DANIEL MATOVU

DIFERENÇAS NA EVOLUÇÃO DAS CRISES EPILÉPTICAS E NA DISTRIBUIÇÃO TOPOGRÁFICA DO DANO TECIDUAL ENTRE RATOS MACHOS E FÊMEAS SUBMETIDOS AO MODELO DE PILOCARPINA.

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina para obtenção do título de Doutor em Ciências.

SÃO PAULO 2021

DANIEL MATOVU

DIFERENÇAS NA EVOLUÇÃO DAS CRISES EPILÉPTICAS E NA DISTRIBUIÇÃO TOPOGRÁFICA DO DANO TECIDUAL ENTRE RATOS MACHOS E FÊMEAS SUBMETIDOS AO MODELO DE PILOCARPINA.

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Esper Abrão Cavalheiro

SÃO PAULO 2021

Daniel Matovu

Diferenças na evolução das crises epilépticas e na distribuição topográfica do dano tecidual entre ratos machos e fêmeas submetidos ao modelo de pilocarpina /Daniel Matovu - São Paulo, 2021 xiv, 68f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Neurologia/Neurociência. Orientador: Prof. Dr. Esper Abrão Cavalheiro

Título em Inglês: Differences in the evolution of epileptic seizures and in the topographical distribution of tissue damage between male and female rats submitted to the pilocarpine model.

lesões de células. 2. Diferenças de sexo. 3. Circuito límbico. 4 Disfunção.
 Modelo de epilepsia por pilocarpina.

DANIEL MATOVU

DIFERENÇAS NA EVOLUÇÃO DAS CRISES EPILÉPTICAS E NA DISTRIBUIÇÃO TOPOGRÁFICA DO DANO TECIDUAL ENTRE RATOS MACHOS E FÊMEAS SUBMETIDOS AO MODELO DE PILOCARPINA.

Presidente da banca: Prof. Dr. Esper Abrão Cavalheiro

Banca examinadora:

- Prof. Dr. Fernando Cendes
- Prof. Dra. Elza Marcia Yacubian
- Prof. Dr. João Pereira Leite
- Prof. Dr. Jean Faber Ferreira de Abreu
- Prof. Dr. Esper Abrão Cavalheiro

Suplente:

- Prof. Dra. Marly de Albuquerque
- Prof. Dra. Debora Amado Scerni
- Aprovada em: / /2021

Esta tese foi realizada na Disciplina de Neurociência do Departamento de Neurologia e Neurocirurgia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, durante o Programa de Pós-Graduação em Neurologia-Neurociência, com auxílio financeiro da CAPES, FAPESP e CNPq. O autor foi bolsista do CNPq. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROLOGIA/NEUROCIÊNCIA

Chefe do Departamento de Neurologia e Neurocirurgia:

Prof. Dr. Denis Bernardi Bichuetti.

Coordenador do Curso de Pós-graduação em Neurologia e Neurociências:

Prof. Dr. Gilmar Fernandes do Prado.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à tia **Joy**, que há muitos anos luta contra a epilepsia e a todos os pacientes com epilepsia com comorbidades psiquiátricas"

"Nossa motivação para a ciência pode ser impulsionada pela dor de nossos pacientes"

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Esper Abrão Cavalheiro:** pela confiança, pelos ensinamentos, pela amizade, pelos incentivos e sobre tudo pela orientação profissional e pessoal.

Ao **Profa. Dra. Célia Harumi Tengan:** por ter facilitado minha atuação no Programa de Pós-Graduação

Aos professores da Disciplina de Neurociência.

Aos funcionários, técnicos e alunos da Disciplina de Neurociência.

Às agências de fomento CNPq, FAPESP, CAPES e INNT pelo apoio financeiro.

