de morte neuronal no núcleo septal lateral de animais $PI3K\gamma^{-/-}$, em relação animais WT.

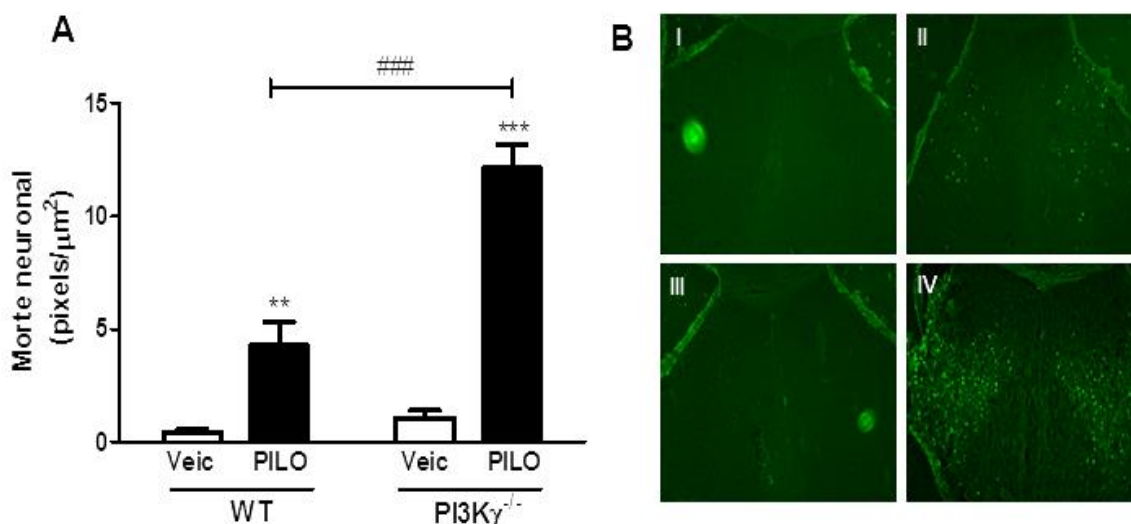


Figura 6: Análise da morte neuronal no núcleo septal lateral de animais WT e $PI3K\gamma^{-/-}$ 24 h após a administração de PILO (II e IV) ou veículo (Veic; I e III). Gráfico (A) e fotomicrografias representativas (B), respectivamente. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Bonferroni; ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

5.2 Análise do pré-tratamento com o inibidor da PI3K γ , AS605240, no ensaio de morte celular induzida por glutamato em cultura de neurônios hipocampais

Com o objetivo de corroborar os dados obtidos *in vivo*, avaliou-se o efeito da inibição farmacológica de PI3K γ sobre a morte celular induzida por glutamato, em cultura de neurônios hipocampais. Para isso, foi utilizado o inibidor da PI3K γ , AS605240 (0,01; 0,1 ou 1,0 μ M; -15 min). Após o pré-tratamento com o AS605240, foi adicionado glutamato (50 μ M) às culturas e, em seguida, incubadas por 20 h, para posterior realização do ensaio de morte celular. Observou-se um aumento da morte celular em relação ao basal, em todos os grupos tratados com o inibidor PI3K γ , com ou sem adição de glutamato ($F(7,16)=8,40$; $p<0,001$; Figura 7A).

No entanto, para se investigar o envolvimento de PI3K γ no mecanismo de ação de drogas, buscou-se uma concentração ou tempo de incubação que não promovesse uma inibição tão intensa de PI3K γ , capaz de induzir morte celular sem a adição de glutamato. Portanto, as culturas foram incubadas com AS605240 nas mesmas concentrações utilizadas anteriormente por um período de 4 h. Observou-se que a menor concentração testada (0,01 μ M) não apresentou diferença significativa em relação ao basal, sendo esta concentração utilizada para a realização dos experimentos posteriores ($F(7,8)=6,69$; $p<0,01$; Figura 7B).

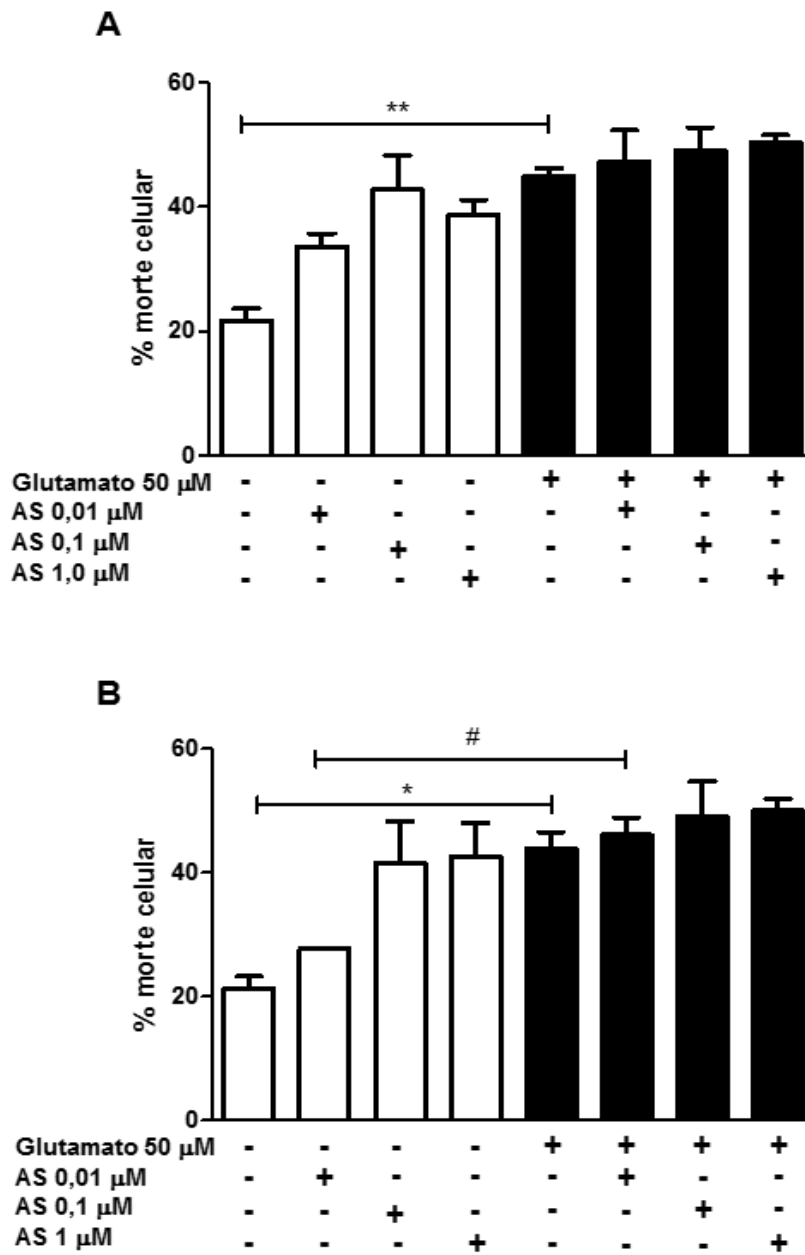


Figura 7: Efeito do pré-tratamento com o inibidor da PI3K γ , AS605240 (0,01; 0,1 ou 1 μM), no ensaio de morte celular induzida por glutamato em cultura de neurônios hipocâmpais. Tempos de incubação: 20 h (A) e 4 h (B). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls; * $\#p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *basal vs glutamato; # AS605240 0,01 μM +veículo vs AS605240 0,01 μM +glutamato.

5.3 Envolvimento de PI3K γ na liberação de glutamato e no conteúdo de cálcio citosólico em preparações de sinaptossomas hipocampais

Diante dos resultados sobre morte neuronal *in vivo* e *in vitro* apresentados anteriormente, verificou-se se os animais PI3K γ ^{-/-} apresentavam alguma alteração na neurotransmissão glutamatérgica, em condições fisiológicas, sem a indução de insulto epileptogênico.

Para isso, foi analisado a liberação de glutamato e o conteúdo de cálcio citosólico, a partir de preparações de sinaptossomas obtidas do hipocampo de animais WT e PI3K γ ^{-/-} e de animais WT pré-tratados com o inibidor seletivo de PI3K γ ^{-/-}, AS605240 (1, 10 ou 100nM), estimuladas com KCl. Observou-se um aumento da liberação de glutamato das preparações obtidas de animais PI3K γ ^{-/-}, bem como das incubadas com as concentrações de 10 e 100 nM de AS605240, em relação aos controles (F(4,11)=8,47; p<0,01; Figura 8A). Foi observado também um aumento da concentração de cálcio citosólico nas preparações de sinaptossomas hipocampais de animais PI3K γ ^{-/-}, e de animais WT pré-tratados com AS605240 (100 nM), em relação aos controles (F(2,16)=22,21; p<0,0001; Figura 8B).

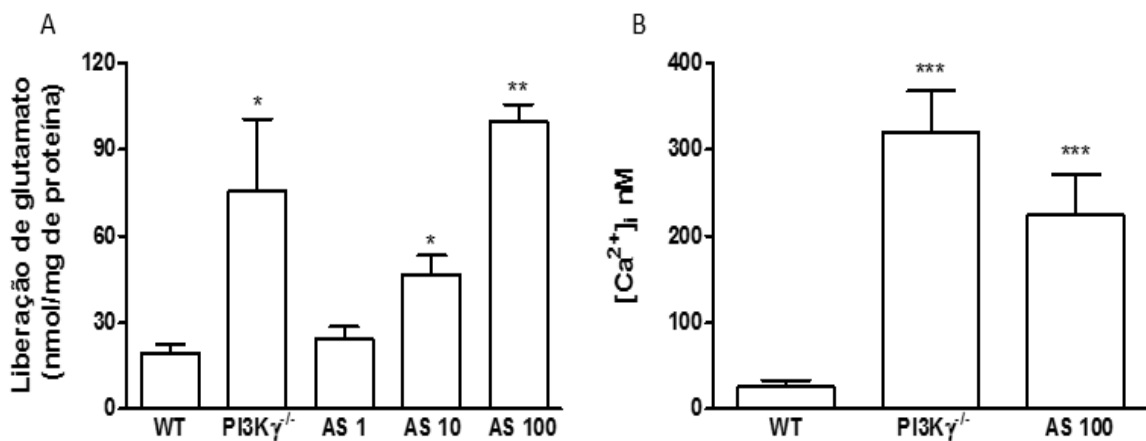


Figura 8: Análise da liberação de glutamato (A) e do conteúdo de cálcio citosólico (B) de preparações de sinaptossomas obtidas do hipocampo de animais WT e PI3K γ ^{-/-} e, de animais WT pré-tratadas com o inibidor seletivo de PI3K γ , AS605240 (1, 10 ou 100nM), estimuladas com KCl. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Newman-Keuls; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

5.4 Análise da marcação microglial e astrocitária de animais WT e PI3K γ ^{-/-} submetidos ao *status epilepticus* induzido pela administração intra-hipocampal de PILO

Trabalhos prévios realizados pelo nosso grupo, demonstraram que os animais PI3K γ ^{-/-} submetidos ao SE induzido pela administração intra-hipocampal de PILO apresentaram um aumento hipocampal e cortical das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF- α), em relação aos animais WT. Portanto, buscou-se, no presente trabalho, avaliar possíveis diferenças na ativação microglial e astrocitária pós-SE.

Para isso, foi realizada, pela técnica de imunofluorescência, a marcação de micróglia (células Iba-1⁺ no hipocampo e córtex pré-frontal) e de astrócitos (células GFAP⁺ no hipocampo) em animais WT e PI3K γ 24 h após a administração intra-hipocampal de PILO (30 μ g/0,25 μ l/sítio). Observou-se um aumento da marcação de

células Iba-1⁺ nas regiões CA1 [fator tratamento vs genótipo (F(1,17)=0,07; ns), fator tratamento (F(1,17)=38,45; p<0,0001) e fator genótipo (F(1,17)=4,21; p=0,056)], GD [fator tratamento vs genótipo (F(1,17)=0,00; ns), fator tratamento (F(1,17)=17,6; p<0,001) e fator genótipo (F(1,17)=0,80; ns)] e CA3 [fator tratamento vs genótipo (F(1,17)=0,36; ns) fator tratamento (F(1,17)=47,45; p<0,0001) e fator genótipo (F(1,17)=3,62; ns)] do hipocampo dos animais WT e PI3K γ ^{-/-} que receberam PILO (Figura 9).

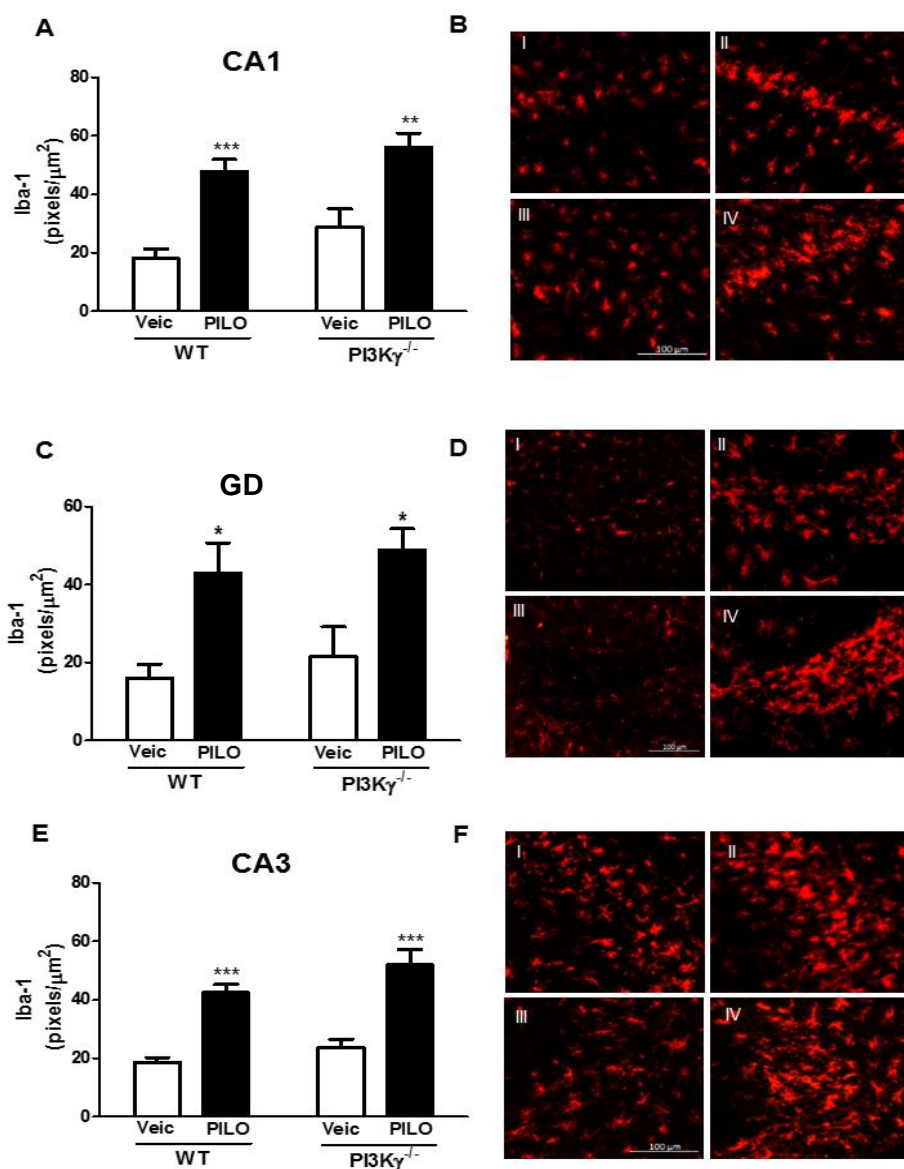


Figura 9: Análise da marcação microglial (células Iba-1⁺) no hipocampo de animais WT e PI3Kγ^{-/-} 24 h após a administração de PILO (II e IV) ou veículo (Veic; I e III). Foram analisadas as regiões CA1 (A, B), GD (C, D) e CA3 (E, F), gráficos e fotomicrografias representativas, respectivamente. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Bonferroni; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Foi avaliado também a marcação microglial no córtex pré-frontal desses animais, sendo observado um aumento mais pronunciado da marcação de células Iba-1⁺ nas áreas pré-límbica [fator tratamento vs genótipo (F(1,17)=0,79; ns), fator tratamento (F(1,17)=9,64; p<0,01) e fator genótipo (F(1,17)=2,44; ns)], medial [fator tratamento vs genótipo (F(1,17)=0,39; ns), fator tratamento (F(1,17)=8,04; p=0,011) e fator genótipo (F(1,17)=3,34; ns)] e motora [fator tratamento vs genótipo (F(1,17)=3,80; ns), fator tratamento (F(1,17)=10,94; p<0,01) e fator genótipo (F(1,17)=3,81; ns)] somente dos animais PI3K γ ^{-/-} (Figuras 10A-F). Não houve diferença entre os grupos, nas regiões ventrolateral [fator tratamento vs genótipo (F(1,17)=0,10; ns) fator tratamento (F(1,17)=3,89; ns), fator genótipo F(1,17)=2,01; ns) e insular agranular [fator tratamento vs genótipo (F(1,17)=0,48; ns), fator tratamento (F(1,17)=3,69; ns) e fator genótipo (F(1,17)=1,40; ns); Figuras 10G e 10H].

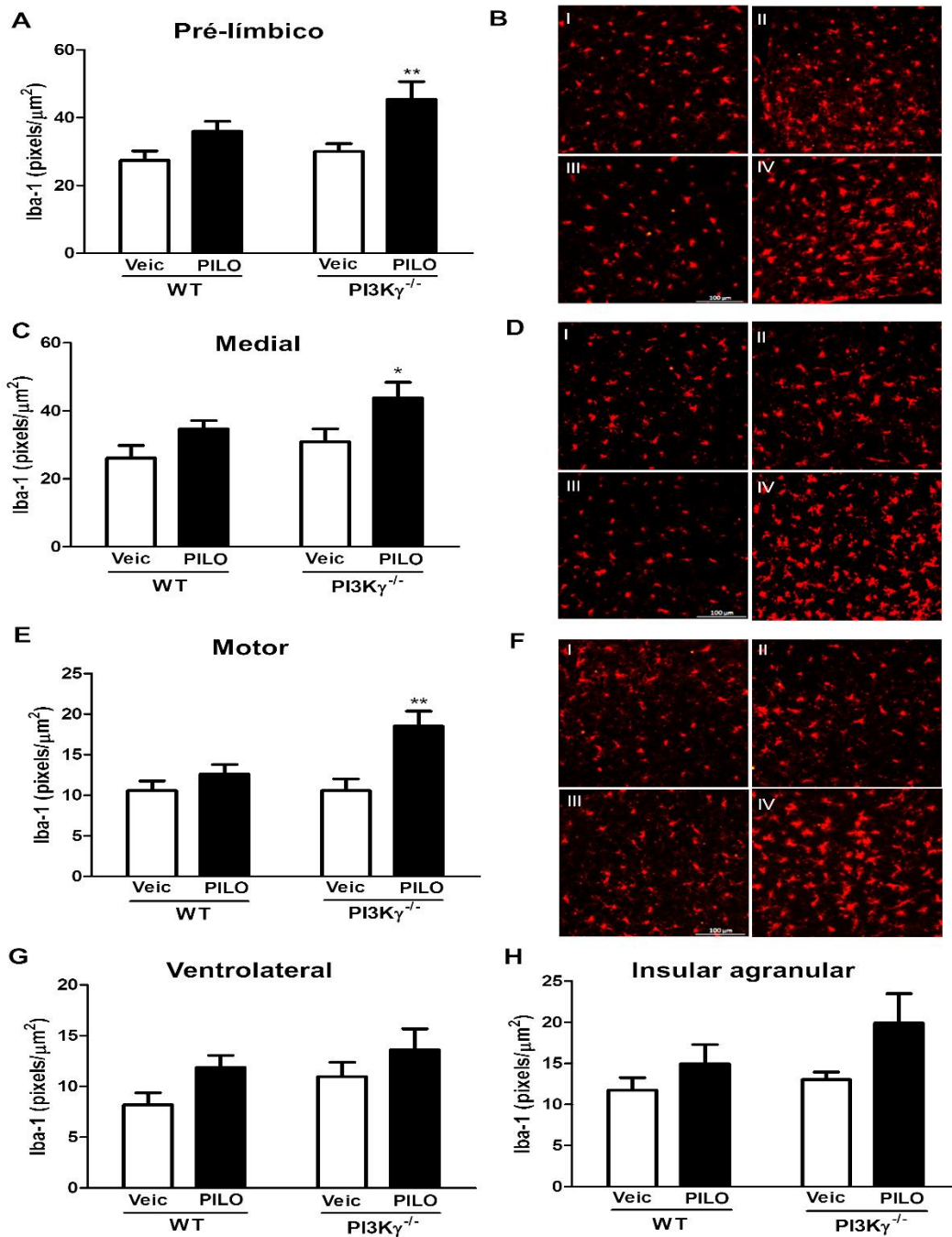


Figura 10: Análise da marcação microglial (células Iba-1⁺) no córtex pré-frontal de animais WT e PI3K γ ^{-/-} 24 h após a administração de PILO (II e IV) ou veículo (Veic; I e III). Foram analisadas as regiões pré-límbica (A, B), medial (C, D), motora (E, F), ventrolateral (G) e insular agranular (H) gráficos e fotomicrografias representativas, respectivamente. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Bonferroni; *p<0,05, **p<0,01.