"Enquanto nosso cérebro for um mistério,

o universo,

o reflexo da estrutura do cérebro

também será um mistério"

Santiago de Ramón y Cajal

SUMÁRIO

DI	EDICATÓRIA	v					
A	GRADECIMENTOS	vi					
sι	UMÁRIO	viii					
LI:	ISTA DE FIGURAS	x					
LI:	ISTA DE ABREVIATURAS	xii					
RE	ESUMO	xiii					
A	BSTRACT	xiv					
1.	. INTRODUÇÃO						
	1.1 Epilepsia e epidemiologia	1					
	1.2 Comorbidades na epilepsia	2					
	1.3 Distúrbios comportamentais no modelo de epilepsia da pilocarpina						
	1.4 Vias do circuito límbico-olfatório implicadas em distúrbios comportamentais						
	1.5 Padrões de crises recorrentes						
	1.6 Influência do sexo e das variáveis hormonais na epilepsia						
	1.7 Papéis da neuroinflamação na epilepsia	18					
2.	. JUSTIFICATIVA	21					
3.	. OBJETIVOS	22					
	3.1 Geral	22					
	3.2 Específicos	22					
4.	I. MATERIAIS E MÉTODOS						
	4.1 Declaração ética	23					
	4.2 Animais e grupos experimentais						
	4.3 Citologia Vaginal						
	4.4 Modelo de epilepsia por pilocarpina						
	4.5 Vídeo-monitoramento das crises epilépticas						
	4.6 Método fracionador isotrópico						
	4.7 Análise Estatística	27					
5.	. RESULTADOS						
	5.1 Indução do modelo de epilepsia da pilocarpina						
	5.2 Caracterização das crises epilépticas na fase crônica do modelo da pilocarpina	29					

5.4 Número total de células neuronais		5.3 Peso das estruturas cerebrais (bulbo olfatório, amígdala e formação hipocampal)	34
5.5 Número total de células não neuronais 43 6. DISCUSSÃO 47 6.1 Relevância e contribuição para a compreensão dos distúrbios comportamentais que acompanham as epilepsias 51 7. CONCLUSÕES 53 8. REFERÊNCIAS 54 9. ANEXO 68		5.4 Número total de células neuronais	38
 DISCUSSÃO		5.5 Número total de células não neuronais	43
 6.1 Relevância e contribuição para a compreensão dos distúrbios comportamentais que acompanham as epilepsias	6.	. DISCUSSÃO	47
7. CONCLUSÕES		6.1 Relevância e contribuição para a compreensão dos distúrbios comportamentais que aco as epilepsias	ompanham 51
8. REFERÊNCIAS	7.	. CONCLUSÕES	53
9. ANEXO	8.	. REFERÊNCIAS	54
	9.	. ANEXO	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Circuito neural básico no bulbo olfatório de roedores05
Figura 2: Diagrama esquemático do bulbo olfatório e conexões corticolímbicas10
Figura 3. Período latente de ratos epilépticos machos e fêmeas induzido pelo modelo de
epilepsia da pilocarpina26
Figura 4. Número de crises recorrentes em ratos epilépticos machos e fêmeas durante
a fase crônica do modelo da pilocarpina27
Figura 5. Duração das crises epilépticas espontâneas (segundos) para ratos epilépticos
machos e fêmeas . * p <0,05 para
significância28
Figura 6. Frequência de crises epilépticas agrupadas (mais de duas crises reentrantes
em 24 hs) em ratos machos e fêmeas com epilepsia29
Figura 7. Intensidade das crises epilépticas observadas nos ratos epilépticos machos
e fêmeas
Figura 8. Distribuição das crises epilépticas recorrentes a cada 24 horas durante o
período de 3 meses31
Figura 9. Massa (em gramas) do cérebro total de ratos Wistar epilépticos machos e
fêmeas em comparação aos respectivos controles32

Figura	10.	Massa	(em	gramas) d	o hipoca	mpo de	ratos	Wistar	epilépti	cos m	achos e
fêmeas		em	cor	mparação	com	OS	re	spectiv	os	grupos	s de
controle											33
Figura '	11.1	Massa (em gi	ramas) da a	mígdala	de ratos	Wista	r epilép	ticos ma	ichos e	e fêmeas
em com	para	ação co	m os	respectivo	s grupos	de conti	role				34
Figura	12.	Massa	(em g	gramas) do	bulbo olf	atório d	e ratos	s Wista	[.] epilépt	icos m	nachos e
fêmeas	em	compar	ação	com os res	spectivos	grupos	de cor	ntrole			35
Figura ⁻	13.	Número	de n	eurônios (e	em milhõe	es) na fo	ormaçã	io hipoc	ampal o	de rato	s Wistar
epiléptic	cos i	machos	e fêr	meas e resp	pectivos o	controles	S				36
Figura	14.	Númer	o de	células ne	uronais (em milł	nões)	na amí	gdala d	e rato	s Wistar
epiléptic	cos i	machos	e fêr	meas e resp	oectivos o	controles	S				
Figura ⁻	15.	Número	de c	élulas neur	onais (en	n milhõe	es) no l	bulbo o	fatório d	de rato	os Wistar
epiléptic	cos i	machos	e fêr	meas e resp	oectivos o	controles	S				39
Figura	16.	Númerc	de c	élulas não	neuronai	s (em m	nilhões) na for	mação	hipoca	ımpal de
ratos W	istai	r epilépt	icos	machos e f	êmeas e	respecti	vos co	ontroles			41
Figura	17.	Número	de c	élulas não	neuronai	s (em m	ilhões) na am	ígdala o	de rato	s Wistar
epiléptio	cos i	machos	e fêr	meas e resp	oectivos o	controles	S				42
Figura '	18.1	Número	de ce	élulas não r	euronais	(em mil	hões)	do bulb	o olfatór	io de fo	ormação
hipocan	npal	de rato	s Wis	star epilépti	cos mach	nos e fêr	neas e	e respec	tivos co	ontrole	s43

LISTA DE ABREVIATURAS

- AMPA ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiônico
- ER receptor de estradiol
- GABA ácido gama-aminobutírico
- KA ácido kainico
- PME modelo pilocarpina de epilepsia
- M milhões
- NMDA N-Metil-d-aspartato
- OFC córtex orbitofrontal
- **OR** receptores olfativos
- S segundos
- SE Status epiléptico
- SRS convulsões recorrentes espontâneas
- TLE epilepsia do lobo temporal

RESUMO

O bulbo olfatório no nível sensorial e do circuito transmite informações aos sistemas límbico e cortical para saídas comportamentais, e a interrupção de tais circuitos induz distúrbios comportamentais em roedores. Anteriormente, dados de nosso laboratório mostraram a ocorrência de distúrbios comportamentais em ratos Wistar submetidos ao modelo de epilepsia por pilocarpina (PME) e que essas alterações estavam relacionadas ao sexo. Aqui, aprofundamos nossos achados de que diferenças significativas ligadas ao sexo nas principais estruturas e padrões de convulsões epilépticas de longo prazo: ratos machos e fêmeas demonstraram diferenças de redução de massa de 41,8% na amígdala e 18,2% no bulbo olfatório, enquanto hipocampo, amígdala e a perda neuronal olfatória e a morte de células não neuronais variaram entre (7-21%), respectivamente. Além disso, ratos machos epilépticos exibiram um aumento gradual na duração e gravidade das crises e mostraram menos crises durante os ciclos de claro / escuro por dia ao longo do período, enquanto as mulheres epilépticas mostraram um aumento significativo na frequência das crises e grupos de crises nos primeiros meses quando comparados durante o período de 3 meses. Ao todo, nosso estudo sugere que a morte de células neuronais e não neuronais no bulbo olfatório pode interferir nos padrões diferenciais de convulsões recorrentes relacionadas ao sexo, disfunção do circuito límbico e distúrbios comportamentais na PME. Por último, o modelo de epilepsia da pilocarpina fornece uma ferramenta baseada em evidências para estudar os mecanismos da disfunção do circuito límbico na epileptogênese que pode fornecer futuros insights terapêuticos em nossa busca para melhorar a vida das pessoas com epilepsia.