Posteriormente, investigou-se se haveria diferenças no perfil de ativação astrocitária entre os animais WT e PI3K γ ^{-/-}. Foi observado um aumento da marcação de células GFAP⁺ nas regiões hipocâmpais CA1 [fator tratamento vs genótipo (F(1,15)=3,62; ns), fator tratamento (F(1,15)=108,85; p<0,0001), fator genótipo (F(1,15)=1,67; ns)], GD [fator tratamento vs genótipo F(1,15)=0,61; ns), fator tratamento (F(1,15)=76,54; p<0,0001)] e CA3 [fator tratamento vs genótipo F(1,15)=0,09; ns), fator tratamento (F(1,15)=94,27; p<0,0001) e fator genótipo F(1,15)=0,01; ns] dos animais WT e PI3K γ ^{-/-}, 24 h após a administração de PILO (Figura 11).

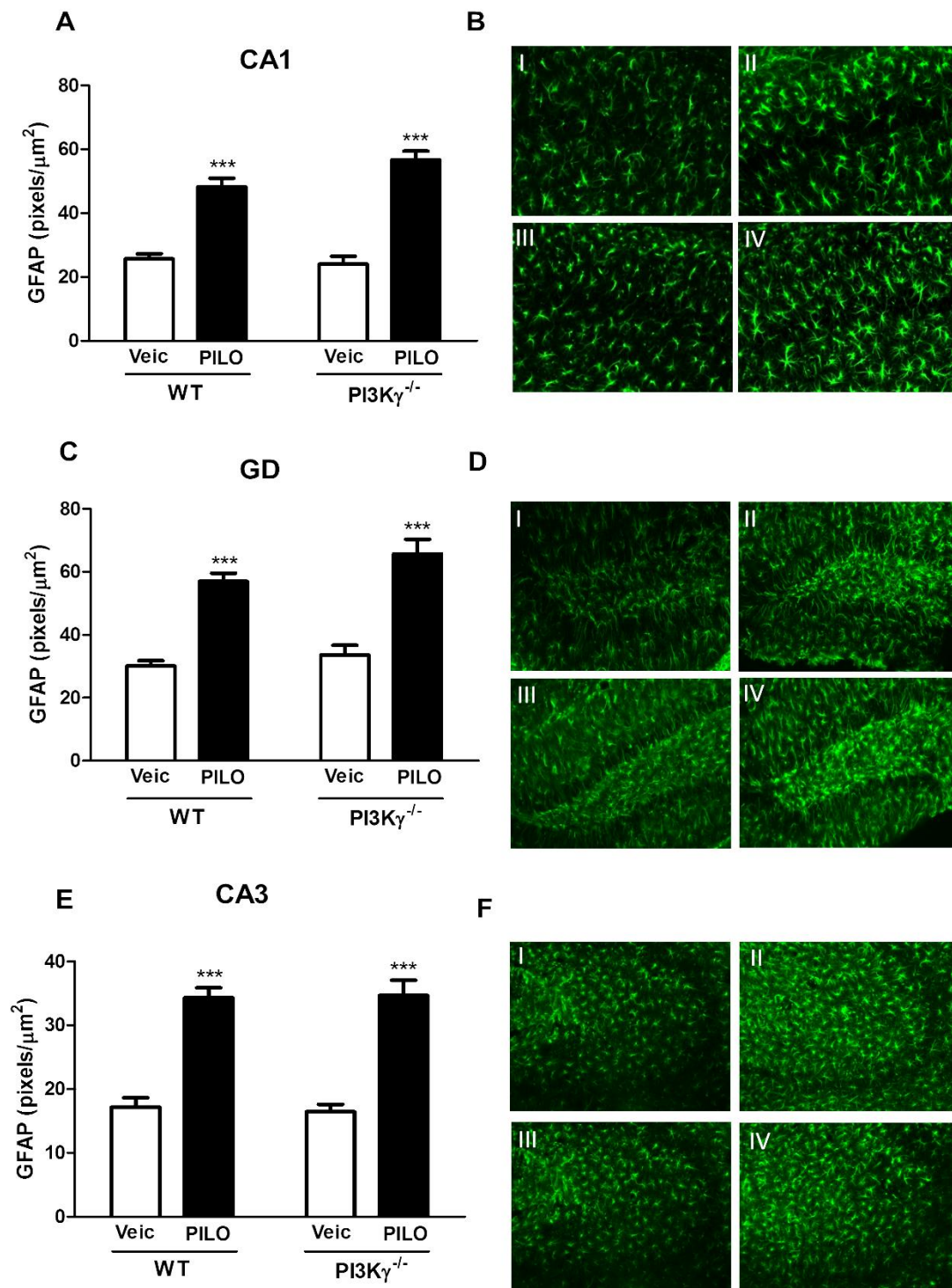


Figura 11: Análise da marcação astrocitária (células GFAP⁺) no hipocampo de animais WT e PI3K $\gamma^{-/-}$ 24 h após a administração de PILO (II e IV) ou veículo (Veic; I e III). Foram analisadas as regiões nas áreas CA1 (A, B), GD (C, D) e CA3 (E, F), gráficos e fotomicrografias representativas, respectivamente. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Bonferroni; ***p<0,001.

5.5 Análise comportamental e eletroencefalográfica das crises convulsivas induzidas por PTZ em animais WT e PI3K γ ^{-/-}

Com o objetivo de se verificar se o aumento da severidade das crises nos animais PI3K γ ^{-/-} era um efeito específico do modelo de PILO, avaliou-se o efeito da deleção genética de PI3K γ em outro modelo de crises convulsivas. Para isso, foi realizada a análise comportamental e eletroencefalográfica das crises convulsivas induzidas pela administração intraperitoneal de PTZ (60 mg/kg) em animais WT e PI3K γ ^{-/-}.

Observou-se que os animais PI3K γ ^{-/-} apresentaram uma menor latência para a ocorrência da primeira crise tônico-clônica [comportamental ($t(11)=2,14$; $p=0,055$) e eletroencefalográfica ($t(11)=2,57$; $p<0,05$); Figura 12A e 12B]. Além disso, os animais *knockout* apresentaram uma maior duração da primeira crise tônico-clônica [comportamental ($t(14)=3,49$; $p<0,01$ e eletroencefalográfica ($t(12)=1,71$; ns); Figura 12C e 12D)], bem como um maior número de crises tônico-clônicas (comportamental ($t(14)=2,76$; $p<0,05$) e eletroencefalográfica ($t(13)=2,71$; $p<0,05$); Figura 12E e 12 F).

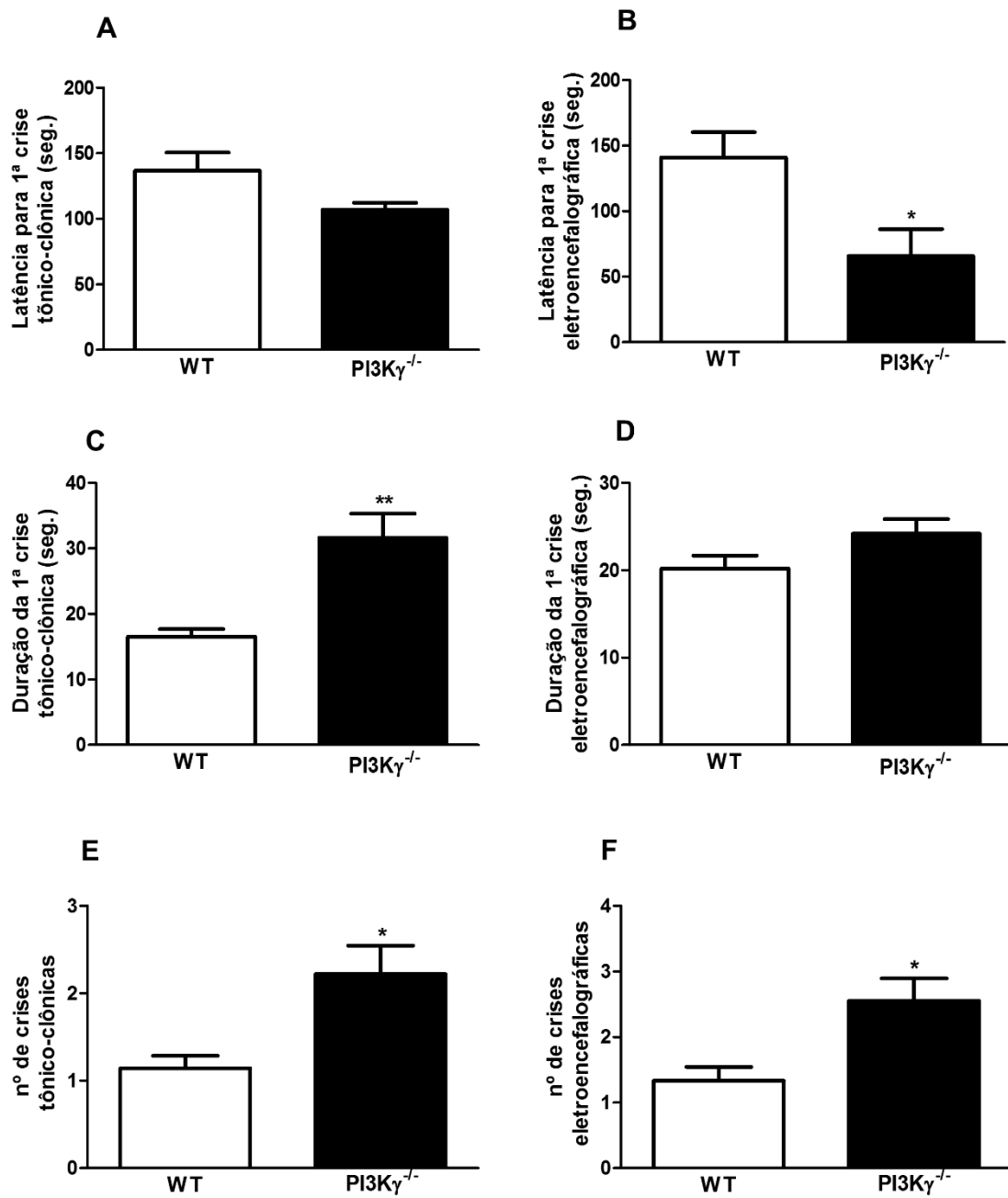


Figura 12: Efeito da deleção genética de PI3K γ ^{-/-} em modelo de crises convulsivas induzidas por PTZ. Foram realizadas análise comportamental e eletroencefalográfica para a avaliação da latência para a primeira crise tônico-clônica (A e B), a duração da primeira crise tônico-clônica (C e D) e número de crises tônico-clônicas (D e G). Os dados foram analisados por Teste t de student; *p<0,05, **p<0,01.

5.6 Avaliação do efeito anticonvulsivante do CBD sobre crises convulsivas induzidas pela administração intrahipocampal de PILO

Após verificada a participação da enzima PI3K γ em excitotoxicidade, crises convulsivas e alguns eventos pós-ictais, buscou-se, investigar, em uma segunda etapa deste trabalho, um possível envolvimento de PI3K γ , bem como da via PI3K/Akt/mTOR no mecanismo de ação anticonvulsivante e neuroprotetor do CBD.

Primeiramente, avaliou-se o efeito do CBD sobre o SE induzido pela administração intra-hipocampal de PILO. Foram utilizadas três doses de CBD (30, 60 ou 90 mg/kg), administradas, por via i.p, 60 min antes da administração de PILO (30 μ g/0,25 μ l/sítio). Foram avaliados a latência para o início do SE e o número de crises convulsivas com índices 4 e 5. O CBD apresentou um efeito anticonvulsivante nas três doses testadas, sendo observado um maior tempo de latência para a primeira crise convulsiva ($F(4,49)=5,88$; $p<0,001$; Figura 13A), bem como um menor número de crises convulsivas com índices 4 e 5 ($F(4,49)=14,72$; $p<0,001$; Figura 13B). Além disso, o CBD foi capaz de reduzir a porcentagem de animais que atingiram o SE (Figura 13C), em comparação ao grupo que recebeu veículo. Valproato de sódio (VPA; 300 mg/kg) foi usado como controle positivo, sendo administrado por via i.p., 30 min após a administração de PILO. Os animais pré-tratados com o CBD não apresentaram diferenças significativas em relação ao VPA.

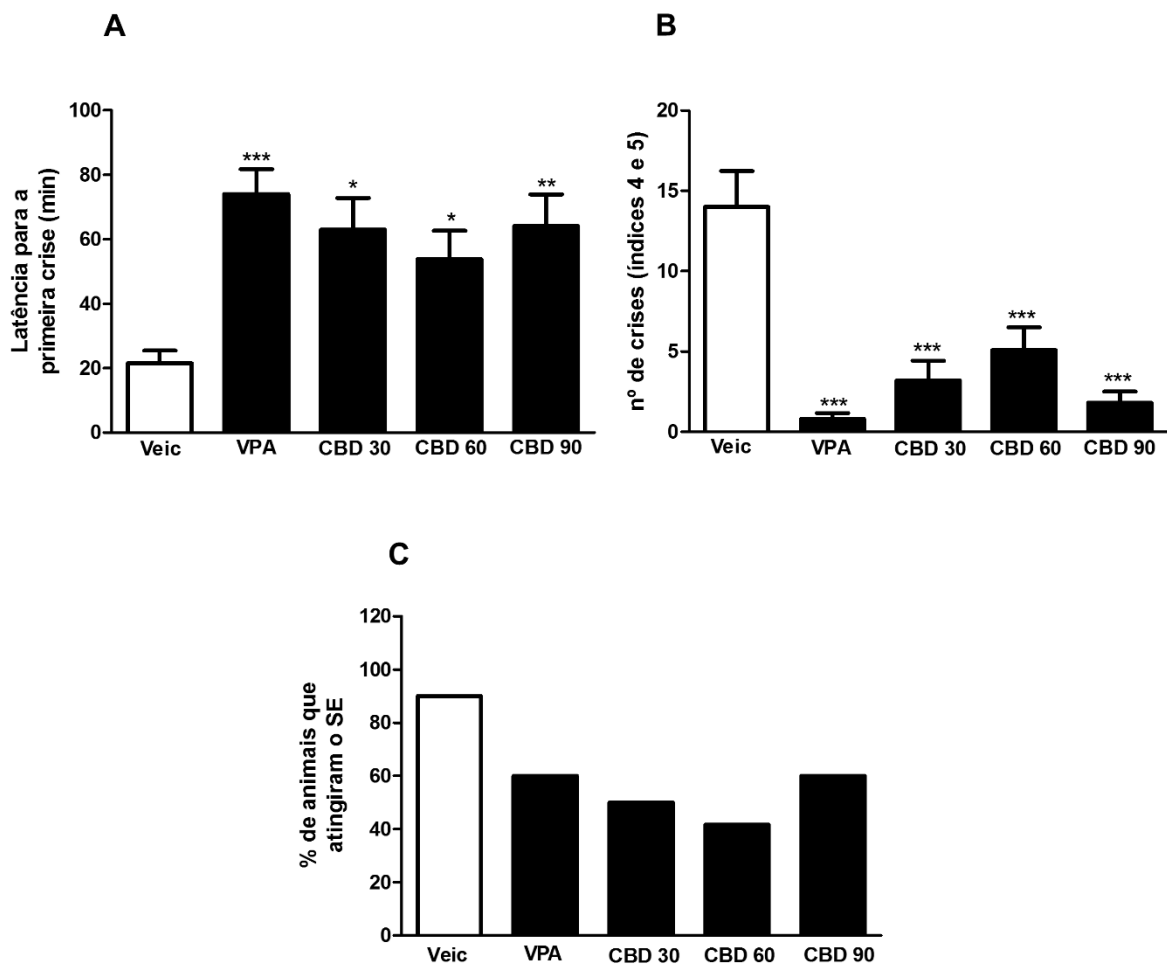


Figura 13: Efeito do pré-tratamento com CBD (30, 60 ou 90 mg/kg) sobre o SE induzido pela administração de PILO em animais WT. VPA (300 mg/kg) foi usado como controle positivo. Foram analisados parâmetros como latência para o início do SE (A), número de crises (índices 4 e 5) (B) e a porcentagem de animais que atingiram o SE (C). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Bonferroni; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

5.7 Análise do efeito do CBD sobre a degeneração de neurônios hipocampais após a administração de PILO

Após ter sido verificada a ação anticonvulsivante do CBD, verificou-se seu possível papel neuroprotetor. Vinte quatro horas após a administração intra-hipocampal de PILO (30 µg/0,25 µl/ sítio) em animais WT, foi analisado o efeito do CBD (30, 60 ou 90 mg/kg) sobre a morte neuronal hipocampal pela técnica de Fluoro-Jade C. Observou-se uma redução da morte neuronal induzida por PILO nas regiões CA1 ($F(5,21)=9,24$; $p<0,001$; Figura 14A), GD ($F(5,21)=17,77$; $p<0,001$; Figura 14B) e CA3 ($F(5,21)=6,94$; $p<0,001$; Figura 14C) do hipocampo de animais pré-tratados com as três concentrações de CBD e com o VPA (300 mg/kg), em relação ao grupo que recebeu veículo.

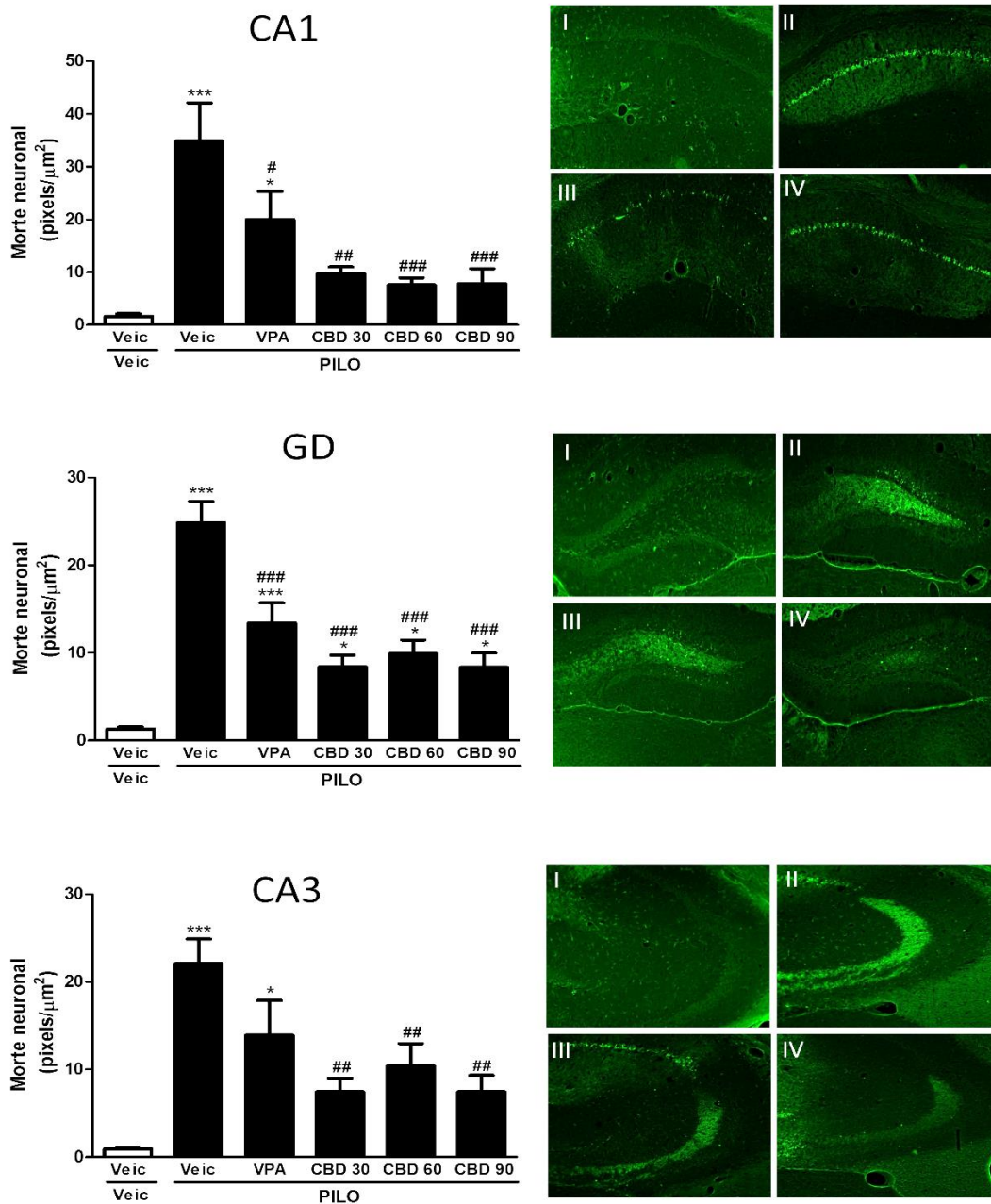


Figura 14: Efeito do pré-tratamento com CBD (30, 60 ou 90 mg/kg) sobre a morte neuronal hipocampal induzida por PILO em animais WT. Foram analisadas as regiões CA1 (A, B), GD (C, D) e CA3 (E, F), gráficos e fotomicrografias representativas, respectivamente. Fotomicrografias representativas da morte neuronal hipocampal nos grupos: veículo+veículo (I), veículo+PILO (II) VPA+PILO (III) e CBD30+PILO (IV). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Newman-Keuls; * # $p < 0,05$, ** ## $p < 0,01$, *** ### $p < 0,001$; *veículo+veículo vs veículo+PILO ou VPA+PILO; #veículo+PILO vs VPA+PILO ou CBD+PILO.

5.8 Análise do pré-tratamento com CBD no ensaio de morte celular induzida por glutamato em cultura de neurônios hipocampais

Com o objetivo de corroborar os dados obtidos *in vivo*, avaliou-se o efeito do pré-tratamento com CBD (0,1; 1 ou 10 μM) sobre a morte celular induzida por glutamato em cultura de neurônios hipocampais. Quinze minutos após o pré-tratamento com o CBD, foi adicionado glutamato (50 μM) às culturas e, em seguida, estas foram incubadas por 4 h, para posterior realização do ensaio de morte celular. Observou-se um efeito neuroprotetor do CBD, nas três concentrações analisadas ($F(7,24)= 18,39$; $p<0,001$; Figura 15), em relação aos seus respectivos controles.

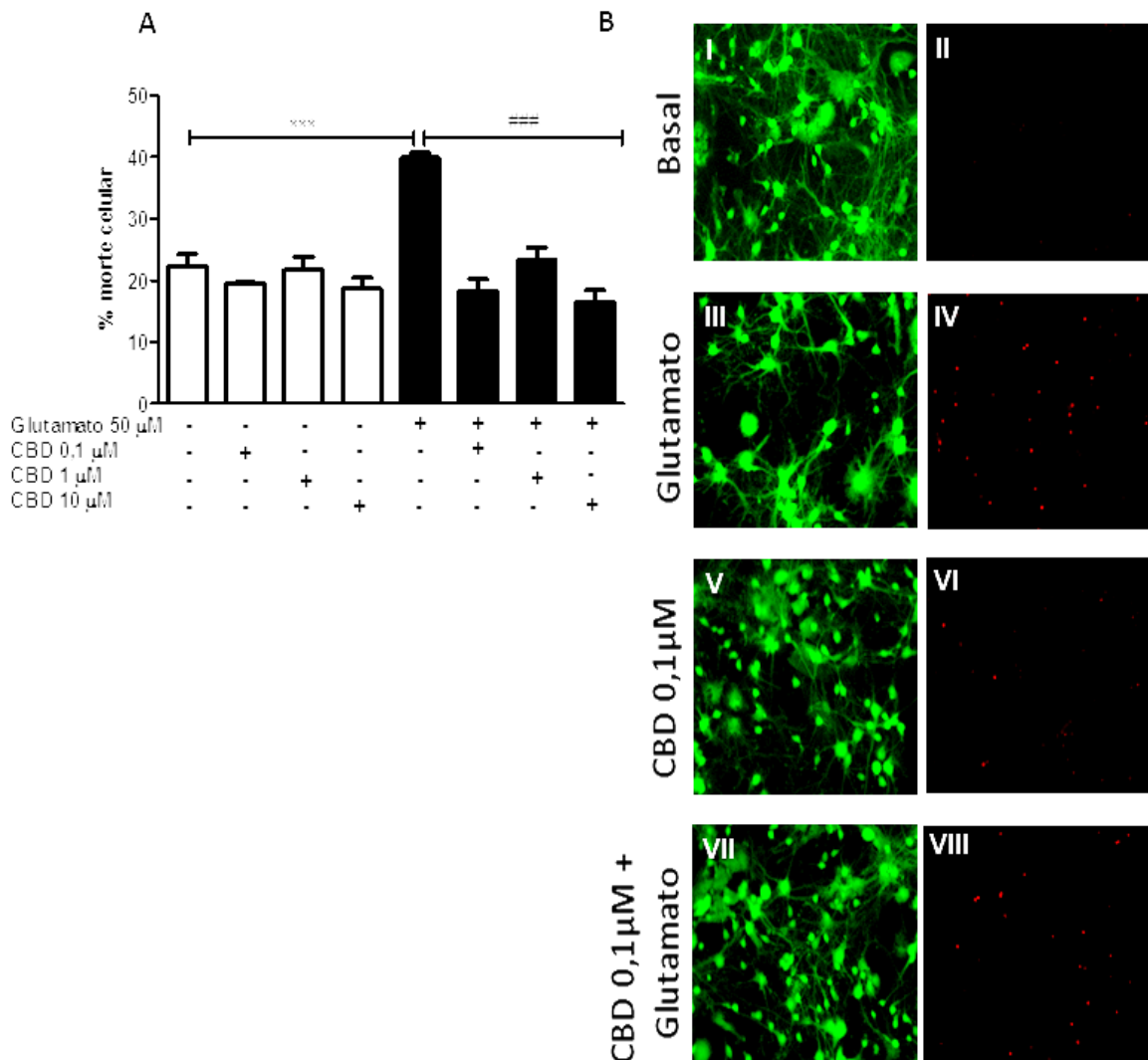


Figura 15: Análise do efeito neuroprotetor do CBD (0,1; 1 ou 10 μ M) no ensaio de morte celular induzida por glutamato em cultura de neurônios hipocâmpais de animais WT. Gráfico (A) e fotomicrografias representativas (B). Imagem representativa de neurônios hipocâmpais marcados com calceína-AM (células vivas, verde) - (I, III, V e VII) e dos neurônios hipocâmpais marcados com EthD-1 (células mortas, vermelho) - (II, IV, VI e VIII). Os dados foram avaliados por ANOVA de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls; *** ### $p < 0,001$; *basal vs glutamato; #glutamato vs CBD+glutamato.

5.9 Análise do efeito do CBD sobre a marcação microglial e astrocitária no hipocampo de animais após a administração de PILO

Como observado no item 5.5, a administração intra-hipocampal de PILO promove uma intensa ativação hipocampal de células microgliais e astrocítárias, fenômeno característico em pacientes portadores de ELT com esclerose hipocampal.

Nesse contexto, buscou-se avaliar o efeito do pré-tratamento com CBD (30, 60 ou 90 mg/kg) sobre a ativação glial em animais WT, submetidos a administração de PILO. Vinte quatro horas após a administração intra-hipocampal de PILO (30 µg/0,25 µl/sítio), foi analisado o efeito do CBD sobre a marcação de micróglia (células Iba-1⁺) e astrócitos (células GFAP⁺), pela técnica de imunofluorescência.

Observou-se uma redução da marcação microglial induzida por PILO nas regiões CA1 ($F(5,20)=17,31$; $p<0,001$; Figuras 16A e 16B), GD ($F(5,20)=13,98$; $p<0,001$; Figuras 16C e 16D) e CA3 ($F(5,20)=11,39$; $p<0,001$; Figuras 16E e 16F) dos animais pré-tratados com o CBD, nas três doses testadas, em relação ao grupo pré-tratado com veículo. Além disso, não houve redução significativa da marcação microglial no hipocampo dos animais pré-tratados com VPA (300 mg/kg), em relação ao grupo pré-tratado com PILO.

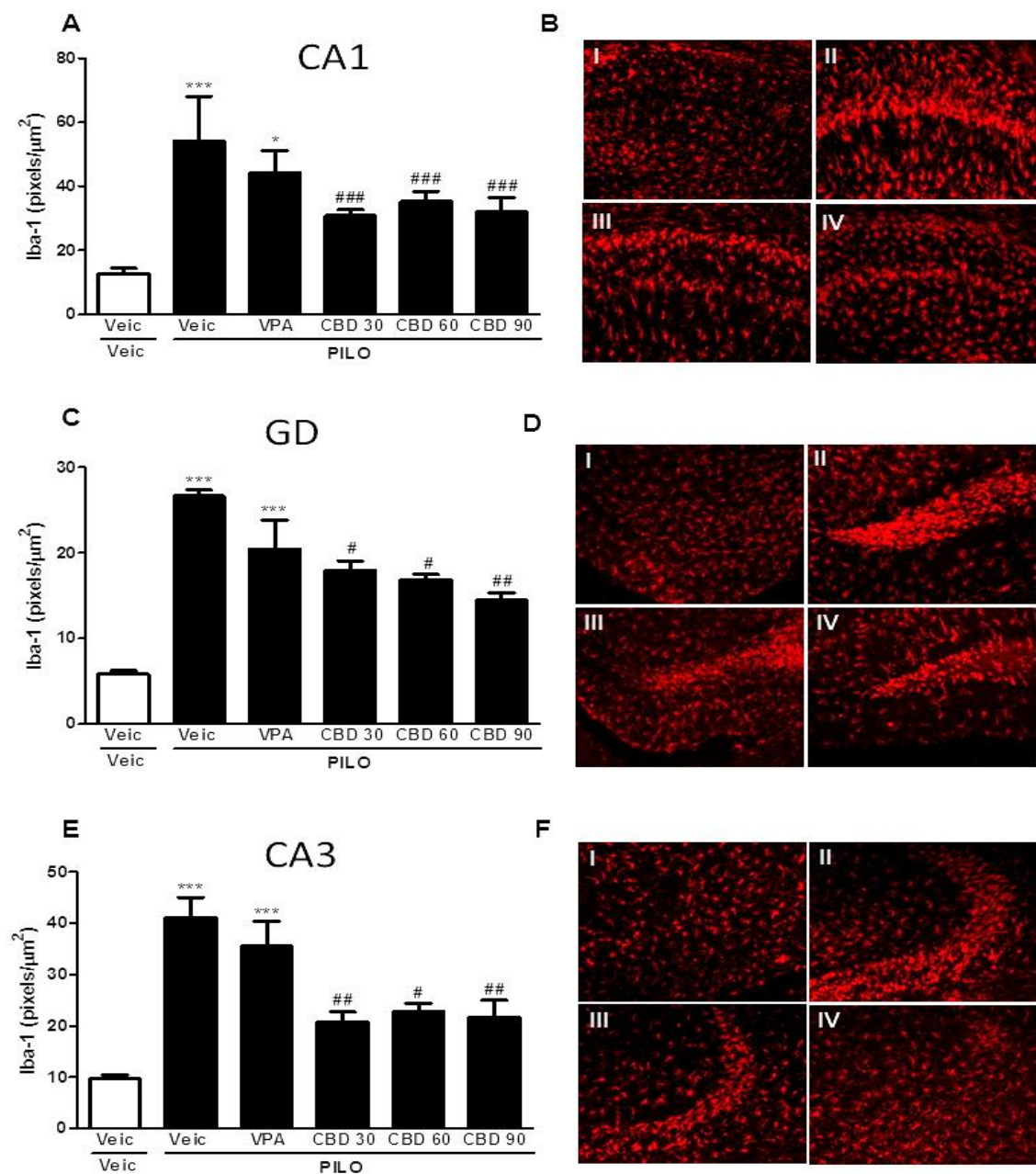


Figura 16: Efeito do pré-tratamento com CBD (30, 60 ou 90 mg/kg) sobre a marcação microglial (células Iba-1⁺) induzida por PILO no hipocampo de animais WT. Foram analisadas as regiões CA1 (A, B), GD (C, D) e CA3 (E, F), gráficos e fotomicrografias representativas, respectivamente. Imagem representativa da morte neuronal hipocampal nos grupos: veículo+veículo (I), veículo+PILO (II) VPA+PILO (III) e CBD30+PILO (IV). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Newman-Keuls; * #p<0,05, ** ##p<0,01, *** ###p<0,001; *veículo+veículo vs veículo +PILO ou VPA+PILO; #veículo +PILO vs VPA+ PILO ou CBD+PILO.

Foi observado também uma redução da marcação astrocitária induzida por PILO nas regiões CA1 ($F(5,20)=42,15$; $p<0,001$; Figura 17A e 17B), GD ($F(5,20)=18,83$; $p<0,001$; Figura 17C e 17D) e CA3 ($F(5,20)=18,74$; $p<0,001$; Figura 17E e 17F) dos animais pré-tratados com o CBD, nas três doses testadas, e com VPA (300 mg/kg), em relação ao grupo que recebeu veículo. Além disso, verificou-se que essa redução foi significativamente menor do que a redução promovida pelo VPA, nas três doses de CBD testadas, nas regiões CA1 e CA3 e, na dose de 60 mg/kg, no GD.

Como todas as doses de CBD testadas (30, 60 e 90 mg/kg) apresentaram resultados semelhantes, quanto ao seu efeito anticonvulsivante no modelo de SE induzido por PILO, bem como sobre a morte neuronal e marcações microglial e astrocitária pós-SE, optamos por utilizar a menor dose efetiva de CBD (30 mg/kg) para a realização dos experimentos posteriores.

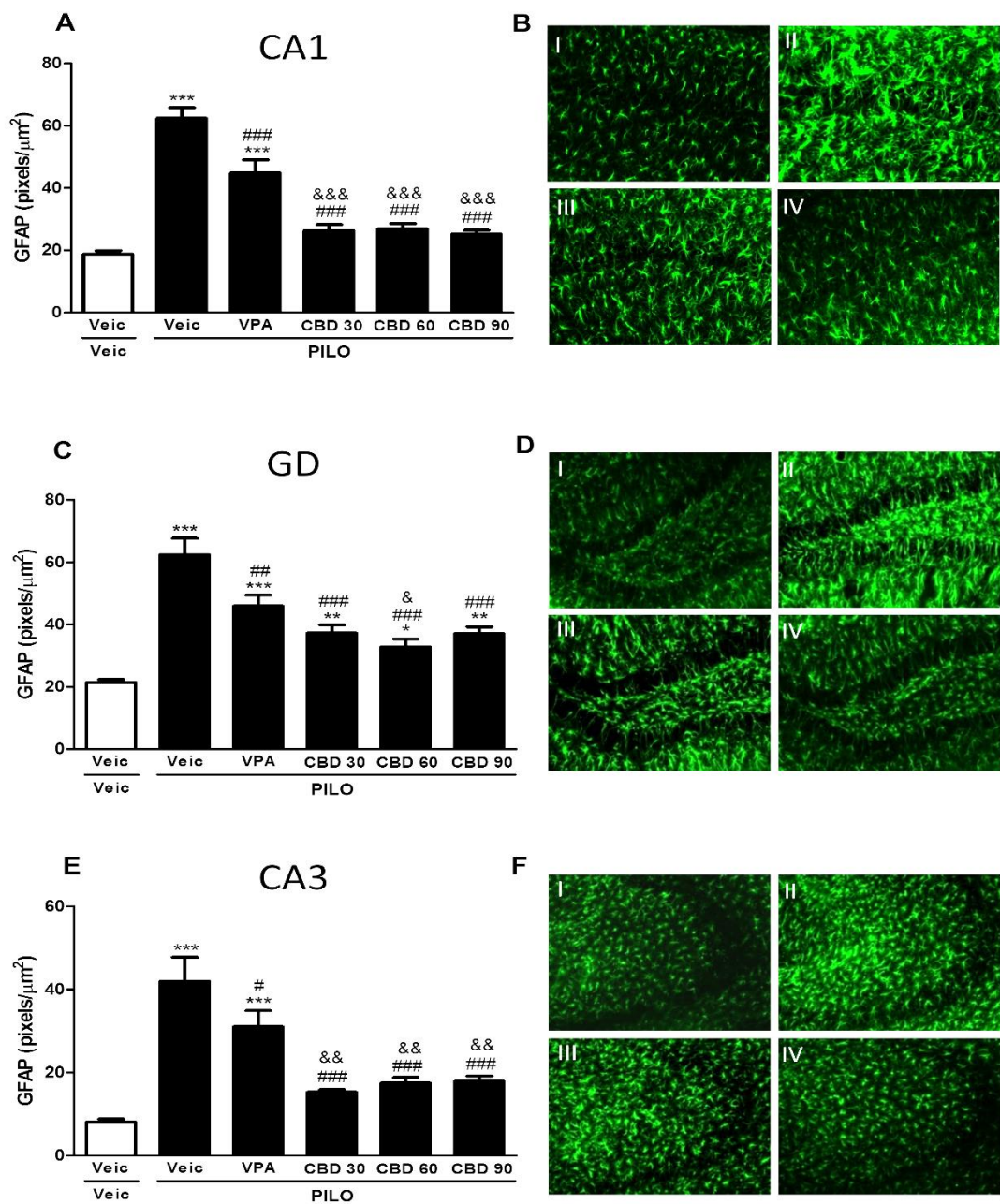


Figura 17: Efeito do pré-tratamento com CBD (30, 60 ou 90 mg/kg) sobre a marcação astrocitária (células GFAP⁺) induzida por PILO no hipocampo de animais WT. Foram analisadas as regiões CA1 (A, B), GD (C, D) e CA3 (E, F), gráficos e fotomicrografias representativas, respectivamente. Imagem representativa da morte neuronal hipocampal nos grupos: veículo+veículo (I), veículo+PILO (II) VPA+PILO (III) e CBD30+PILO (IV). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Newman-Keuls; * # & p<0,05, ** ## && p<0,01, *** ### p<0,001; *veículo+veículo vs veículo +PILO ou VPA+PILO; #veículo +PILO vs VPA+ PILO ou CBD+PILO; &VPA+PILO vs CBD+PILO.

5.10 Efeito do pré-tratamento com AM251 sobre o efeito anticonvulsivante do CBD

Após verificarmos que o CBD foi capaz de reduzir, consideravelmente, as crises convulsivas, morte neuronal e ativação microglial e astrocitária induzidas por PILO, iniciou-se o estudo do (s) mecanismo(s) de ação do CBD que, possivelmente, mediam esses efeitos.

Primeiramente, foi realizada uma curva dose-resposta, afim de se verificar o efeito do antagonista do receptor CB₁, AM251 (0,3; 1 ou 3 mg/kg) sobre as crises convulsivas induzidas por PILO (30 µg/0,25 µl/sítio). O AM251 foi administrado por via i.p, 30 min antes da administração intra-hipocampal de PILO. Não houve diferenças quanto à latência para o início das crises ($F(3,36)=0,53$; $p>0,05$; Figura 18A), bem como no número de crises com índice 4 e 5 da Escala de Racine ($F(3,34)=0,47$; $p>0,05$; Figura 18B) nas três doses testadas em relação ao grupo que recebeu veículo. Além disso, houve a morte de alguns animais durante o SE, tratados com AM251, especialmente os animais que receberam a maior dose de AM251 (3 mg/kg), os quais apresentaram um índice de mortalidade de 50% (Figura 18C).

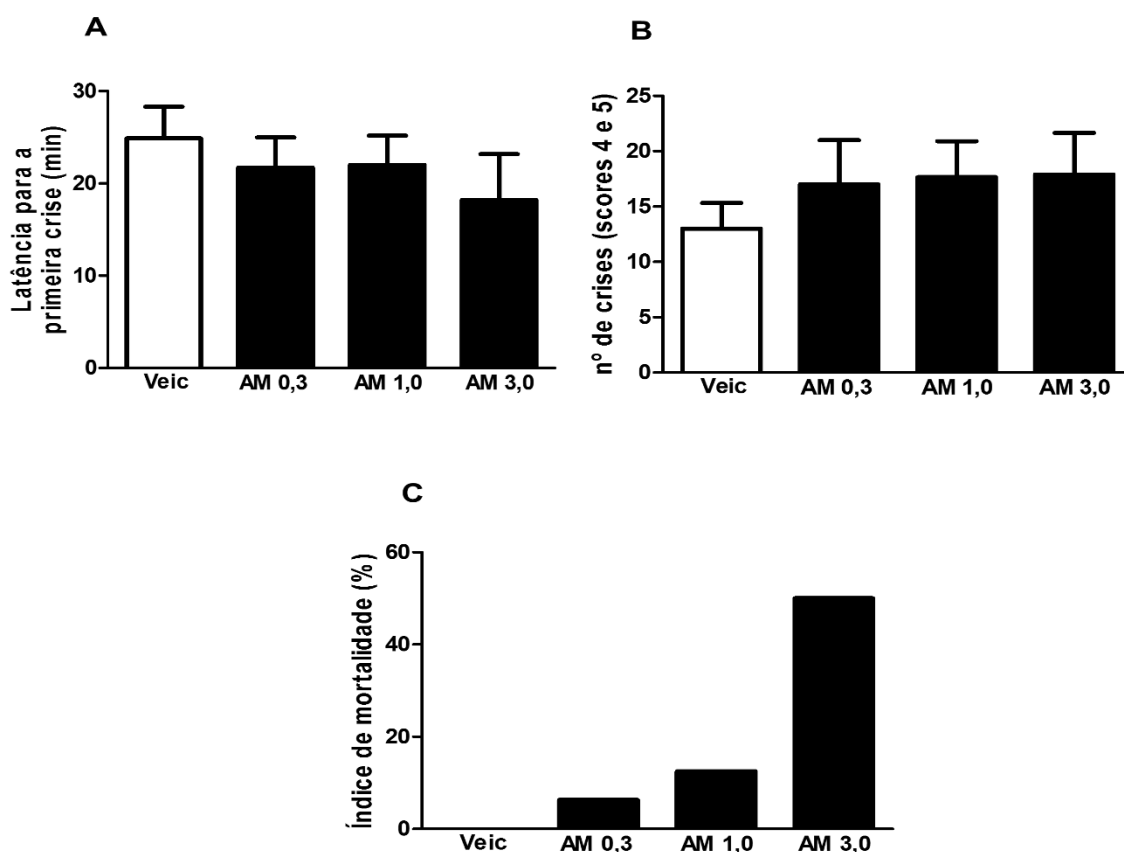


Figura 18: Efeito do antagonista de receptores CB1, AM251 (0,3; 1 ou 3 mg/kg), sobre crises convulsivas induzidas por PILO. Foram analisados parâmetros como latência para a primeira crise (A), número de crises (índices 4 e 5) (B), número de crises tônico-clônico generalizadas (C) e índice de mortalidade (D). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Bonferroni; $p > 0,05$.