ABSTRACT

The olfactory bulb at the sensory and circuit level transmits information to the limbic and cortical systems for behavioral outputs, and disruption of such circuits induces behavioral disturbances in rodents. Previously, data from our laboratory showed the occurrence of behavioral disturbances in Wistar rats submitted to the pilocarpine model of epilepsy (PME) and that these alterations were sex related. Here we deepen our findings that significant sex-linked differences in major structures and patterns of longterm epileptic seizures: male and female rats demonstrated mass reduction differences of 41.8% in the amygdala and 18.2% in the olfactory bulb, while hippocampus, amygdala and olfactory neuronal loss and non-neuronal cell death ranged between (7-21%) respectively. In addition, epileptic male rats exhibited a gradual increase in seizure duration and severity and showed less seizures during the light/dark cycles per day throughout the period, whereas epileptic females showed a significant increase in seizure frequency and seizure clusters in the first months when compared during the 3-month period. Altogether, our study suggests that neuronal and non-neuronal cell death in olfactory bulb may interfere with sex-related differential recurrent seizure patterns, limbic circuit dysfunction, and behavioral disturbances in PME. Lastly, the pilocarpine epilepsy model provides an evidence-based tool to study mechanisms of limbic circuit dysfunction in epileptogenesis that may provide future therapeutic insights in our quest to improve the life of people with epilepsy.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epilepsia e epidemiologia

A epilepsia é um distúrbio cerebral com características eletroclínicas e a ocorrência de crises recorrentes não evocadas, frequentemente associadas a morbidade psicológica significativa e outras complicações (DEVINSKY; VEZZANI; O'BRIEN; JETTE et al., 2018; GOLDBERG; COULTER, 2013). Globalmente, cerca de 65 milhões de pessoas vivem com epilepsia e dessas 60% tem epilepsia do lobo temporal (BEGHI; GIUSSANI; NICHOLS; ABD-ALLAH et al., 2019). A prevalência da epilepsia nos países desenvolvidos varia de 4 a 10 casos por 1.000 (BELLINI; POLICARDO; ZACCARA; PALUMBO et al., 2017). Estudos em países tropicais e em desenvolvimento relatam taxas de prevalência de epilepsia mais altas, variando de 14 a 57 casos por 1.000 pessoas (LEVIRA; THURMAN; SANDER; HAUSER et al., 2017). As maiores taxas de prevalência de epilepsia nos países em desenvolvimento são, provavelmente, devidas, entre outros, a aspectos relacionados à qualidade do diagnóstico clínico, ausência de tratamento farmacológico adequado ou associados a questões metodológicas desses estudos (WAGNER; BOTTOMLEY; NGUGI; IBINDA et al., 2015). Embora não tenhamos conseguido encontrar a prevalência real da epilepsia do lobo temporal

no Brasil, a prevalência da epilepsia na região é de cerca de 230 - 280 por 100.000 habitantes (BEGHI; GIUSSANI; NICHOLS; ABD-ALLAH *et al.*, 2019). A prevalência e a incidência de epilepsia são ligeiramente maiores em homens em comparação com mulheres e tendem a aumentar em idosos, devido à maior frequência de acidente vascular cerebral, doenças neurodegenerativas e tumores nessa faixa etária que podem contribuir para a patologia da epilepsia (BEGHI, 2020).

1.2 Comorbidades na epilepsia

Vários estudos sobre comorbidades relacionadas à epilepsia indicam que há diferenças de gênero nessas manifestações. Por exemplo, a depressão major é predominante em pacientes do sexo feminino, enquanto os transtornos de ansiedade são mais comuns em homens (KANNER; RIBOT; MAZARATI, 2018; MAZARATI, 2019). Existe uma conexão entre epilepsia, depressão e ansiedade. No entanto, depressão e transtornos de ansiedade em pessoas com epilepsia não têm sido foco primordia no campo da pesquisa e tratamento da epilepsia, embora muitos estudos epidemiológicos recentes tenham encontrado alta prevalência de depressão e ansiedade em pacientes com epilepsia (TEGEGNE; MOSSIE; AWOKE; ASSAYE et al., 2015). Esses estudosindicam que 9-37% dos pacientes epilépticos sofriam de depressão e 11-25% sofriam de ansiedade, incidência superior àquelas encontradas em pacientes sem epilepsia (LABUDDA; ILLIES; BIEN; NEUNER, 2018). Em estudo populacional de longo prazo (VONCK; BOON, 2015) observaram que astaxas de depressão e ansiedade são próximas àquelas da epilepsia refratária ao tratamento medicamentoso. Apesar dos

grandes avanços na compreensão e tratamento da epilepsia refratária, questões relacionadas à depressão e à ansiedade em pacientes com epilepsia permanecem pouco documentadas e esclarecidas (RUDZINSKI; MEADOR, 2013). A prevalência de depressão ou ansiedade é maior na epilepsia refratária, especialmente, na epilepsia do lobo temporal do que na população geral de pacientes com epilepsia (JANSEN; FRANCOMME; VIGNAL; JACQUOT *et al.*, 2019). Depressão e ansiedade estão associadas ao suicídio, ideação suicida e estigmatização em pessoas que vivem com epilepsia (WIGG; FILGUEIRAS; GOMES MDA, 2014).

1.3 Distúrbios comportamentais no modelo de epilepsia da pilocarpina

Os distúrbios comportamentais também foram estudados na epilepsia experimental. Nosso grupo observou que ratos machos e fêmeas submetidos ao modelo de epilepsia da pilocarpina apresentam alterações comportamentais, tais como: o comportamento materno é alterado em ratas epilépticas que podem até canibalizar seus filhotes enquanto ratos epilépticos machos são agressivos e apresentam hipossexualidade (AMADO; CAVALHEIRO, 1998; AMADO; CAVALHEIRO; BENTIVOGLIO, 1993; BERZAGHI MDA; AMADO; CAVALHEIRO, 1987; LIMA; VALE; ARGANÃRAZ; VARELLA *et al.*, 2010; VALENTE; NAFFAH-MAZZACORATTI; PEREIRA; SILVA *et al.*, 2002). Outras anormalidades comportamentais encontradas em camundongos e ratos submetidos ao modelo de pilocarpina incluem ansiedade (GRÖTICKE; HOFFMANN; LÖSCHER, 2007; LOPES; LOPES; SANTOS; COSTA *et al.*, 2016) e comportamento do tipo depressivo (MAZARATI; SIDDARTH; BALDWIN; SHIN *et al.*, 2008; PENG; DING; LI; FAN *et al.*, 2016).

1.4 Vias do circuito límbico-olfatório implicadas em distúrbios comportamentais

Curiosamente, distúrbios comportamentais e alterações morfológicas semelhantes nos circuitos límbicos também foram observados em ratos com bulbectomia olfatória (JINDAL; MAHESH; BHATT, 2015; YUAN; CHEN; NI; WANG et al., 2020). O bulbo olfatório do rato é uma parte crucial da rede neuronal, cuja modalidade sensorial determina a sobrevivência imediata de um indivíduo por meio de atividades como busca de alimento, reconhecimento de predadores, interação social, reprodução e vários outros aspectos do comportamento (ENNIS; PUCHE; HOLY; SHIPLEY, 2015). Os neurônios presentes no bulbo olfatório formam diversas conexões com várias estruturas do cérebro (MCGANN, 2017). Por meio de conexões eferentes com a amígdala e o hipocampo, o bulbo olfatório envia informações às estruturas límbicas onde ocorre a modulação e a orquestração da resposta emocional e comportamental (ENNIS; PUCHE; HOLY; SHIPLEY, 2015). É impressionante notar a importância dos estímulos olfativos para a relação entre mães roedoras e seus descendentes. Na verdade, uma reorganização extensa do circuito e neurogênese ocorrem no bulbo olfatório e estruturas associadas durante a gravidez, parto e puerpério de ratas e camundongos fêmeas (BELNOUE; MALVAUT; LADEVEZE; ABROUS et al., 2016; LEUNER; SABIHI, 2016).