Diante dos resultados anteriores, foi escolhida a menor dose de AM251 (0,3 mg/kg), que não produziu diferença significativa, em relação ao grupo tratado com veículo, para a realização do experimento seguinte. Foi avaliado o efeito do pré-tratamento com AM251 (0,3 mg/kg) sobre o efeito anticonvulsivante do CBD (30 mg/kg). O AM251 foi administrado 30 min antes da administração de CBD. Observou-se que o pré-tratamento com AM251 diminuiu o tempo de latência para o início das crises ($F(3,36)=13,35$; $p < 0,001$; Figura 19A), bem como aumentou o

número de crises índices 4 e 5 da Escala de Racine ($F(3,39)=5,79$; $p<0,01$; Figura 19B), em relação ao grupo tratado com CBD.

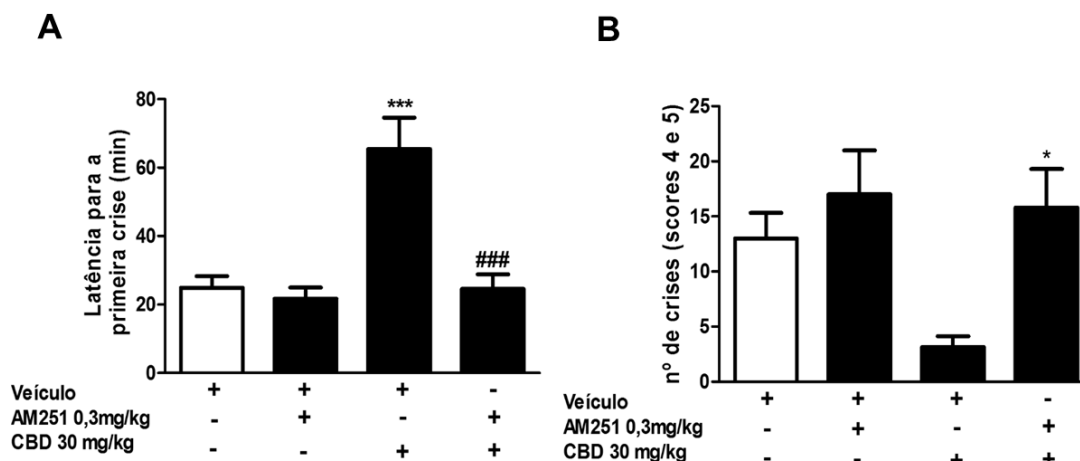


Figura 19: Efeito do pré-tratamento com o AM251 (0,3 mg/kg) sobre o efeito anticonvulsivante do CBD (30 mg/kg) no modelo de crises convulsivas induzidas por PILO. Foram analisados parâmetros como latência para a primeira crise (A) e número de crises (índices 4 e 5). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Bonferroni; * $p<0,05$, *** ### $p<0,001$; *veículo+veículo vs veículo+CBD; #veículo+CBD vs AM251+CBD.

5.11 Efeito da deleção genética da enzima PI3K γ sobre o efeito anticonvulsivante do CBD

A fim de se avaliar um possível envolvimento da enzima PI3K γ sobre o efeito anticonvulsivante do CBD, animais PI3K $\gamma^{-/-}$ foram pré-tratados com CBD (30 mg/kg), veículo ou VPA (300 mg/kg) e, posteriormente submetidos ao modelo de crises convulsivas induzidas pela administração intra-hipocampal de PILO (30 μ g/0,25 μ l/sítio). O CBD, administrado nos animais PI3K $\gamma^{-/-}$, não promoveu diferença nos tempos de latência para o início das crises ($F(2,28)=28,03$; $p<0,001$; Figura 20A) e

no número de crises índices 4 e 5 da Escala de Racine ($F(2,28)=7,59$; $p<0,01$; Figura 20B), em relação ao grupo que recebeu veículo. Em contrapartida, o efeito anticonvulsivante do VPA não foi alterado pela deleção genética da $PI3K\gamma$.

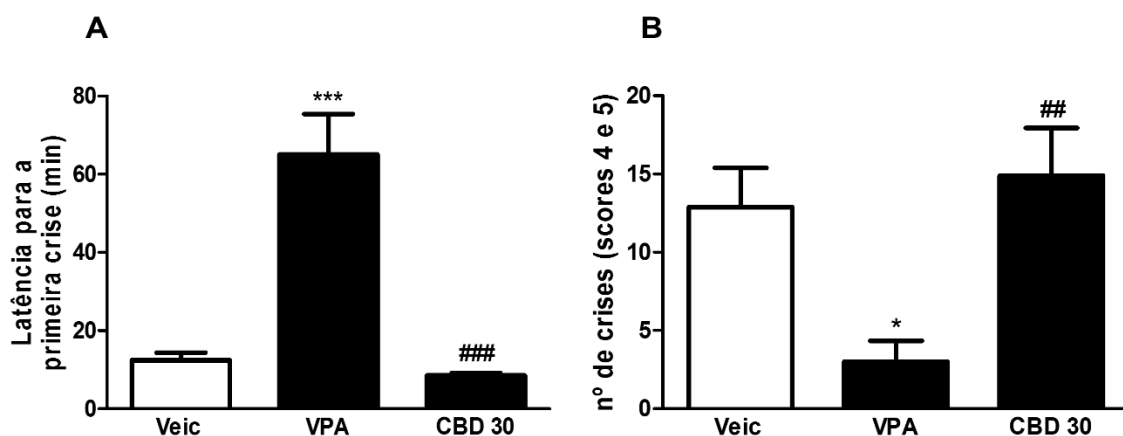


Figura 20: Análise do efeito anticonvulsivante do CBD (30 mg/kg), em animais $PI3K\gamma^{-/-}$ submetidos ao modelo de crises convulsivas induzidas por PILO. Foram analisados parâmetros como latência para a primeira crise (A), número de crises índices 4 e 5 (B). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Bonferroni; * $p<0,05$, ## $p<0,01$, *** ### $p<0,01$. *veículo+PILO vs VPA+PILO; #VPA+PILO vs CBD+PILO.

5.12 Análise da deleção genética de $PI3K\gamma$ sobre o efeito do CBD na degeneração de neurônios hipocampais, após a administração de PILO

A fim de verificar se a deleção genética de $PI3K\gamma$ afeta o efeito neuroprotetor *in vivo* do CBD, frente ao SE induzido por PILO, foi avaliado o efeito do CBD (30 mg/kg) sobre a morte neuronal hipocampal, pela técnica de Fluoro-Jade C, 24 h após o SE induzido pela administração intra-hipocampal de PILO em animais $PI3K\gamma^{-/-}$. O CBD não foi capaz de reduzir a morte neuronal induzida pela administração de

PILO, nas regiões hipocâmpais CA1 ($F(3,16)=18,64$; $p<0,001$; Figuras 21A e 21B), GD ($F(3,16)=14,94$; $p<0,001$; Figuras 21C e 21D) e CA3 ($F(3,16)=18,43$; $p<0,001$; Figura 21E e 21F). Por outro lado, os animais tratados com VPA apresentaram uma redução da morte neuronal induzida por PILO em relação ao grupo tratado com veículo e em relação ao grupo tratado com CBD.

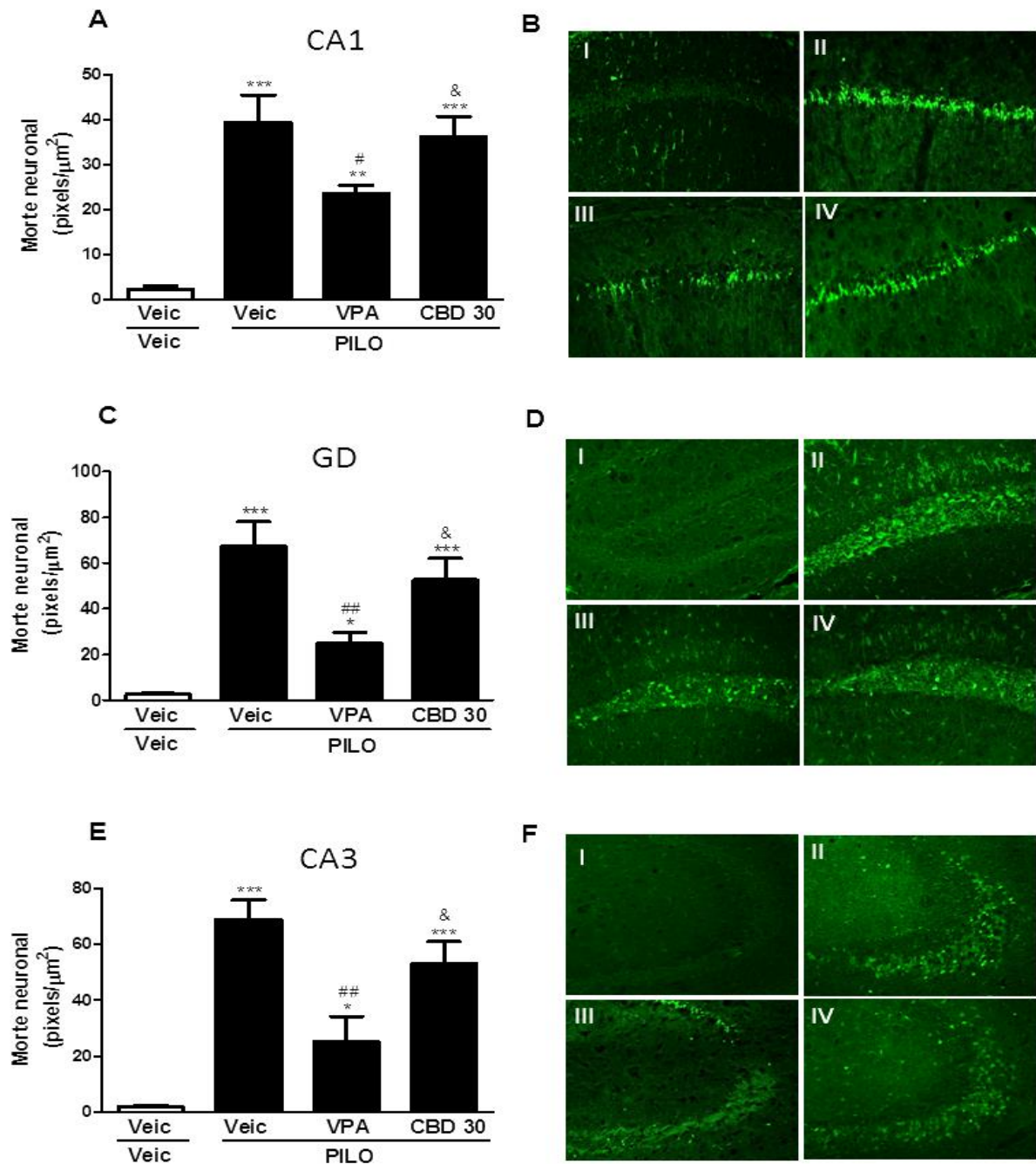


Figura 21: Efeito do pré-tratamento com CBD (30 mg/kg) sobre a morte neuronal hipocampal induzida por PILO em animais $PI3K\gamma^{-/-}$. Foram analisadas as regiões CA1 (A, B), GD (C, D) e CA3 (E, F), gráficos e fotomicrografias representativas, respectivamente. Imagem representativa da morte neuronal hipocampal nos grupos: veículo+veículo (I), veículo+PILO (II) VPA+PILO (III) e CBD30+PILO (IV). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Newman-Keuls; * # & $p < 0,05$, ** ## $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; * & veículo+veículo vs veículo+PILO ou VPA+PILO; # veículo+PILO vs VPA+PILO ou CBD+PILO; & VPA+PILO vs CBD+PILO.

5.13 Análise da deleção genética e farmacológica de PI3K γ sobre o efeito do CBD no ensaio de morte celular induzida por glutamato em cultura de neurônios hipocampais

Após verificado, no item 5.8, que todas as concentrações avaliadas de CBD (0,1; 1 e 10 μ M) apresentaram efeito neuroprotetor no ensaio morte celular induzida por glutamato em cultura de neurônios hipocampais, escolhemos a menor concentração efetiva de CBD (0,1 μ M) para realizarmos os experimentos posteriores.

Primeiramente, verificamos o efeito da deleção genética de PI3K γ sobre o efeito neuroprotetor do CBD. Para isso, culturas primárias provenientes de hipocampos de animais PI3K $\gamma^{-/-}$ foram pré-tratadas com CBD e, 15 min depois, com glutamato (50 μ M). Após um tempo de incubação de 4 h foi realizado o ensaio de morte celular. Não houve diferença significativa entre o grupo tratado com CBD+glutamato e o grupo tratado com veículo+glutamato. No entanto, houve uma diferença significativa entre o grupo tratado com CBD+veículo e o grupo tratado com CBD+glutamato ($F(3,20)=7,99;p<0,01$; Figura 22).

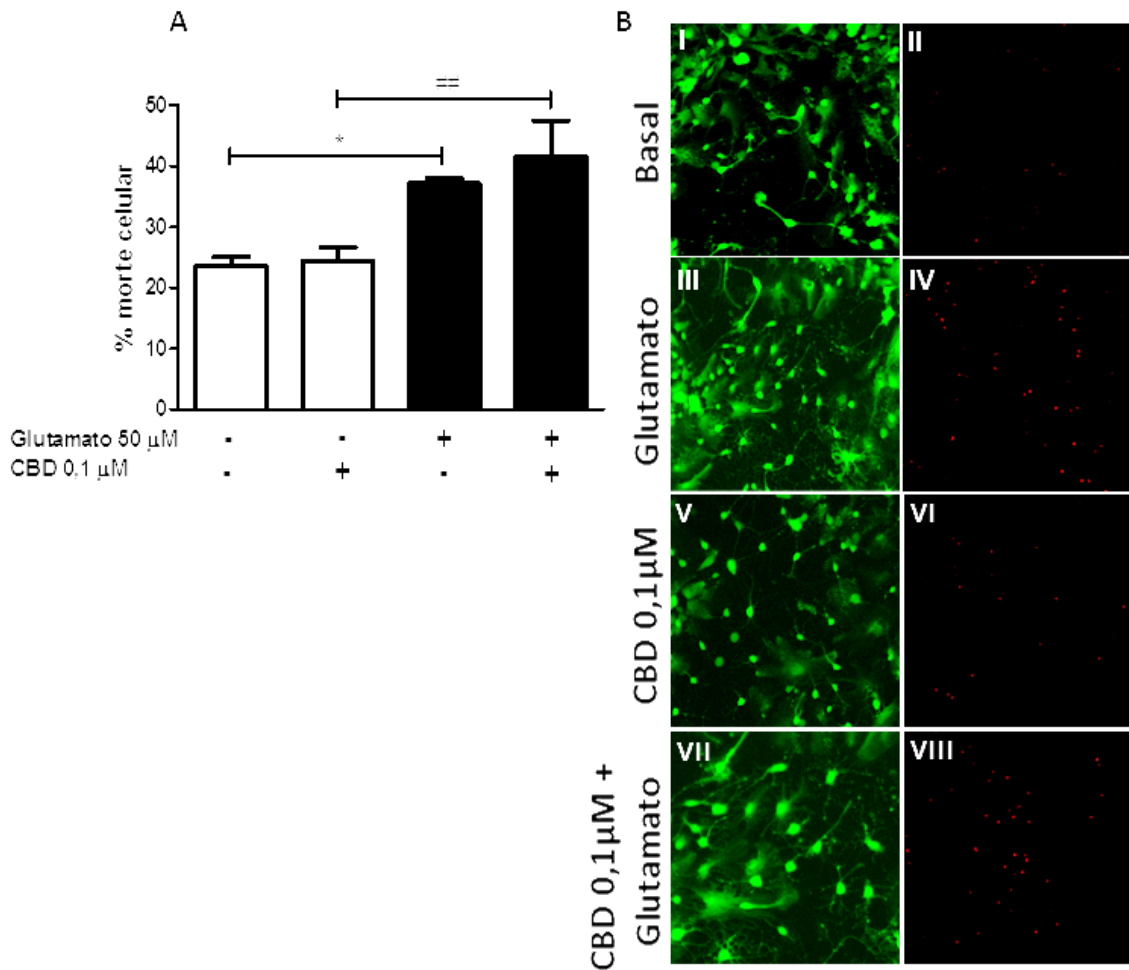


Figura 22: Análise do efeito neuroprotetor do CBD (0,1 μ M) no ensaio de morte celular induzida por glutamato em cultura de neurônios hipocâmpais de animais $PI3K\gamma^{-/-}$. Gráfico (A) e fotomicrografias representativas (B). Imagem representativa de neurônios hipocâmpais marcados com calceína-AM (células vivas, verde) - (I, III, V e VII) e dos neurônios hipocâmpais marcados com EthD-1 (células mortas, vermelho) - (II, IV, VI e VIII). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls; * $p < 0,05$, ## $p < 0,01$; *basal vs glutamato; #CBD+veículo vs CBD+glutamato.

Posteriormente, avaliou-se o efeito da inibição farmacológica de $PI3K\gamma$ sobre o efeito neuroprotetor do CBD. Para isso, utilizou-se a menor concentração do inibidor de $PI3K\gamma$, AS605240 (0,01 μ M), a qual não promoveu, por si só, morte celular depois de 4 h de incubação (item 5.3, Figura 7B). As culturas foram incubadas com

AS605240 ou veículo por 15 min antes da adição de CBD (0,1 μ M) ou veículo. Após 15 min as células foram tratadas com glutamato ou veículo e mantidas por 4 h adicionais. Posteriormente, realizou-se o ensaio de morte celular, sendo observado uma perda do efeito neuroprotetor do CBD mediante o pré-tratamento com o inibidor de PI3K γ (F(6,21)=5,99; p<0,001; Figura 23).

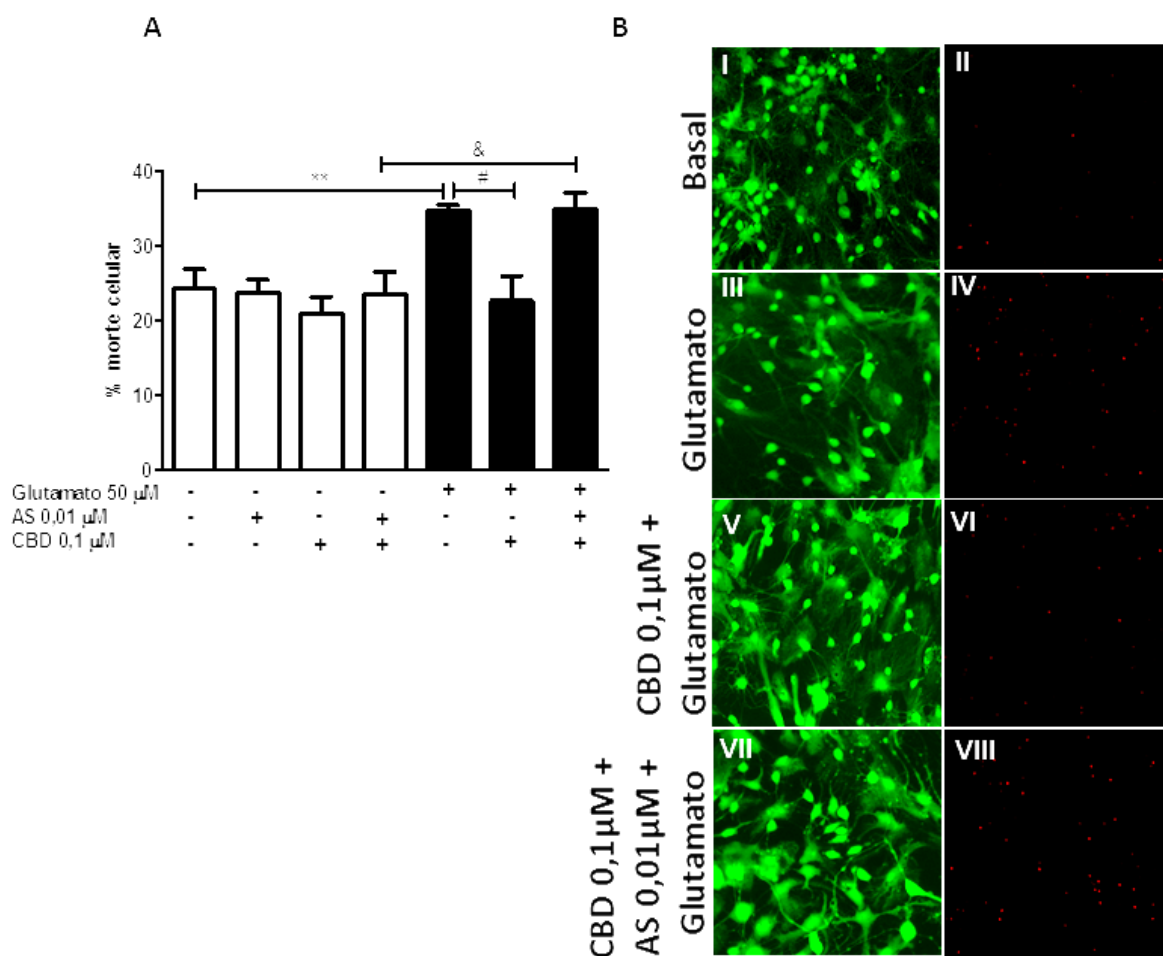


Figura 23: Efeito do pré-tratamento com o inibidor da PI3K γ , AS605240 (0,01 μ M), sobre o efeito neuroprotetor do CBD no ensaio de morte celular induzida por glutamato em cultura de neurônios hipocâmpais. Gráfico (A) e fotomicrografias representativas (B). Imagem representativa de neurônios hipocâmpais marcados com calceína-AM (células vivas, verde) - (I, III, V e VII) e dos neurônios hipocâmpais marcados com EthD-1 (células mortas, vermelho) - (II, IV, VI e VIII). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls; # & p<0,05,

**p<0,01; *basal vs glutamato; #glutamato vs CBD+glutamato, &AS+CBD vs AS+glutamato+CBD.

5.14 Avaliação do efeito do CBD sobre os níveis hipocampais dos fatores neurotróficos BDNF, NGF e GDNF em animais WT e PI3K γ ^{-/-} após a administração de PILO

Dados prévios do nosso grupo demonstraram um aumento dos níveis hipocampais de BDNF nos animais WT e PI3K γ ^{-/-} 24 h após a administração intra-hipocampal de PILO.