Figura 1. Circuito neural básico do bulbo olfatório de roedores. (A) O bulbo olfatório (OB) está na porção mais anterior do telencéfalo do roedor. O bulbo olfatório acessório (AOB), que recebe a informação feromonal do órgão vomeronasal, está localizado no OB posterodorsal. (B) Os axônios OSN correm tangencialmente à superfície do MOB dentro da camada do nervo olfatório (ONL), antes de entrar nos glomérulos. Os soma das células mitrais (M) e das células em tufo (T) estão localizados na camada celular mitral (MCL) e na camada plexiforme externa (EPL), respectivamente, e projetam seus dendritos primários para um único glomérulo. No glomérulo, os axônios OSN formam sinapses axodendríticas com células mitrais e em tufo, bem com células periglomerulares (PG). Os dendritos secundários das células mitrais e em tufo formam sinapses dendrodendríticas com células granulares (G) no EPL. O soma das células periglomerulares são encontrados na camada glomerular (GL) e na camada de células granulares (GCL), respectivamente. IPL, camada plexiforme interna. Copiado e adaptado de (IMAMURA; ITO; LAFEVER, 2020).

Embora as áreas cerebrais olfatórias a montante (epitélio olfatório e bulbo olfatório) sejam bem estudadas, pouco se sabe sobre as alterações nas áreas cerebrais-alvo (WANG; CHEN; CHEN; LI *et al.*, 2020) e o papel que desempenham na geração de comportamentos conduzidos por odores e lesões na epilepsia. Elucidar os circuitos neurais relacionados às lesões subjacentes aos comportamentos conduzidos por odores dos roedores é muito importante para a nossa compreensão da epilepsia (SARNAT; FLORES-SARNAT, 2016).

Embora a circuitaria cerebral do rato e do ser humano sejam bastante distintas, quer pelo número de células (neurônios e células da glia) ou pela importância filogenética de cada área, os estudos animais oferecem oportunidade de relacionar distúrbios anátomo-funcionais dessa circuitaria com os distúrbios comportamentais decorrentes, os quais podem ter importância translacional (JOHNSON; YOUNG, 2018). Além disso, no nível molecular, famílias de proteínas receptoras expressas pelos neurônios sensoriais olfativos são comparáveis na maioria dos mamíferos (SALAZAR; SANCHEZ-QUINTEIRO; BARRIOS; LÓPEZ AMADO *et al.*, 2019), aumentando nossa compreensão nas vias epilépticas.

O sistema olfativo é de particular relevância para a neurociência de sistemas devido à grande variedade de estímulos que precisam ser codificados (GRABSKA-BARWIŃSKA; BARTHELMÉ; BECK; MAINEN *et al.*, 2017). Além disso, os estímulos olfativos podem desencadear uma ampla gama de comportamentos relacionados à reprodução, apetite, medo e ansiedade, que permitem o estudo dos circuitos cerebrais que estão envolvidos na geração desses comportamentos essenciais (PERETTO; SCHELLINO; DE MARCHIS;

FASOLO, 2014). Finalmente, os padrões de atividade evocada por odores podem ser prontamente registrados em várias estruturas do sistema olfatório, como no epitélio e no bulbo olfatório para, posteriormente, acessarem regiões corticolímbicas em roedores (COELHO; COSTANZO, 2016).

O sistema olfatório pode detectar uma ampla gama de compostos solúveis que induzem, ou contribuem para, comportamentos cruciais para a sobrevivência, como alimentação, reprodução, interação social e alertas para a presença de predadores (BAUM; CHERRY, 2015).

O bulbo olfatório é a estrutura do cérebro que recebe a grande maioria dos estímulos oriundos dos receptores e neurônios sensoriais através do nervo olfatório (STORACE; COHEN, 2017). No rato, o bulbo olfatório é composto por vários neurônios organizados em quatro camadas concêntricas. Do superficial ao profundo, são eles: (1) camada de fibras olfatórias primárias, formada pelos axônios do neurônio sensorial olfatório; (2) camada glomerular, contendo módulos esféricos de neurópilos denominados glomérulos; (3) camada celular externa, consistindo do soma de células mitrais e tufadas; e (4) camada celular interna, contendo corpos celulares de diferentes interneurônios, principalmente, das células justaglomerulares, periglomerulares e granulares (NAGAYAMA; HOMMA; IMAMURA, 2014).

Células glutamatérgicas mitrais e tufadas são as células principais do bulbo olfatório (BURTON; URBAN, 2014). No rato, os dendritos apicais das células

mitrais recebem estímulos oriundos dos neurônios sensoriais olfatórios e se projetam para o sistema límbico (BOURNE; SCHOPPA, 2017). As células em tufos não são inervadas pelos neurônios sensoriais olfatórios. No entanto, elas recebem contatos sinápticos das células mitrais e interneurônios bulbares (LIU; FROUDARAKIS; PATEL; KOCHUKOV *et al.*, 2019).