A fim de verificar o efeito do CBD (30 mg/kg) sobre a expressão hipocampal de fatores neurotróficos após um insulto epileptogênico, os animais WT e PI3K γ ^{-/-} tiveram seus hipocampos dissecados 8 h após o SE induzido pela administração intra-hipocampal de PILO, para posterior análise dos níveis dos fatores neurotróficos BDNF, NGF e GDNF.

Foi observado, nos animais WT, que a administração de PILO promoveu um aumento dos níveis de BDNF nos grupos veículo+PILO e CBD+PILO, em relação ao grupo veículo+veículo. Além disso, houve uma redução dos níveis de BDNF no grupo VPA+PILO, em relação aos grupos veículo+PILO e CBD30+PILO (F(3,15)=14,93; p<0,001; Figura 24A). Quanto aos animais PI3K γ ^{-/-}, observou-se que todos os grupos que receberam PILO apresentaram um aumento dos níveis hipocampais de BDNF, em relação ao grupo veículo+veículo (F(3,16)=14,04; p<0,001; Figura 24B).

Quanto aos níveis de NGF, observou-se, nos animais WT, um aumento dos níveis hipocampais de NGF no grupo CBD30+PILO, em relação ao grupo veículo+veículo. Além disso, houve também uma redução dos níveis de NGF no

grupo VPA+PILO, em relação aos grupos veículo+PILO e CBD30+PILO ($F(3,13)=4,65$; $p<0,05$; Figura 24C). Nos animais $PI3K\gamma^{-/-}$, não houve diferença nos níveis hipocâmpais de NGF entre os grupos ($F(3,14)=0,89$; $p>0,05$; Figura 24D).

E quanto aos níveis hipocâmpais de GDNF, não houve diferença significativa entre os grupos tanto nos animais WT ($F(3,16)=0,95$; $p>0,05$; Figura 24E), quanto nos animais $PI3K\gamma^{-/-}$ ($F(3,15)=0,37$; $p>0,05$; Figura 24F).

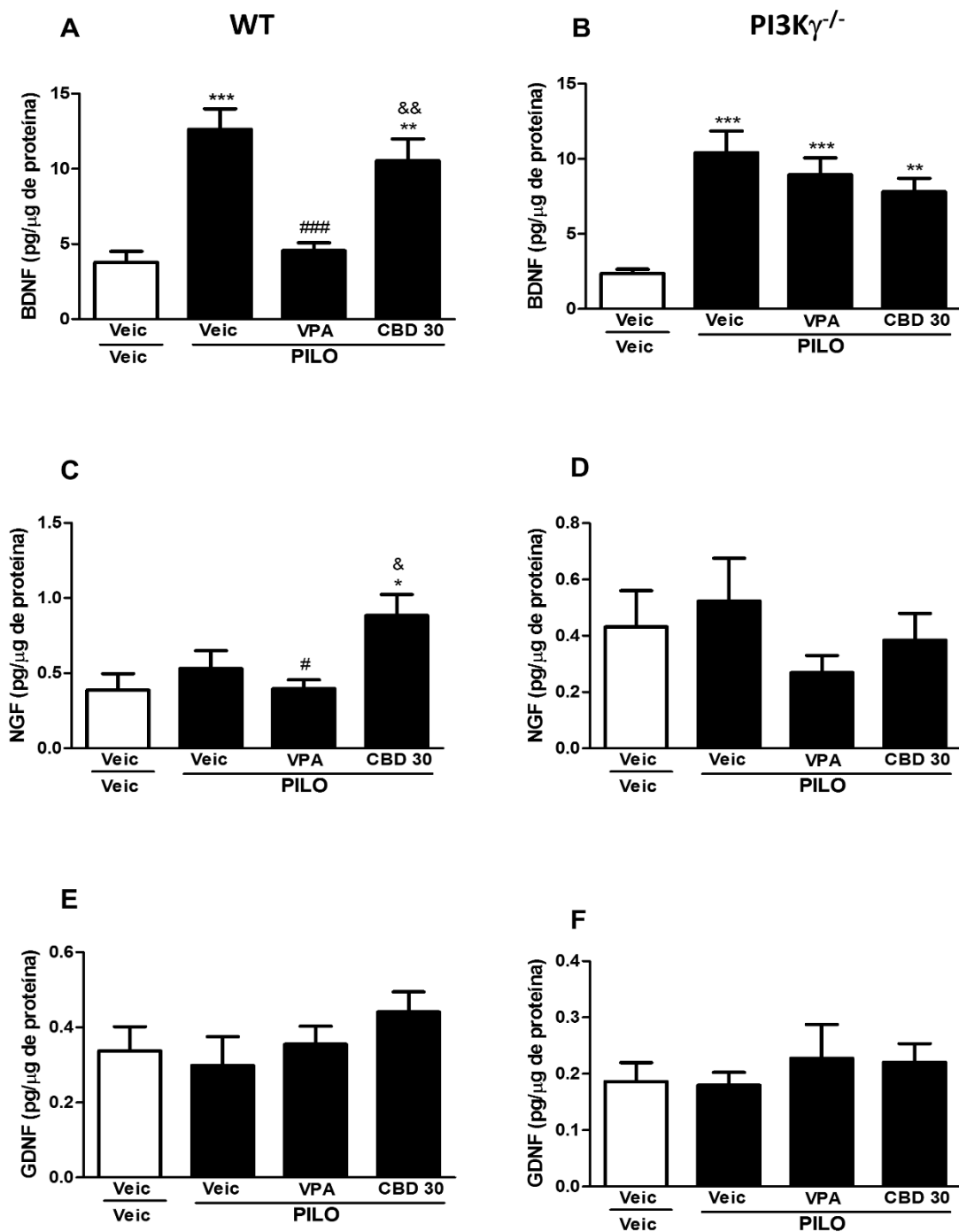


Figura 24: Efeito do pré-tratamento com CBD (30 mg/kg) sobre os níveis dos fatores neurotróficos BDNF, NGF e GDNF no hipocampo de animais WT e PI3K γ ^{-/-} submetidos ao modelo de SE induzido por PILO. Níveis de BDNF (A, B), de NGF (C, D) e de GDNF (E, F). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Newman-Keuls; * # & p<0,05, ** && p<0,01, *** ### p<0,001. *veículo+veículo vs veículo +PILO, VPA+PILO ou CBD+PILO; #veículo+PILO vs VPA+PILO ou CBD+PILO; &VPA+PILO vs CBD+PILO.

5.15 Análise da deleção genética de PI3K γ sobre o efeito do CBD nas marcações microglial e astrocitária no hipocampo de animais após a administração de PILO

A fim de verificar se a deleção genética de PI3K γ altera o efeito do CBD em reduzir a ativação microglial e astrocitária após o SE induzido por PILO, foi analisado o efeito do CBD sobre a marcação de micróglia (células Iba-1⁺) e de astrócitos (células GFAP⁺), pela técnica de imunofluorescência, 24 h após a administração intra-hipocampal de PILO em animais PI3K γ ^{-/-}.

Observou-se que a deleção genética de PI3K γ , promoveu uma perda da capacidade do CBD em reduzir a marcação microglial induzida por PILO nas regiões CA1 (F(3,16)=67,78; p<0,001; Figuras 25A e 25B), GD (F(3,16)=64,32; p<0,001; Figuras 25C e 25D) e CA3 (F (3,16)=53,36; p<0,001; Figuras 25E e 25F). O VPA (300 mg/kg) apresentou uma redução da marcação microglial induzida por PILO, em relação aos grupos tratado com veículo e com CBD, nas três regiões hipocampais avaliadas.

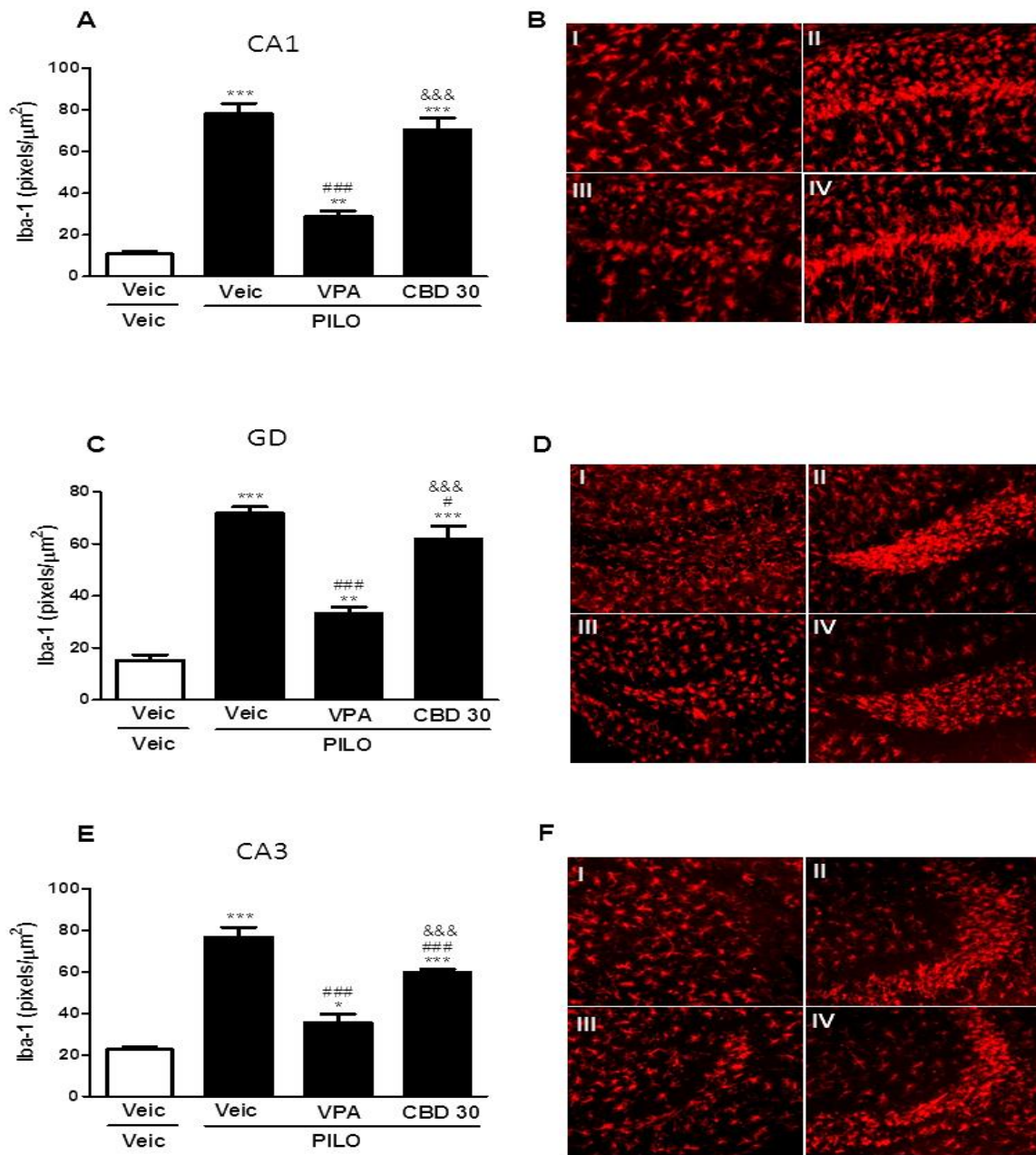


Figura 25: Efeito do pré-tratamento com CBD (30 mg/kg) sobre a ativação microglial induzida por PILO no hipocampo de animais $PI3K\gamma^{-/-}$. Foram analisadas as regiões CA1 (A, B), GD (C, D) e CA3 (E, F), gráficos e fotomicrografias representativas, respectivamente. Imagem representativa da morte neuronal hipocampal nos grupos: veículo+veículo (I), veículo+PILO (II) VPA+PILO (III) e CBD30+PILO (IV). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Newman-Keuls; # $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** ###&&& $p < 0,001$, *veículo+veículo vs veículo+PILO, VPA+PILO ou CBD+PILO; #veículo +PILO vs VPA+ PILO ou CBD+PILO; &VPA+PILO vs CBD+PILO.

Foi observado também uma perda da capacidade do CBD em reduzir a marcação astrocitária induzida por PILO nos animais $PI3K\gamma^{-/-}$, nas regiões CA1 ($F(3,16)=57,57; p<0,001$; Figuras 26A e 26B), GD ($F(3,16)=53,89; p<0,001$; Figuras 26C e 26D) e CA3 ($F(3,16)=60,35; p<0,001$; Figuras 26E e 26F). O VPA (300 mg/kg) promoveu uma redução da marcação dos astrócitos induzida por PILO, em relação aos grupos tratado com veículo e com CBD, nas três regiões hipocâmpais avaliadas.

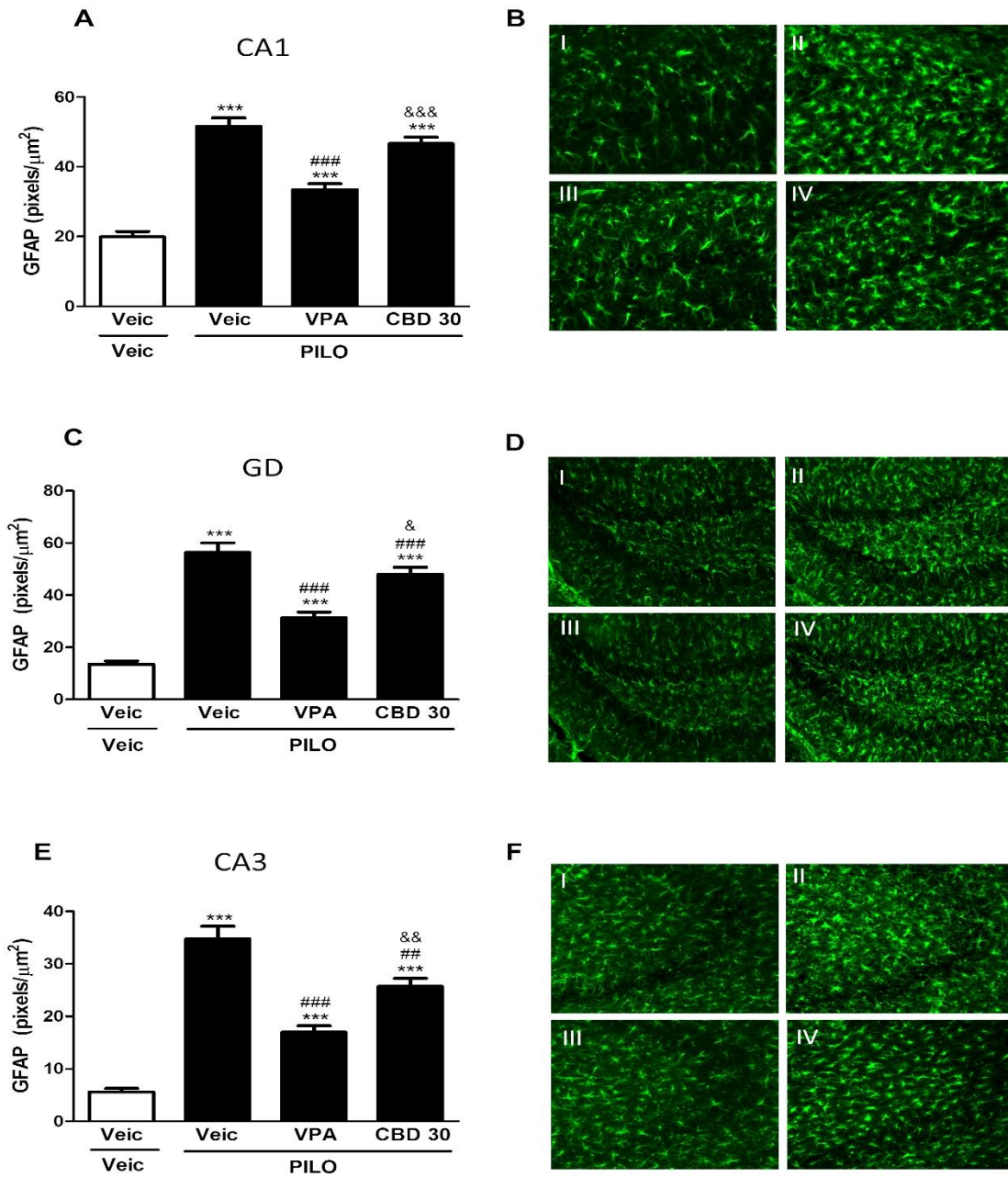


Figura 26: Efeito do pré-tratamento com CBD (30 mg/kg) sobre a ativação astrocitária induzida por PILO no hipocampo de animais $PI3K\gamma^{-/-}$. Foram analisadas as regiões CA1 (A, B), GD (C, D) e CA3 (E, F), gráficos e fotomicrografias representativas, respectivamente. Imagem representativa da morte neuronal hipocampal nos grupos: veículo+veículo (I), veículo+PILO (II) VPA+PILO (III) e CBD30+PILO (IV). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Newman-Keuls; $\&p<0,05$, $** \# \&p<0,01$, $*** ### \&\&p<0,001$. *veículo+veículo vs veículo +PILO, VPA+PILO ou CBD30+PILO; #veículo +PILO vs VPA+ PILO ou CBD+PILO; $\&$ VPA+PILO vs CBD+PILO.

5.16 Efeito do pré-tratamento com rapamicina sobre o efeito anticonvulsivante do CBD

Diante da modulação dos efeitos anticonvulsivante e neuroprotetor do CBD frente à deleção genética e bloqueio farmacológico da enzima PI3K γ , investigou-se o envolvimento da via PI3K/Akt/mTOR sobre o mecanismo de ação anticonvulsivante do CBD.

Primeiramente, foi realizada uma curva dose-resposta, afim de se verificar o efeito do inibidor de mTOR, rapamicina (0,3; 1 ou 3 mg/kg), no modelo de SE induzido por PILO. A rapamicina foi administrada por via i.p. 180 min antes da administração de PILO. Não houve diferença significativa em relação ao grupo tratado com veículo tanto na latência para o início das crises ($F(3,31)=0,68$; $p>0,05$; Figura 27A) quanto ao número de crises com índices 4 e 5 ($F(3,30)=p>0,05$; Figura 27B).

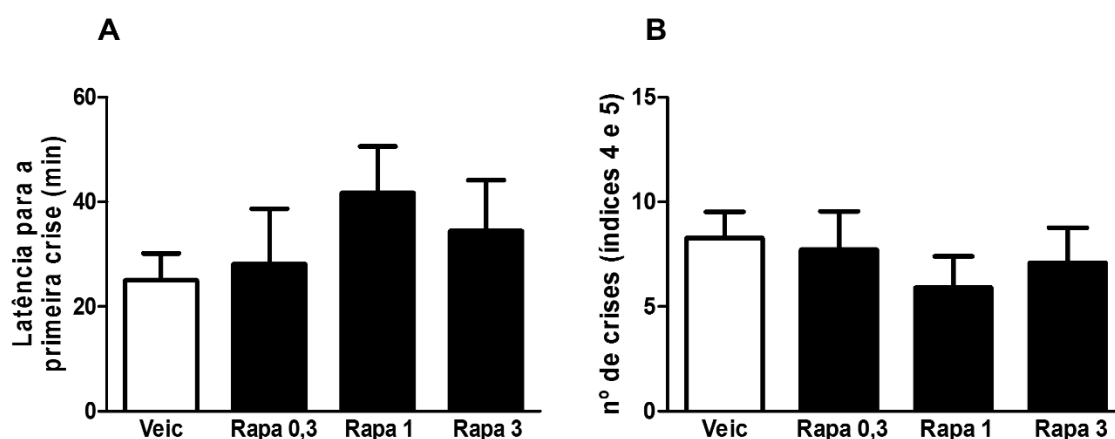


Figura 27: Análise do efeito da rapamicina (0,3; 1 ou 3 mg/kg) sobre crises convulsivas induzidas por PILO. Foram analisados parâmetros como latência para a primeira crise (A) e número de crises (índices 4 e 5). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Bonferroni; $p>0,05$.

Como nenhuma das doses de rapamicina testadas apresentou efeito sobre o SE induzido por PILO, escolheu-se a maior dose de rapamicina (3 mg/kg) para a

realização do experimento seguinte. Foi avaliado o efeito do pré-tratamento com rapamicina sobre o efeito anticonvulsivante do CBD (30 mg/kg). A rapamicina foi administrada 120 min antes do CBD, o qual foi injetado 60 min antes da PILO. Observou-se que o pré-tratamento com rapamicina promoveu uma redução da latência para a primeira crise ($F(3,33)=11,19$; $p<0,001$; Figura 28A), bem como um aumento do número de crises índices 4 e 5 da Escala de Racine ($F(3,32)=9,84$; $p<0,01$; Figura 28B), comparados ao grupo tratado com veículo+CBD.

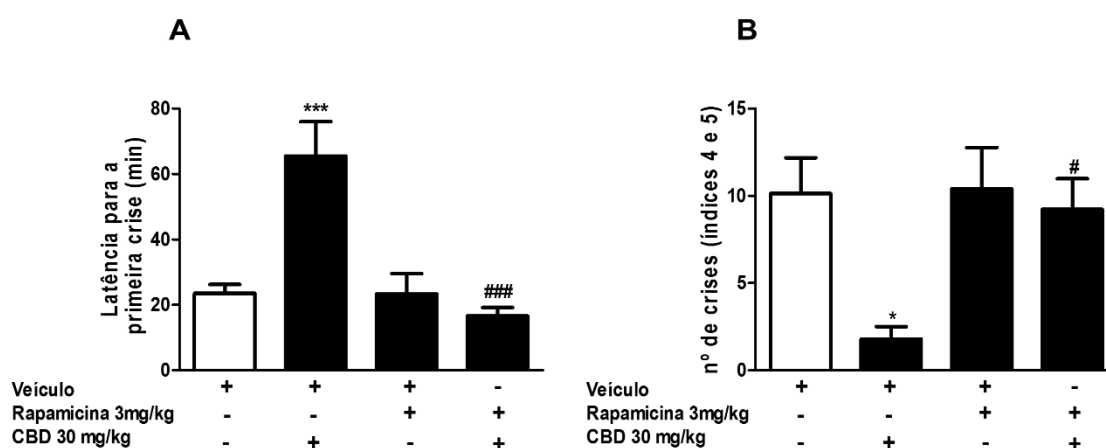


Figura 28: Efeito do pré-tratamento com rapamicina (3 mg/kg) sobre o efeito anticonvulsivante do CBD (30 mg/kg), no modelo de crises convulsivas induzidas por PILO. Foram analisados parâmetros como latência para a primeira crise (A) e número de crises (índices 4 e 5). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Bonferroni; * # $p<0,05$, *** ### $p<0,001$. *veículo+veículo vs veículo+CBD30; #veic+CBD vs rapamicina+CBD.

5.17 Efeito da deleção genética de PI3K $\gamma^{-/-}$ e do bloqueio farmacológico de PI3K sobre o efeito do canabidiol no modelo de crises convulsivas induzidas por PTZ

Diante dos resultados obtidos utilizando-se o modelo de PILO, buscou-se investigar o envolvimento da deleção genética de PI3K $\gamma^{-/-}$, bem como do bloqueio farmacológico de PI3K, no modelo de crises convulsivas induzidas por PTZ.

Primeiramente, os animais WT e PI3K $\gamma^{-/-}$ foram tratados com CBD (30 mg/kg) ou veículo e, 60 min depois, os animais receberam PTZ (60 mg/kg, i.p.), sendo avaliados durante 15 min. Foi observado que os animais WT tratados com CBD apresentaram um tempo de latência para a primeira crise significativamente maior em relação aos animais WT que receberam veículo e aos animais PI3K $\gamma^{-/-}$ que receberam CBD ($F(3,37)=72,43$; $p<0,001$; Figura 29A). Os animais PI3K $\gamma^{-/-}$ pré-tratados com CBD apresentaram uma maior duração da primeira crise tônico-clônica ($F(3,37)=9,15$; $p<0,001$; Figura 29B), bem como um maior número de crises tônico-clônico generalizadas ($F(3,37)=7,43$; $p<0,001$; Figura 29C), em relação aos animais WT pré-tratados com CBD.

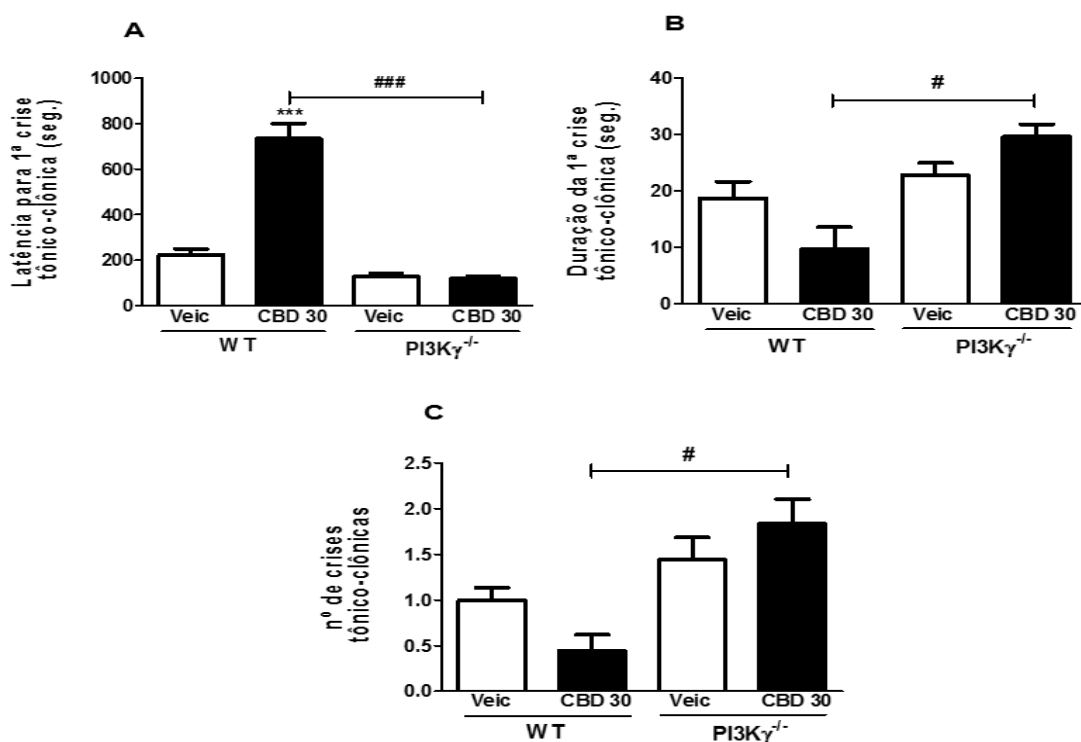


Figura 29: Análise da deleção genética de PI3K $\gamma^{-/-}$ sobre o efeito do CBD (30 mg/kg) em modelo de crises convulsivas induzidas por PTZ. Foram avaliadas a latência para a primeira crise tônico-clônica (A), a duração da primeira crise tônico-clônica (B) e número de crises tônico-clônicas (C). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Bonferroni. # $p < 0,05$, *** ### $p < 0,001$. *veículo+veículo vs veículo+PILO ou CBD+PILO; #veículo+PILO vs CBD+PILO.

Posteriormente, avaliou-se o efeito do bloqueio farmacológica da enzima PI3K, utilizando-se o inibidor de PI3K e de mTOR, LY294002 (25 mg/kg). Para isso, os animais foram pré-tratados com o LY294002, 30 min antes da administração de CBD (30 mg/kg). Sessenta minutos após, os animais receberam PTZ (60 mg/kg, i.p.), sendo então avaliados durante 15 min. Os animais tratados com veículo+CBD apresentaram um maior tempo de latência para a primeira crise tônico-clônica, em relação ao grupo tratado com veículo. Além disso, os animais tratados com veículo+CBD apresentaram um maior tempo de latência, em relação aos animais tratados com LY+veículo e LY+CBD ($F(3,27)=21,97$; $p < 0,001$; Figura 30A). Quanto à

duração da primeira crise tônico-clônica, os animais tratados com LY+CBD apresentaram uma maior duração da primeira crise, em relação ao grupo tratado com veículo. Os animais tratados com veículo+CBD apresentaram uma menor duração da primeira crise em relação aos grupos tratados com LY+veículo e LY+CBD ($F(3,27)=8,79$; $p<0,001$; Figura 31 B). Quanto ao número de crises tônico-clônicas, somente os animais que receberam LY+CBD apresentaram mais crises em relação ao grupo tratado com veículo ($F(3,26)=6,15$; $p<0,01$; Figura 30 C).

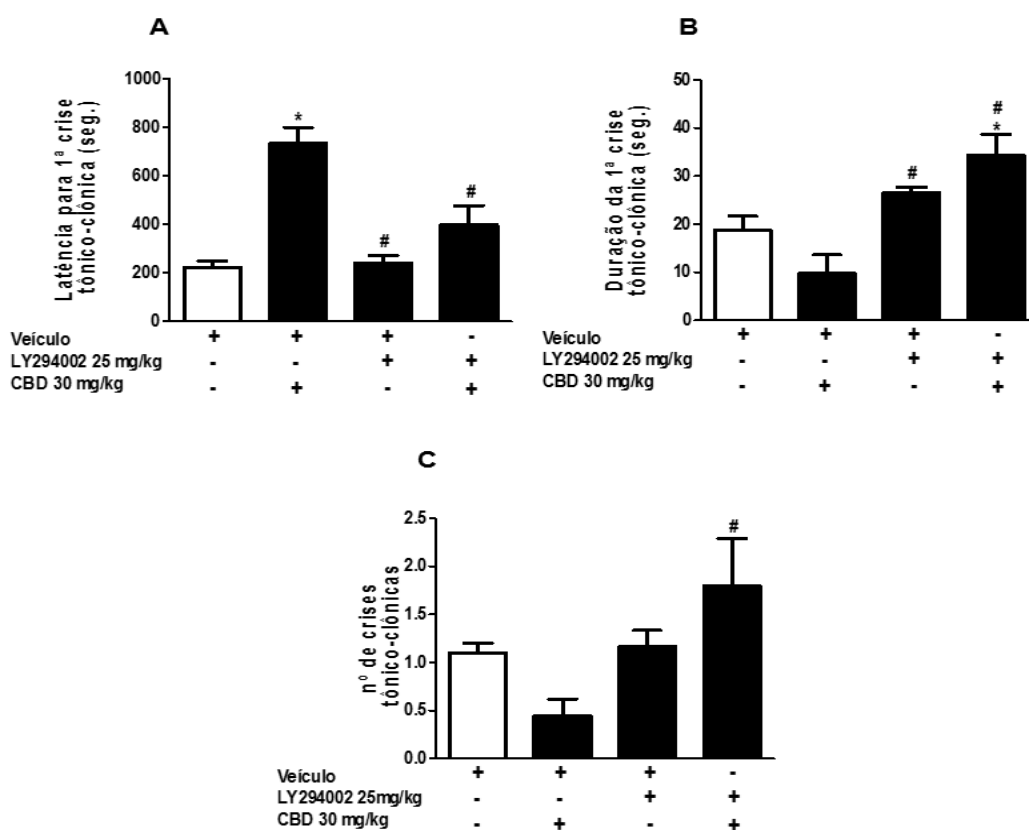


Figura 30: Análise do efeito do pré-tratamento com o inibidor de PI3K e de mTOR, LY294002 (25 mg/kg), sobre o efeito do CBD (30 mg/kg) em modelo de crises convulsivas induzidas por PTZ. Foram avaliadas a latência para a primeira crise tônico-clônica (A), a duração da primeira crise tônico-clônica (B) e número de crises tônico-clônicas (C). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Bonferroni. * # $p<0,05$. *veículo+veículo vs veículo+PILO ou CBD+PILO; #veículo+PILO vs CBD+PILO.

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, investigou-se o papel da enzima PI3K γ sobre as crises convulsivas e eventos pós-ictais, bem como seu envolvimento no mecanismo de ação do CBD. Todos os parâmetros avaliados demonstraram que a ausência dessa enzima agrava o quadro de crises convulsivas, aumenta os eventos excitotóxicos e ativação de células da glia induzidos pela PILO, além de aumentar o cálcio intracelular e a liberação de glutamato. Os dados obtidos no presente trabalho também sustentam a hipótese de que a via PI3K/Akt/mTOR pode mediar os efeitos anticonvulsivante e neuroprotetor do CBD.

A enzima PI3K γ apresenta um importante papel em várias funções neurais, dentre elas em excitabilidade neuronal (GROSS; BASSELL, 2014). Em trabalho prévio do nosso grupo, foi demonstrado que os animais PI3K $\gamma^{-/-}$ são mais susceptíveis ao SE induzido pela administração intra-hipocampal de PILO, em relação aos animais WT. Observou-se também um aumento pós-SE da ativação hipocampal da enzima Akt, a qual é ativada pela PI3K, somente nos animais WT. Além disso, foram verificadas algumas diferenças no perfil de alterações pós-ictais entre os animais WT e PI3K $\gamma^{-/-}$, tais como o aumento dos níveis corticais de BDNF e dos níveis hipocampais e corticais das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α , bem como a diminuição da neurogênese hipocampal, somente nos animais PI3K $\gamma^{-/-}$ (LIMA et al., 2015). Nesse contexto, deu-se continuidade, no presente trabalho, ao estudo da modulação da excitotoxicidade, de crises convulsivas e de eventos pós-ictais mediados pela enzima PI3K γ .

Inicialmente, verificou-se os efeitos da deleção genética dessa enzima sobre a degeneração neuronal, induzida pela administração intra-hipocampal de PILO. Foi

observada a morte neuronal em animais WT e PI3K γ ^{-/-} nas três regiões hipocâmpais (CA1, DG, CA3) analisadas. Na região CA1, a morte neuronal foi mais intensa nos animais PI3K γ ^{-/-}, em comparação aos animais WT. Avaliou-se também a morte neuronal pós-SE no núcleo septal lateral, uma porção da área septal, que recebe projeções descendentes do hipocampo (SHEEHAN et al., 2004). A morte neuronal observada nos animais PI3K γ ^{-/-} foi também mais intensa, em relação aos animais WT. Essa maior morte neuronal, observada nas duas regiões, pode ser devido ao SE mais severo apresentado pelos animais PI3K γ ^{-/-}.

O papel de PI3K γ sobre a morte neuronal também foi observado *in vitro*, em ensaio de morte celular induzida por glutamato, em culturas primárias de neurônios hipocâmpais tratadas ou não com o inibidor seletivo de PI3K γ , AS605240. Após um tempo de incubação de 20 h, observou-se que o tratamento das culturas somente com o inibidor da PI3K, sem adição de glutamato, promoveu um aumento significativo de morte celular, em relação ao basal. Esses resultados são corroborados por outros da literatura que demonstraram o papel de PI3K em sobrevivência celular, incluindo a neuronal (CHEN, S. et al., 2017; HOSSINI et al., 2016; KIRBY et al., 2011; URANGA; KATZ; SALVADOR, 2013; ZHANG, Q. G. et al., 2006).

Posteriormente, verificou-se que a inibição genética e farmacológica de PI3K γ altera a neurotransmissão glutamatérgica. Utilizando preparações de sinaptossomas hipocâmpais obtidas de animais WT e PI3K γ ^{-/-} e estimuladas com KCl, observou-se um aumento da concentração de cálcio citosólico e da liberação de glutamato, em preparações obtidas de animais PI3K γ ^{-/-}, assim como em preparações obtidas de animais WT pré-tratadas com o inibidor de PI3K γ , AS605240. Esses resultados poderiam estar relacionados ao aumento da susceptibilidade às crises convulsivas e

da morte neuronal nos animais $PI3K\gamma^{-/-}$, embora outros mecanismos possam estar envolvidos nesses efeitos.

Nesse contexto, mutações em mGluR do grupo II aumentaram a excitabilidade neuronal ao prevenir a ativação de PI3K (HOWLETT et al., 2008). O tratamento de culturas neuronais com wortmanina, um inibidor não-seletivo de PI3K, reduziu a expressão do transportador de glutamato tipo 1 (GLT1) e de EAAC1 (GUILLET et al., 2005). Portanto, a ativação de PI3K poderia aumentar a captação de glutamato e reduzir a liberação desse neurotransmissor, reduzindo assim a ativação de seus receptores e, conseqüentemente, das crises convulsivas.

O SE desencadeia a ativação microglial e astrocitária, que promovem a liberação de diferentes mediadores inflamatórios, iniciando assim um processo neuroinflamatório. Moléculas pró-inflamatórias podem alterar a excitabilidade neuronal e afetar as funções fisiológicas das células da glia, alterando assim as comunicações glia-neuronais, que contribuem significativamente para a epileptogênese (SHAPIRO; WANG; RIBAK, 2008; VEZZANI et al., 2011; VEZZANI; FRIEDMAN; DINGLELINE, 2013). No presente estudo, foi demonstrado que o SE induzido pela administração intra-hipocampal de PILO promoveu um aumento na marcação de micróglia, nos animais WT e $PI3K\gamma^{-/-}$. Não houve diferença entre os genótipos, no padrão de ativação microglial. É possível que a morte neuronal menor, observada nos animais WT, tenha sido suficiente para induzir uma elevada marcação microglial e astrocitária.

É importante destacar o fato de que a morfologia das células microgliais não está sempre correlacionada às suas alterações bioquímicas (NAKAMURA; SI; KATAOKA, 1999). Mesmo considerando que a morfologia dessas células é semelhante em ambos os genótipos, é possível que as células dos animais *knockout*

sejam responsáveis por uma diferente produção de mediadores inflamatórios. Isso pode levar a um maior recrutamento de regiões cerebrais que estão interconectadas com o hipocampo. De fato, foi observada uma maior marcação microglial em algumas regiões do córtex pré-frontal dos animais $PI3K\gamma^{-/-}$, em relação aos animais WT. Este fato pode estar relacionado à maior gravidade das crises convulsivas apresentadas pelos animais $PI3K\gamma^{-/-}$ durante o SE.

Um aumento da marcação astrocitária pós-SE foi também observada nas três regiões hipocampais de animais WT e $PI3K\gamma^{-/-}$. Essa ativação astrocitária pós-SE pode promover alterações na expressão de receptores e transportadores para glutamato, em canais iônicos voltagem-dependentes, contribuindo para a excitabilidade e sincronização neuronal (SEIFERT; CARMIGNOTO; STEINHAUSER, 2010; ZHU et al., 2016). Além disso, apesar de não haver diferença significativa entre os genótipos na marcação astrocitária, um estudo utilizando culturas de astrócitos demonstrou que a inibição da via PI3K/Akt/mTOR diminui a expressão de GLUT1, um importante transportador astrocitário e neuronal responsável pela depuração glutamatérgica no SNC (WU et al., 2010).

Com intuito de se investigar o efeito da deleção de $PI3K\gamma$ em outro modelo de crises convulsivas, foi observado, no modelo de crises convulsivas induzidas por PTZ, que os animais $PI3K\gamma^{-/-}$ apresentaram uma maior susceptibilidade às crises, de acordo com os parâmetros avaliados. De fato, foi demonstrada uma ativação aguda da via PI3K/Akt/mTOR após as crises convulsivas induzidas por PTZ em ratos. No entanto, o pré-tratamento com um inibidor não-seletivo de PI3K, a wortmanina, não foi capaz de modular as crises convulsivas no modelo de PTZ (ZHANG, B.; WONG, 2012). De forma semelhante, outro estudo também demonstrou a falta de efeito do inibidor de mTOR, rapamicina, utilizando o mesmo modelo de indução de crises

convulsivas (HARTMAN et al., 2012). Portanto, a PI3K γ parece conferir efeitos protetores específicos para o desenvolvimento das crises e eventos pós-ictais, o que ser útil para se evitar efeitos patológicos a longo prazo.

Embora os achados patológicos observados na ausência de PI3K γ possam ser devido ao aumento da liberação de glutamato, convulsões mais severas e efeitos excitotóxicos promovidos pela PILO, as alterações pós-ictais poderiam também ser atribuídas à ausência dessa enzima. A ausência de PI3K γ poderia prejudicar os mecanismos de proteção desencadeados por um estímulo excitotóxico. Além disso, a ausência dessa enzima durante o desenvolvimento poderia induzir mecanismos compensatórios responsáveis por alguns dos efeitos observados (FUNG-LEUNG, 2013; ROLLER et al., 2012; RUSSO et al., 2011).

Em uma segunda etapa do presente trabalho, investigou-se o papel de PI3K e mTOR sobre o efeito anticonvulsivante do CBD. Inicialmente, demonstrou-se que a administração única de CBD diminui significativamente a intensidade do SE induzido pela administração intra-hipocampal de PILO. Tal resultado está de acordo com outros trabalhos, que demonstraram um efeito do CBD *in vitro*, na redução da atividade epileptiforme em fatias de hipocampo (JONES et al., 2010) e, *in vivo*, na redução de crises convulsivas induzidas por PTZ, penicilina ou PILO (CARLINI et al., 1973; DO VAL-DA SILVA et al., 2017; JONES et al., 2012; JONES et al., 2010).

O CBD promoveu também uma diminuição da morte neuronal pós-SE, bem como da morte celular induzida por glutamato em cultura primária de neurônios hipocampais. De acordo com esses resultados, a administração de CBD antes e/ou após o SE induzido pela administração intra-hipocampal de PILO em ratos reduziu a morte neuronal 1 e 3 dias após o SE (DO VAL-DA SILVA et al., 2017). Além disso, o CBD reduziu a morte neuronal induzida por isquemia cerebral em leitões (ALVAREZ

et al., 2008) e em ratos recém-nascidos (CEPRIAN et al., 2016; PAZOS et al., 2012), assim como pela privação de oxigênio e glicose em cultura de neurônios hipocâmpais (SUN et al., 2017).

O CBD também foi capaz de reduzir a ativação microglial e astrocitária reativas ao insulto epileptogênico induzido pela PILO, sendo previamente demonstrada essa redução da ativação das células da glia em modelo de isquemia cerebral (CEPRIAN et al., 2016). Tais resultados sugerem um importante papel do CBD não somente para bloquear as crises convulsivas, mas também para modular eventos pós-ictais que contribuem para a epileptogênese.