Os interneurônios estão localizados mais profundamente no bulbo olfatório (KIM; CHOE, 2020). Eles medeiam as interações laterais dentro dos neurônios bulbares (NAGAYAMA; HOMMA; IMAMURA, 2014). A proporção de interneurônios para células mitrais é de 100: 1 em ratos (HUANG; GARCIA; JEN; ARENKIEL, 2013). As células granulares GABAérgicas estão localizadas na camada interna do bulbo olfatório e estendem seus processos para fazer conexões sinápticas dendrodendríticas com as células principais (BARTEL; RELA; HSIEH; GREER, 2015; PRESSLER; STROWBRIDGE, 2017).

As células justaglomerulares e periglomerulares estão apostas aos glomérulos e expressam glutamato e dopamina, respectivamente, além do GABA (BYWALEZ; ONA-JODAR; LUKAS; NINKOVIC *et al.*, 2016).

Cada glomérulo recebe entrada convergente de neurônios sensoriais olfatórios que expressam o mesmo receptor de odor (KASS; MOBERLY; MCGANN, 2013). Os receptores de odor individuais respondem a diferentes odores e um determinado odor geralmente ativa vários receptors (MCCLINTOCK; WANG; SENGOKU; TITLOW *et al.*, 2020). Como consequência, a estimulação do odor ativa conjuntos de glomérulos espacialmente distribuídos. Os glomérulos que respondem a odores com características moleculares semelhantes são organizados em zonas definidas dentro do bulbo olfatório, formando mapas quimiotópicos (MA; QIU; GRADWOHL; SCOTT *et al.*, 2012). No entanto, os odorantes freqüentemente ativam os glomérulos além de seu domínio quimiotópico. Como consequência, os odorantes são representados como mapas fraturados no bulbo olfatório (VINCIS; GSCHWEND; BHAUKAURALLY; BEROUD *et al.*, 2012). Características químicas de primeira ordem, como categorias moleculares, são codificadas por grandes domínios glomerulares (MA; QIU; GRADWOHL; SCOTT *et al.*, 2012). Características de segunda ordem, como comprimento da cadeia de carbono ou ramificação, são codificadas por diferenças locais de padrões de atividade glomerular dentro de domínios quimiotópicos (FURUDONO; CRUZ; LOWE, 2013). Mapas quimiotópicos são, portanto, organizados hierarquicamente de forma que mapas secundários estejam aninhados dentro de mapas primários (MA; QIU; GRADWOHL; SCOTT *et al.*, 2012; TJØSTHEIM; BALKENIUS, 2019).

Em ratos, a serotonina e a acetilcolina aumentam a atividade dos interneurônios enquanto reduzem a excitabilidade das células principais do bulbo olfatório (OSINSKI; KIM; XIAO; MEHTA *et al.*, 2018). A noradrenalina aumenta a potenciação pós-sináptica de longo prazo evocada pela estimulação tetânica das sinapses célula-grânulo mitral (NUNEZ-PARRA; MAURER; KRAHE; SMITH *et al.*, 2013). Além disso, as fibras centrífugas originárias do córtex terminam na camada celular interna do bulbo olfatório de roedores, provavelmente fazendo contato sináptico com células granulares, levantando a possibilidade de que o feedback cortical modula a rede bulbar (BOYD; STURGILL; POO; ISAACSON, 2012). No



Figura 2: Diagrama esquemático do bulbo olfatório e suas conexões corticolímbicas. Os axônios de neurônios de retransmissão mitrais e em tufo do bulbo olfatório projetam-se através do trato olfatório lateral para o córtex olfatório. O córtex olfatório consiste em diversas áreas distintas, sendo o córtex piriforme a maior delas. A partir dessas áreas, a informação olfatória é transmitida para outras áreas encefálicas, direta ou indiretamente, via tálamo. Áreas-alvo incluem áreas do neocórtex frontal e orbitofrontal, que acreditase serem importantes para a discriminação de odores; amígdala e hipotálamo que podem estar envolvidos nas respostas emocionais e fisiológicas aos odores. Células mitrais no bulbo olfatório acessório projetam-se para áreas específicas da amígdala que transmitem sinais para o hipotálamo. Copiado e adaptado de (WOLPERT; PEARSON; GHEZ; KANDEL *et al.*, 2013).

entanto, mais estudos são necessários para elucidar o papel fisiológico desses neuromoduladores nos circuitos neurais bulbar.