Apesar de alguns estudos terem demonstrado efeitos promissores do CBD na modulação de crises convulsivas, seu mecanismo de ação não está completamente elucidado. Para isso, foi investigada, primeiramente, a participação dos receptores CB₁ no efeito anticonvulsivante do CBD. O antagonismo de CB₁ pelo AM251 foi capaz de reduzir o efeito anticonvulsivante do CBD. Nesse contexto, alguns estudos apresentaram resultados controversos a respeito da interação do CBD com os receptores CB₁. Foi demonstrado que o CBD apresenta baixa afinidade por receptores CB_{1/2} (JONES et al., 2010), além de ser capaz de antagonizar, *in vitro*, os receptores CB_{1/2}, em baixas concentrações (THOMAS et al., 2007). No entanto, um estudo mais recente demonstrou a participação do receptor CB₁ no efeito vasorrelaxante do CBD (STANLEY et al., 2015). Dessa forma, são necessários mais estudos que possam investigar o possível papel de CBD como um agonista de CB₁. Outro ponto importante a se considerar é o fato do AM251, usado no presente estudo, poder atuar também em outros receptores, tais como em receptor de potencial transitório anquirina 1 (TRPA₁), em neurônios sensoriais (PATIL et al., 2011).

Alguns trabalhos têm demonstrado o envolvimento da via PI3K/Akt/mTOR em alguns efeitos farmacológicos de fitocanabinoides (MOLINA-HOLGADO, E. et al., 2002; PUIGHERMANAL et al., 2009). Nesse contexto, alguns efeitos promovidos pelo CBD poderiam estar relacionados com a ação dessa via como consequência da ativação prévia de receptores CB_{1/2} (SANCHEZ et al., 2003). Portanto, investigou-se o envolvimento de PI3K γ sobre o efeito anticonvulsivante do CBD. Observou-se uma redução do efeito do CBD nos animais PI3K γ ^{-/-} quando comparado aos animais WT. De forma interessante, o efeito do VPA, usado como um controle, sobre as crises convulsivas não foi reduzido na ausência de PI3K γ . Foi observado também que a inibição genética e farmacológica de PI3K γ promoveu uma redução do efeito neuroprotetor *in vivo* e *in vitro* do CBD, além da redução da capacidade em diminuir as ativações microglial e astrocitária induzidas pela administração de PILO.

Foram avaliados também os níveis hipocâmpais de alguns fatores neurotróficos que poderiam ser alterados após um insulto epileptogênico. O CBD promoveu um aumento dos níveis de NGF somente no hipocampo de animais WT tratados com PILO, não havendo alteração dos níveis de BDNF e GDNF. De modo interessante, o aumento de NGF induzido por CBD não foi observado em animais deficientes para PI3K γ . Esses níveis de NGF poderiam contribuir para a neuroproteção induzida por CBD, sendo que esse efeito pode ser mediado pela PI3K γ .

Nesse sentido, foi demonstrado que a ativação prévia de receptores CB_{1/2} por fitocanabinoides promove a ativação da via da PI3K/Akt e, conseqüente estimulação da via Raf/ERK e indução de NGF (SANCHEZ et al., 2003). Outro estudo demonstrou que o tratamento com CBD em animais submetidos ao modelo de encefalite autoimune experimental promoveu a melhora dos sintomas da doença,

aumentando significativamente a ativação da via PI3K/Akt/mTOR, bem como os níveis de BDNF (GIACOPPO et al., 2017). Além disso, outro estudo demonstrou que o efeito neuroprotetor de NGF e BDNF, em culturas de neurônios hipocâmpais estimuladas com um agente pró-apoptótico, requer a ativação da via PI3K/Akt (NGUYEN et al., 2010).

Posteriormente, verificou-se o efeito anticonvulsivante do CBD no modelo de crises induzidas por PTZ em animais WT e PI3K $\gamma^{-/-}$, sendo verificado um considerável efeito anticonvulsivante nos animais WT e uma perda desse efeito nos animais PI3K $\gamma^{-/-}$. Além disso, o pré-tratamento com o inibidor de PI3K e de mTOR, LY294002 (BRUNN et al., 1996), não apresentou efeito sobre as crises, por si só, mas foi capaz de reduzir o efeito anticonvulsivante do CBD. Corroborando esses dados, foi demonstrado que as drogas anticonvulsivantes carbamazepina e pregabalina aumentam a atividade do transportador glutamatérgico neuronal, EAAT₃, sendo esta ativação inibida pela wortmanina e pelo LY294002 (LEE et al., 2005; RYU et al., 2012).

Verificou-se também a participação de mTOR sobre o efeito anticonvulsivante do CBD. O pré-tratamento com rapamicina, um inibidor da mTOR, não promoveu efeito, por si só, sobre o SE induzido por PILO, mas promoveu uma redução da atividade anticonvulsivante do CBD. De acordo, o pré-tratamento com rapamicina foi capaz de diminuir o efeito anticonvulsivante do CBD no modelo de crises induzido por overdose de cocaína (GOBIRA et al., 2015). Apesar de não ser relacionado diretamente às crises convulsivas, também foi demonstrado que o CBD apresenta propriedades anti-psicóticas relacionadas à ativação da via da mTOR em neurônios dopaminérgicos do núcleo accumbens (RENARD et al., 2016).

Em contrapartida, outros estudos demonstraram que a inibição de mTOR pela rapamicina apresenta efeito anticonvulsivante e alguns efeitos anti-epileptogênicos (BUCKMASTER et al., 2009; BUCKMASTER; LEW, 2011; HUANG et al., 2010). Ainda, a deleção da enzima PTEN, que regula negativamente a ativação de PI3K, em células granulares do GD do hipocampo, foi capaz desencadear, nos animais, crises espontâneas, bem como achados histopatológicos característicos de ELT (LASARGE et al., 2015; PUN et al., 2012). Assim, é possível que o papel da ativação dessa via de sinalização em crises convulsivas, eventos pós-ictais e epilepsia dependa dos tipos de agentes convulsivantes e da sua localização em determinadas regiões anatômicas.

7. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos no presente trabalho, conclui-se que a enzima PI3K γ e sua via de sinalização apresentam um importante papel em excitotoxicidade, crises convulsivas e eventos pós-ictais. Além disso, esses resultados sugerem, pela primeira vez, que os efeitos anticonvulsivante e neuroprotetor do CBD são modulados por PI3K e mTOR. Apesar disso, são necessários mais estudos que possam avaliar o potencial anti-epileptogênico do CBD em modelos de epilepsia, bem como os mecanismos que medeiam esse efeito.

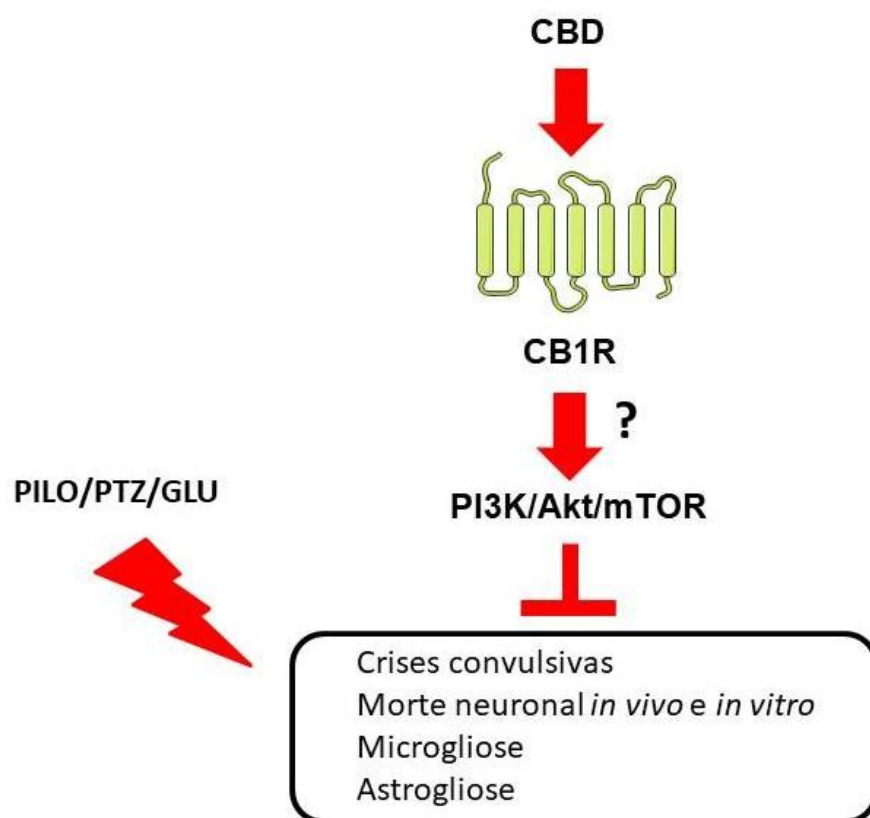


Figura 31: Representação esquemática da conclusão do estudo.

8. REFERÊNCIAS

ACEBES, A.; MORALES, M. At a PI3K crossroads: lessons from flies and rodents. **Rev Neurosci**, v. 23, n. 1, p. 29-37, 2012.

AHRENS, J. et al. The nonpsychotropic cannabinoid cannabidiol modulates and directly activates alpha-1 and alpha-1-Beta glycine receptor function. **Pharmacology**, v. 83, n. 4, p. 217-22, 2009.

ALVAREZ, F. J. et al. Neuroprotective effects of the nonpsychoactive cannabinoid cannabidiol in hypoxic-ischemic newborn piglets. **Pediatr Res**, v. 64, n. 6, p. 653-8, Dec 2008.

AMARAL, D. G.; WITTER, M. P. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. **Neuroscience**, v. 31, n. 3, p. 571-91, 1989.

ANDRADE-VALENÇA, L. P. A. V., M.M.; VELASCO, T.R.; LEITE, J.P. Epilepsia do Lobo Temporal Mesial Associada à Esclerose Hipocampal. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**, v. 12, p. 31-36, 2006.

ARAKI, T. et al. Characterization of neuronal death induced by focally evoked limbic seizures in the C57BL/6 mouse. **J Neurosci Res**, v. 69, n. 5, p. 614-21, Sep 01 2002.

ASHTON, C. H. Pharmacology and effects of cannabis: a brief review. **Br J Psychiatry**, v. 178, p. 101-6, Feb 2001.

AUVIN, S.; DUPUIS, N. Outcome of status epilepticus. What do we learn from animal data? **Epileptic Disord**, v. 16 Spec No 1, p. S37-43, Oct 2014.

BABB, T. L. et al. Synaptic reorganization by mossy fibers in human epileptic fascia dentata. **Neuroscience**, v. 42, n. 2, p. 351-63, 1991.

BAGDY, G. et al. Serotonin and epilepsy. **J Neurochem**, v. 100, n. 4, p. 857-73, Feb 2007.

BATISTA, L. A. et al. Inhibition of endocannabinoid neuronal uptake and hydrolysis as strategies for developing anxiolytic drugs. **Behav Pharmacol**, v. 25, n. 5-6, p. 425-33, Sep 2014.

BEN, J. et al. Brain MAPKs levels are differentially associated with seizures threshold and severity progression in pentylenetetrazole-kindled mice. **CNS Neurosci Ther**, v. 19, n. 9, p. 726-9, Sep 2013.

BHOWMIK, M.; KHANAM, R.; VOHORA, D. Histamine H3 receptor antagonists in relation to epilepsy and neurodegeneration: a systemic consideration of recent progress and perspectives. **Br J Pharmacol**, v. 167, n. 7, p. 1398-414, Dec 2012.

BOLANOS, A. R. et al. Comparison of valproate and phenobarbital treatment after status epilepticus in rats. **Neurology**, v. 51, n. 1, p. 41-8, Jul 1998.

BONANSCO, C.; FUENZALIDA, M. Plasticity of Hippocampal Excitatory-Inhibitory Balance: Missing the Synaptic Control in the Epileptic Brain. **Neural Plast**, v. 2016, p. 8607038, 2016.

BOZZI, Y.; BORRELLI, E. The role of dopamine signaling in epileptogenesis. **Front Cell Neurosci**, v. 7, p. 157, Sep 17 2013.

BREVARD, M. E. et al. Imaging the neural substrates involved in the genesis of pentylenetetrazol-induced seizures. **Epilepsia**, v. 47, n. 4, p. 745-54, Apr 2006.

BRIGO, F.; IGWE, S. C. Melatonin as add-on treatment for epilepsy. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 3, p. CD006967, Mar 17 2016.

BRUNN, G. J. et al. Direct inhibition of the signaling functions of the mammalian target of rapamycin by the phosphoinositide 3-kinase inhibitors, wortmannin and LY294002. **EMBO J**, v. 15, n. 19, p. 5256-67, Oct 01 1996.

BUCKMASTER, P. S.; INGRAM, E. A.; WEN, X. Inhibition of the mammalian target of rapamycin signaling pathway suppresses dentate granule cell axon sprouting in a rodent model of temporal lobe epilepsy. **J Neurosci**, v. 29, n. 25, p. 8259-69, Jun 24 2009.

BUCKMASTER, P. S.; LEW, F. H. Rapamycin suppresses mossy fiber sprouting but not seizure frequency in a mouse model of temporal lobe epilepsy. **J Neurosci**, v. 31, n. 6, p. 2337-47, Feb 09 2011.

CANTLEY, L. C. The phosphoinositide 3-kinase pathway. **Science**, v. 296, n. 5573, p. 1655-7, May 31 2002.

CARLINI, E. A. et al. Letter: Cannabidiol and Cannabis sativa extract protect mice and rats against convulsive agents. **J Pharm Pharmacol**, v. 25, n. 8, p. 664-5, Aug 1973.

CARRIER, E. J.; AUCHAMPACH, J. A.; HILLARD, C. J. Inhibition of an equilibrative nucleoside transporter by cannabidiol: a mechanism of cannabinoid immunosuppression. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 20, p. 7895-900, May 16 2006.

CAVALHEIRO, E. A. The pilocarpine model of epilepsy. **Ital J Neurol Sci**, v. 16, n. 1-2, p. 33-7, Feb-Mar 1995.

CENDES, F. et al. Epilepsies associated with hippocampal sclerosis. **Acta Neuropathol**, v. 128, n. 1, p. 21-37, Jul 2014.

CEPRIAN, M. et al. Cannabidiol reduces brain damage and improves functional recovery in a neonatal rat model of arterial ischemic stroke. **Neuropharmacology**, v. 116, p. 151-159, Dec 21 2016.

CHEN, S. et al. Neuroprotective Role of the PI3 Kinase/Akt Signaling Pathway in Zebrafish. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 8, p. 21, 2017.

CHEN, S. J. et al. Amygdala kindling alters protein kinase C activity in dentate gyrus. **J Neurochem**, v. 59, n. 5, p. 1761-9, Nov 1992.

CHOI, D. W. Glutamate receptors and the induction of excitotoxic neuronal death. **Prog Brain Res**, v. 100, p. 47-51, 1994.

CHOI, J. H. et al. Effects of PI3Kgamma overexpression in the hippocampus on synaptic plasticity and spatial learning. **Mol Brain**, v. 7, p. 78, Nov 06 2014.

CILIO, M. R. et al. Anticonvulsant action and long-term effects of gabapentin in the immature brain. **Neuropharmacology**, v. 40, n. 1, p. 139-47, 2001.

CONSROE, P.; WOLKIN, A. Cannabidiol--antiepileptic drug comparisons and interactions in experimentally induced seizures in rats. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 201, n. 1, p. 26-32, Apr 1977.

CRAVATT, B. F. et al. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. **Nature**, v. 384, n. 6604, p. 83-7, Nov 07 1996.

CUNHA, J. M. et al. Chronic administration of cannabidiol to healthy volunteers and epileptic patients. **Pharmacology**, v. 21, n. 3, p. 175-85, 1980.

CURIA, G. et al. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. **J Neurosci Methods**, v. 172, n. 2, p. 143-57, Jul 30 2008.

DANBOLT, N. C. Glutamate uptake. **Prog Neurobiol**, v. 65, n. 1, p. 1-105, Sep 2001.

DE OLIVEIRA, A. C. et al. Regulation of prostaglandin E2 synthase expression in activated primary rat microglia: evidence for uncoupled regulation of mPGES-1 and COX-2. **Glia**, v. 56, n. 8, p. 844-55, Jun 2008.

DE OLIVEIRA, A. C. et al. Pharmacological inhibition of Akt and downstream pathways modulates the expression of COX-2 and mPGES-1 in activated microglia. **J Neuroinflammation**, v. 9, p. 2, Jan 03 2012.

DENG, W.; AIMONE, J. B.; GAGE, F. H. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? **Nat Rev Neurosci**, v. 11, n. 5, p. 339-50, May 2010.

DEVANE, W. A. et al. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. **Mol Pharmacol**, v. 34, n. 5, p. 605-13, Nov 1988.

DEVINSKY, O. et al. Cannabidiol: pharmacology and potential therapeutic role in epilepsy and other neuropsychiatric disorders. **Epilepsia**, v. 55, n. 6, p. 791-802, Jun 2014.

DEVINSKY, O. et al. Cannabidiol in patients with treatment-resistant epilepsy: an open-label interventional trial. **Lancet Neurol**, v. 15, n. 3, p. 270-8, Mar 2016.

DEVINSKY, O.; WHALLEY, B. J.; DI MARZO, V. Cannabinoids in the Treatment of Neurological Disorders. **Neurotherapeutics**, v. 12, n. 4, p. 689-91, Oct 2015.

DO VAL-DA SILVA, R. A. et al. Protective Effects of Cannabidiol against Seizures and Neuronal Death in a Rat Model of Mesial Temporal Lobe Epilepsy. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. 131, 2017-March-17 2017.

DORIA, J. G. et al. Metabotropic glutamate receptor 5 positive allosteric modulators are neuroprotective in a mouse model of Huntington's disease. **Br J Pharmacol**, v. 169, n. 4, p. 909-21, Jun 2013.

DUNKLEY, P. R. et al. A rapid method for isolation of synaptosomes on Percoll gradients. **Brain Res**, v. 372, n. 1, p. 115-29, Apr 30 1986.

ENGEL, J., JR. Concepts of epilepsy. **Epilepsia**, v. 36 Suppl 1, p. S23-9, 1995.

FERNANDES, M. J.; NAFFAH-MAZZACORATTI, M. G.; CAVALHEIRO, E. A. Na⁺K⁺ ATPase activity in the rat hippocampus: a study in the pilocarpine model of epilepsy. **Neurochem Int**, v. 28, n. 5-6, p. 497-500, May-Jun 1996.

FERNANDES, M. J. D. S. Epilepsia do lobo temporal: mecanismos e perspectivas. **Estudos Avançados**, v. 27, p. 85-98, 2013.

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

FISHER, R. S. et al. Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. **Epilepsia**, Mar 08 2017.

FUNG-LEUNG, W. P. Phosphoinositide 3-kinase gamma in T cell biology and disease therapy. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1280, p. 40-3, Mar 2013.

FURTADO, M. A. et al. Behavioral, morphologic, and electroencephalographic evaluation of seizures induced by intrahippocampal microinjection of pilocarpine. **Epilepsia**, v. 43 Suppl 5, p. 37-9, 2002.

GAGE, G. J.; KIPKE, D. R.; SHAIN, W. Whole animal perfusion fixation for rodents. **J Vis Exp**, n. 65, Jul 30 2012.

GAONI, Y.; MECHOULAM, R. Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. **Journal of the American Chemical Society**, v. 86, n. 8, p. 1646-1647, 1964.

GIACOPPO, S. et al. Target regulation of PI3K/Akt/mTOR pathway by cannabidiol in treatment of experimental multiple sclerosis. **Fitoterapia**, v. 116, p. 77-84, Jan 2017.

GIORGI, F. S. et al. The role of norepinephrine in epilepsy: from the bench to the bedside. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 28, n. 5, p. 507-24, Sep 2004.

GOBIRA, P. H. et al. Cannabidiol, a Cannabis sativa constituent, inhibits cocaine-induced seizures in mice: Possible role of the mTOR pathway and reduction in glutamate release. **Neurotoxicology**, v. 50, p. 116-21, Sep 2015.

GOMEZ DEL PULGAR, T. et al. Cannabinoids protect astrocytes from ceramide-induced apoptosis through the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. **J Biol Chem**, v. 277, n. 39, p. 36527-33, Sep 27 2002.

GROSS, C.; BASSELL, G. J. Neuron-specific regulation of class I PI3K catalytic subunits and their dysfunction in brain disorders. **Front Mol Neurosci**, v. 7, p. 12, 2014.

GRYNKIEWICZ, G.; POENIE, M.; TSIEN, R. Y. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. **J Biol Chem**, v. 260, n. 6, p. 3440-50, Mar 25 1985.

GUIARD, B. P.; DI GIOVANNI, G. Central serotonin-2A (5-HT_{2A}) receptor dysfunction in depression and epilepsy: the missing link? **Front Pharmacol**, v. 6, p. 46, 2015.

GUILLET, B. A. et al. Differential regulation by protein kinases of activity and cell surface expression of glutamate transporters in neuron-enriched cultures. **Neurochem Int**, v. 46, n. 4, p. 337-46, Mar 2005.

GUZMAN, M. Effects on cell viability. **Handb Exp Pharmacol**, n. 168, p. 627-42, 2005.

HARTMAN, A. L. et al. The mTOR inhibitor rapamycin has limited acute anticonvulsant effects in mice. **PLoS One**, v. 7, n. 9, p. e45156, 2012.

HAWKINS, P. T. et al. Signalling through Class I PI3Ks in mammalian cells. **Biochem Soc Trans**, v. 34, n. Pt 5, p. 647-62, Nov 2006.

HOSSINI, A. M. et al. PI3K/AKT Signaling Pathway Is Essential for Survival of Induced Pluripotent Stem Cells. **PLoS One**, v. 11, n. 5, p. e0154770, 2016.

HOWLETT, E. et al. A PI3-kinase-mediated negative feedback regulates neuronal excitability. **PLoS Genet**, v. 4, n. 11, p. e1000277, Nov 2008.

HUANG, X. et al. Pharmacological inhibition of the mammalian target of rapamycin pathway suppresses acquired epilepsy. **Neurobiol Dis**, v. 40, n. 1, p. 193-9, Oct 2010.

IZQUIERDO, I.; ORSINGHER, O. A.; BERARDI, A. C. Effect of cannabidiol and of other cannabis sativa compounds on hippocampal seizure discharges. **Psychopharmacologia**, v. 28, n. 1, p. 95-102, 1973.

JONES, N. A. et al. Cannabidiol exerts anti-convulsant effects in animal models of temporal lobe and partial seizures. **Seizure**, v. 21, n. 5, p. 344-52, Jun 2012.

JONES, N. A. et al. Cannabidiol displays antiepileptiform and antiseizure properties in vitro and in vivo. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 332, n. 2, p. 569-77, Feb 2010.

KATONA, I.; FREUND, T. F. Endocannabinoid signaling as a synaptic circuit breaker in neurological disease. **Nat Med**, v. 14, n. 9, p. 923-30, Sep 2008.

KIM, J. I. et al. PI3Kgamma is required for NMDA receptor-dependent long-term depression and behavioral flexibility. **Nat Neurosci**, v. 14, n. 11, p. 1447-54, Oct 23 2011.

KIRBY, J. et al. Phosphatase and tensin homologue/protein kinase B pathway linked to motor neuron survival in human superoxide dismutase 1-related amyotrophic lateral sclerosis. **Brain**, v. 134, n. Pt 2, p. 506-17, Feb 2011.

KLIOUEVA, I. A. et al. PTZ-induced seizures in rats: effects of age and strain. **Physiol Behav**, v. 72, n. 3, p. 421-6, Feb 2001.

KURUBA, R.; HATTIANGADY, B.; SHETTY, A. K. Hippocampal neurogenesis and neural stem cells in temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Behav**, v. 14 Suppl 1, p. 65-73, Jan 2009.

KWAN, P.; SCHACHTER, S. C.; BRODIE, M. J. Drug-resistant epilepsy. **N Engl J Med**, v. 365, n. 10, p. 919-26, Sep 08 2011.

LAINE, J. et al. Differential regulation of Akt kinase isoforms by the members of the TCL1 oncogene family. **J Biol Chem**, v. 277, n. 5, p. 3743-51, Feb 01 2002.

LASARGE, C. L.; SANTOS, V. R.; DANZER, S. C. PTEN deletion from adult-generated dentate granule cells disrupts granule cell mossy fiber axon structure. **Neurobiol Dis**, v. 75, p. 142-50, Mar 2015.

LEE, G. et al. Carbamazepine enhances the activity of glutamate transporter type 3 via phosphatidylinositol 3-kinase. **Epilepsy Res**, v. 66, n. 1-3, p. 145-53, Aug-Sep 2005.

LEES, G. V.; JONES, E. G.; MCNAMARA, J. Epilepsy. **Neurobiol Dis**, v. 7, n. 5, p. 549-51, Oct 2000.

LEITE, J. P.; BORTOLOTTI, Z. A.; CAVALHEIRO, E. A. Spontaneous recurrent seizures in rats: an experimental model of partial epilepsy. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 14, n. 4, p. 511-7, Winter 1990.

LIMA, I. V. et al. Postictal alterations induced by intrahippocampal injection of pilocarpine in C57BL/6 mice. **Epilepsy Behav**, v. 64, n. Pt A, p. 83-89, Nov 2016.

LIMA, I. V. et al. PI3Kgamma deficiency enhances seizures severity and associated outcomes in a mouse model of convulsions induced by intrahippocampal injection of pilocarpine. **Exp Neurol**, v. 267, p. 123-34, May 2015.

LIU, S.; ZHENG, P. Altered PKA modulation in the Na(v)1.1 epilepsy variant I1656M. **J Neurophysiol**, v. 110, n. 9, p. 2090-8, Nov 2013.

LIU, X. B.; MURRAY, K. D. Neuronal excitability and calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II: location, location, location. **Epilepsia**, v. 53 Suppl 1, p. 45-52, Jun 2012.

LOSCHER, W. Strategies for antiepileptogenesis: Antiepileptic drugs versus novel approaches evaluated in post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy. In: NOEBELS, J. L.; AVOLI, M., et al (Ed.). **Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies**. 4th. Bethesda (MD), 2012.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, n. 1, p. 265-75, Nov 1951.

MAEHAMA, T.; DIXON, J. E. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. **J Biol Chem**, v. 273, n. 22, p. 13375-8, May 29 1998.

MCNAMARA, J. O. Cellular and molecular basis of epilepsy. **J Neurosci**, v. 14, n. 6, p. 3413-25, Jun 1994.

MCPARTLAND, J. M. et al. Are cannabidiol and Delta(9) -tetrahydrocannabinol negative modulators of the endocannabinoid system? A systematic review. **Br J Pharmacol**, v. 172, n. 3, p. 737-53, Feb 2015.

MCPARTLAND, J. M.; GLASS, M.; PERTWEE, R. G. Meta-analysis of cannabinoid ligand binding affinity and receptor distribution: interspecies differences. **Br J Pharmacol**, v. 152, n. 5, p. 583-93, Nov 2007.

MECHOULAM, R.; CARLINI, E. A. Toward drugs derived from cannabis. **Naturwissenschaften**, v. 65, n. 4, p. 174-9, Apr 1978.

MECHOULAM, R.; HANUS, L. Cannabidiol: an overview of some chemical and pharmacological aspects. Part I: chemical aspects. **Chem Phys Lipids**, v. 121, n. 1-2, p. 35-43, Dec 31 2002.

MECHOULAM, R.; SHVO, Y. Hashish. I. The structure of cannabidiol. **Tetrahedron**, v. 19, n. 12, p. 2073-8, Dec 1963.

MELDRUM, B. S.; BRUTON, C. J. **Epilepsy**. In: **Greenfields Neuropathology**. 5^a. Oxford: Oxford University Press, 1992.

MOLINA-HOLGADO, E. et al. Cannabinoids promote oligodendrocyte progenitor survival: involvement of cannabinoid receptors and phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signaling. **J Neurosci**, v. 22, n. 22, p. 9742-53, Nov 15 2002.

MOLINA-HOLGADO, F. et al. Neuroprotective effects of the synthetic cannabinoid HU-210 in primary cortical neurons are mediated by phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling. **Mol Cell Neurosci**, v. 28, n. 1, p. 189-94, Jan 2005.

MULA, M. Recent and future antiepileptic drugs and their impact on cognition: what can we expect? **Expert Rev Neurother**, v. 12, n. 6, p. 667-71, Jun 2012.

MUNRO, S.; THOMAS, K. L.; ABU-SHAAR, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. **Nature**, v. 365, n. 6441, p. 61-5, Sep 02 1993.

NAKAMURA, Y.; SI, Q. S.; KATAOKA, K. Lipopolysaccharide-induced microglial activation in culture: temporal profiles of morphological change and release of cytokines and nitric oxide. **Neurosci Res**, v. 35, n. 2, p. 95-100, Nov 1999.

NEARING, K.; MADHAVAN, D.; DEVINSKY, O. Temporal lobe epilepsy: a progressive disorder? **Rev Neurol Dis**, v. 4, n. 3, p. 122-7, Summer 2007.

NETO, A. R. et al. Tratamento Cirúrgico das Epilepsias. **Revista de Neurociências**, v. 9, n. 3, p. 118-126, 2001.

NEVES, G.; COOKE, S. F.; BLISS, T. V. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. **Nat Rev Neurosci**, v. 9, n. 1, p. 65-75, Jan 2008.

NGUYEN, T. L. et al. Neuroprotection signaling pathway of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor against staurosporine induced apoptosis in hippocampal H19-7/IGF-IR [corrected]. **Exp Mol Med**, v. 42, n. 8, p. 583-95, Aug 31 2010.

NICHOLLS, D. G.; SIHRA, T. S.; SANCHEZ-PRIETO, J. Calcium-dependent and -independent release of glutamate from synaptosomes monitored by continuous fluorometry. **J Neurochem**, v. 49, n. 1, p. 50-7, Jul 1987.

NISWENDER, C. M.; CONN, P. J. Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 50, p. 295-322, 2010.

NOMURA, D. K. et al. Monoacylglycerol lipase regulates 2-arachidonoylglycerol action and arachidonic acid levels. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 18, n. 22, p. 5875-8, Nov 15 2008.

OH, T. et al. PI3K pathway inhibitors: potential prospects as adjuncts to vaccine immunotherapy for glioblastoma. **Immunotherapy**, v. 6, n. 6, p. 737-53, 2014.

ONAIVI, E. S. et al. CNS effects of CB2 cannabinoid receptors: beyond neuro-immuno-cannabinoid activity. **J Psychopharmacol**, v. 26, n. 1, p. 92-103, Jan 2012.

PATIL, M. et al. Cannabinoid receptor antagonists AM251 and AM630 activate TRPA1 in sensory neurons. **Neuropharmacology**, v. 61, n. 4, p. 778-88, Sep 2011.

PAXINOS, G.; FRANKLIN, K. B. J. **The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates**. . San Diego: Academic Press, 2001. ISBN 978-0125476362

PAZOS, M. R. et al. Cannabidiol administration after hypoxia-ischemia to newborn rats reduces long-term brain injury and restores neurobehavioral function. **Neuropharmacology**, v. 63, n. 5, p. 776-83, Oct 2012.

PERTWEE, R. G. The pharmacology of cannabinoid receptors and their ligands: an overview. **Int J Obes (Lond)**, v. 30 Suppl 1, p. S13-8, Apr 2006.

PIOMELLI, D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. **Nat Rev Neurosci**, v. 4, n. 11, p. 873-84, Nov 2003.

PITKANEN, A. Therapeutic approaches to epileptogenesis--hope on the horizon. **Epilepsia**, v. 51 Suppl 3, p. 2-17, Jul 2010.

PITKANEN, A. et al. Administration of diazepam during status epilepticus reduces development and severity of epilepsy in rat. **Epilepsy Res**, v. 63, n. 1, p. 27-42, Jan 2005.

PITKANEN, A. et al. Epileptogenesis. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 5, n. 10, Sep 18 2015.

PITKANEN, A.; SUTULA, T. P. Is epilepsy a progressive disorder? Prospects for new therapeutic approaches in temporal-lobe epilepsy. **Lancet Neurol**, v. 1, n. 3, p. 173-81, Jul 2002.

PUIGHERMANAL, E. et al. Cannabinoid modulation of hippocampal long-term memory is mediated by mTOR signaling. **Nat Neurosci**, v. 12, n. 9, p. 1152-8, Sep 2009.

PUN, R. Y. et al. Excessive activation of mTOR in postnatally generated granule cells is sufficient to cause epilepsy. **Neuron**, v. 75, n. 6, p. 1022-34, Sep 20 2012.

RACINE, R. J. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. **Electroencephalogr Clin Neurophysiol**, v. 32, n. 3, p. 281-94, Mar 1972.

RADZIK, I. et al. Prospects of epileptogenesis prevention. **Pharmacol Rep**, v. 67, n. 3, p. 663-8, Jun 2015.

RENARD, J. et al. Cannabidiol Counteracts Amphetamine-Induced Neuronal and Behavioral Sensitization of the Mesolimbic Dopamine Pathway through a Novel mTOR/p70S6 Kinase Signaling Pathway. **J Neurosci**, v. 36, n. 18, p. 5160-9, May 04 2016.

RESSTEL, L. B. et al. 5-HT_{1A} receptors are involved in the cannabidiol-induced attenuation of behavioural and cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. **Br J Pharmacol**, v. 156, n. 1, p. 181-8, Jan 2009.

ROLLER, A. et al. Blockade of phosphatidylinositol 3-kinase PI3Kdelta or PI3Kgamma reduces IL-17 and ameliorates imiquimod-induced psoriasis-like dermatitis. **J Immunol**, v. 189, n. 9, p. 4612-20, Nov 01 2012.

ROMANO-SILVA, M. A. et al. Rat cortical synaptosomes have more than one mechanism for Ca²⁺ entry linked to rapid glutamate release: studies using the Phoneutria nigriventer toxin PhTX2 and potassium depolarization. **Biochem J**, v. 296 (Pt 2), p. 313-9, Dec 01 1993.

ROMERO-LEGUIZAMON, C. R. et al. [Signaling pathways mTOR and AKT in epilepsy]. **Rev Neurol**, v. 63, n. 1, p. 33-41, Jul 01 2016.

ROUSE, S. T. et al. Muscarinic receptor subtypes involved in hippocampal circuits. **Life Sci**, v. 64, n. 6-7, p. 501-9, 1999.

ROWLEY, N. M. et al. Glutamate and GABA synthesis, release, transport and metabolism as targets for seizure control. **Neurochem Int**, v. 61, n. 4, p. 546-58, Sep 2012.

RUSSO, R. C. et al. Phosphoinositide 3-kinase gamma plays a critical role in bleomycin-induced pulmonary inflammation and fibrosis in mice. **J Leukoc Biol**, v. 89, n. 2, p. 269-82, Feb 2011.

RYU, J. H. et al. Effects of pregabalin on the activity of glutamate transporter type 3. **Br J Anaesth**, v. 109, n. 2, p. 234-9, Aug 2012.

SANCHEZ, M. G. et al. Activation of phosphoinositide 3-kinase/PKB pathway by CB(1) and CB(2) cannabinoid receptors expressed in prostate PC-3 cells. Involvement in Raf-1 stimulation and NGF induction. **Cell Signal**, v. 15, n. 9, p. 851-9, Sep 2003.

SANNA, P. P. et al. Phosphatidylinositol 3-kinase is required for the expression but not for the induction or the maintenance of long-term potentiation in the hippocampal CA1 region. **J Neurosci**, v. 22, n. 9, p. 3359-65, May 01 2002.

SCHEFFER, I. E. et al. Classification of the epilepsies: New concepts for discussion and debate—Special report of the ILAE Classification Task Force of the Commission for Classification and Terminology. **Epilepsia Open**, v. 1, n. 1-2, p. 37-44, 2016.

SCHMIDT, D.; SCHACHTER, S. C. Drug treatment of epilepsy in adults. **BMJ**, v. 348, p. g254, Feb 28 2014.

SCHMUED, L. C. et al. Fluoro-Jade C results in ultra high resolution and contrast labeling of degenerating neurons. **Brain Res**, v. 1035, n. 1, p. 24-31, Feb 21 2005.

SCHULTZ, C.; ENGELHARDT, M. Anatomy of the hippocampal formation. **Front Neurol Neurosci**, v. 34, p. 6-17, 2014.

SCORZA, F. A. et al. The pilocarpine model of epilepsy: what have we learned? **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 81, p. 345-365, 2009.

SEGAL, M. Synaptic activation of a cholinergic receptor in rat hippocampus. **Brain Res**, v. 452, n. 1-2, p. 79-86, Jun 14 1988.

SEIFERT, G.; CARMIGNOTO, G.; STEINHAUSER, C. Astrocyte dysfunction in epilepsy. **Brain Res Rev**, v. 63, n. 1-2, p. 212-21, May 2010.

SHAPIRO, L. A.; WANG, L.; RIBAK, C. E. Rapid astrocyte and microglial activation following pilocarpine-induced seizures in rats. **Epilepsia**, v. 49 Suppl 2, p. 33-41, 2008.

SHARMA, A. K. et al. Mesial temporal lobe epilepsy: pathogenesis, induced rodent models and lesions. **Toxicol Pathol**, v. 35, n. 7, p. 984-99, Dec 2007.

SHEEHAN, T. P.; CHAMBERS, R. A.; RUSSELL, D. S. Regulation of affect by the lateral septum: implications for neuropsychiatry. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 46, n. 1, p. 71-117, Aug 2004.

SHINODA, S. et al. Bim regulation may determine hippocampal vulnerability after injurious seizures and in temporal lobe epilepsy. **J Clin Invest**, v. 113, n. 7, p. 1059-68, Apr 2004.

SHIRAZI-ZAND, Z. et al. The role of potassium BK channels in anticonvulsant effect of cannabidiol in pentylenetetrazole and maximal electroshock models of seizure in mice. **Epilepsy Behav**, v. 28, n. 1, p. 1-7, Jul 2013.

SIMONATO, M. et al. Finding a better drug for epilepsy: preclinical screening strategies and experimental trial design. **Epilepsia**, v. 53, n. 11, p. 1860-7, Nov 2012.

SPRUTSON, N.; MCBAIN, C. **Structural and Functional Properties of Hippocampal Neurons**. 2007.

STANLEY, C. P. et al. Cannabidiol causes endothelium-dependent vasorelaxation of human mesenteric arteries via CB1 activation. **Cardiovasc Res**, v. 107, n. 4, p. 568-78, Sep 01 2015.

SUN, S. et al. Cannabidiol attenuates OGD/R-induced damage by enhancing mitochondrial bioenergetics and modulating glucose metabolism via pentose-phosphate pathway in hippocampal neurons. **Redox Biol**, v. 11, p. 577-585, Apr 2017.

TCHEKALAROVA, J. et al. The role of the melatonergic system in epilepsy and comorbid psychiatric disorders. **Brain Res Bull**, v. 119, n. Pt A, p. 80-92, Oct 2015.

TEMKIN, N. R. Preventing and treating posttraumatic seizures: the human experience. **Epilepsia**, v. 50 Suppl 2, p. 10-3, Feb 2009.

THOMAS, A. et al. Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB1 and CB2 receptor agonists in vitro. **Br J Pharmacol**, v. 150, n. 5, p. 613-23, Mar 2007.

TRAYNELIS, S. F. et al. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. **Pharmacol Rev**, v. 62, n. 3, p. 405-96, Sep 2010.

TURSKI, W. A. et al. Seizures produced by pilocarpine in mice: a behavioral, electroencephalographic and morphological analysis. **Brain Res**, v. 321, n. 2, p. 237-53, Nov 12 1984.

TURSKI, W. A. et al. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. **Behav Brain Res**, v. 9, n. 3, p. 315-35, Sep 1983.

URANGA, R. M.; KATZ, S.; SALVADOR, G. A. Enhanced phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt signaling has pleiotropic targets in hippocampal neurons exposed to iron-induced oxidative stress. **J Biol Chem**, v. 288, n. 27, p. 19773-84, Jul 05 2013.

VANHAESEBROECK, B. et al. Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. **Annu Rev Biochem**, v. 70, p. 535-602, 2001.

VELISEK, L. et al. Pentylentetrazol-induced seizures in rats: an ontogenetic study. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 346, n. 5, p. 588-91, Nov 1992.

VEZZANI, A. et al. The role of inflammation in epilepsy. **Nat Rev Neurol**, v. 7, n. 1, p. 31-40, Jan 2011.

VEZZANI, A.; FRIEDMAN, A.; DINGLEDINE, R. J. The role of inflammation in epileptogenesis. **Neuropharmacology**, v. 69, p. 16-24, Jun 2013.

VILELA, L. R. et al. Effects of cannabinoids and endocannabinoid hydrolysis inhibition on pentylentetrazole-induced seizure and electroencephalographic activity in rats. **Epilepsy Res**, v. 104, n. 3, p. 195-202, May 2013.

WIEBE, S. Epidemiology of temporal lobe epilepsy. **Can J Neurol Sci**, v. 27 Suppl 1, p. S6-10; discussion S20-1, May 2000.

WILSON, R. I.; NICOLL, R. A. Endocannabinoid signaling in the brain. **Science**, v. 296, n. 5568, p. 678-82, Apr 26 2002.

WU, X. et al. PI3K/Akt/mTOR signaling regulates glutamate transporter 1 in astrocytes. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 393, n. 3, p. 514-8, Mar 12 2010.

WYMANN, M. P.; PIROLA, L. Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. **Biochim Biophys Acta**, v. 1436, n. 1-2, p. 127-50, Dec 08 1998.

YANG, P. C. et al. Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for stress protocol-induced modification of hippocampal synaptic plasticity. **J Biol Chem**, v. 283, n. 5, p. 2631-43, Feb 01 2008.

ZANELATI, T. V. et al. Antidepressant-like effects of cannabidiol in mice: possible involvement of 5-HT1A receptors. **Br J Pharmacol**, v. 159, n. 1, p. 122-8, Jan 2010.

ZHANG, B.; WONG, M. Pentylentetrazole-induced seizures cause acute, but not chronic, mTOR pathway activation in rat. **Epilepsia**, v. 53, n. 3, p. 506-11, Mar 2012.

ZHANG, Q. G. et al. Akt inhibits MLK3/JNK3 signaling by inactivating Rac1: a protective mechanism against ischemic brain injury. **J Neurochem**, v. 98, n. 6, p. 1886-98, Sep 2006.

ZHU, H. et al. Remarkable alterations of Nav1.6 in reactive astrogliosis during epileptogenesis. **Sci Rep**, v. 6, p. 38108, Dec 01 2016.