As células mitrais estendem seus axônios através dos tratos olfatórios medial e lateral para diferentes centros cerebrais superiors (NAGAYAMA; HOMMA; IMAMURA, 2014). O bulbo olfatório envia informações olfativas para serem posteriormente processadas na amígdala, no córtex orbitofrontal (OFC) e no hipocampo, onde desempenham papel na emoção, memória e aprendizagem (KADOHISA, 2013). O bulbo olfatório principal se conecta à amígdala através do córtex piriforme e áreas específicas do bulbo olfatório se projetam para áreas específicas da amígdala (ZHOU; LANE; COOPER; KAHNT et al., 2019). A amígdala passa informações olfativas para o hipocampo. O córtex orbitofrontal, amígdala, hipocampo, tálamo e bulbo olfatório têm muitas interconexões, diretas e indiretas, através do córtex olfatório primário (SARNAT; FLORES-SARNAT, 2016). Essas conexões são indicativas da associação entre o bulbo olfatório e áreas superiores de processamento, especificamente aquelas relacionadas à emoção e à memória (LI: RAO: ZHOU: RESTREPO, 2020). O trato olfatório lateral contém principalmente fibras originárias do bulbo olfatório lateral, enquanto o trato olfatório medial contém principalmente fibras originadas do bulbo olfatório medial (NAGAYAMA; HOMMA; IMAMURA, 2014). Estudos com traçadores anatômicos mostraram que o trato olfatório medial é subdividido em regiões medial e lateral. A parte lateral do trato olfatório medial é composta em grande parte por fibras centrífugas projetando-se para o bulbo olfatório, enquanto a parte medial do trato olfatório medial, bem como o trato olfatório lateral, contém axônios de células mitrais que se projetam para o sistema límbico através da amígdala até o hipocampo (PADMANABHAN; OSAKADA; TARABRINA; KIZER *et al.*, 2016).

O sistema corticolímbico desempenha um papel crítico na regulação dos comportamentos afetivos e é altamente conservado em todas as espécies de mamíferos (JANAK; TYE, 2015). No início da vida, a maturação das regiões corticolímbicas, como o hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal, coincide com mudanças em vários domínios cognitivos, incluindo memória, tomada de decisão, e processamento de ameaças e recompensas (RUBIN; SCHWARB; LUCAS; DULAS et al., 2017). O sistema corticolímbico também está fortemente implicado na etiologia e patogênese dos distúrbios comportamentais, como depressão, ansiedade e transtornos relacionados ao medo, que apresentam altas taxas de incidência no início da vida e diferenças sexuais proeminentes na prevalência de morbidades psicológicas (FARRELL; SENGELAUB; WELLMAN, 2013). Além disso, a exposição a adversidades no início da vida aumenta o risco de desenvolver muitos desses transtornos na idade adulta, sublinhando uma forte ligação entre o sistema corticolímbico no início da vida, estresse e transtornos mentais (GORKA; HANSON; RADTKE; HARIRI, 2014). Muitos estudos examinaram as mudancas nas regiões corticolímbicas, mas eles se concentraram principalmente em animais do sexo masculino. Embora diferenças sexuais e distúrbios comportamentais tenham sido amplamente relatados (BOLLINGER; COLLINS; PATEL; WELLMAN, 2017; MUTLU; SCHNEIDER; DEBBANÉ; BADOUD et al., 2013), pouco se sabe se eles podem ser atribuídos a diferenças hormonais e / ou trajetórias do sistema corticolímbico na epilepsia. Consequentemente, compreender as mudanças nos circuitos límbicos em ambos os sexos terá implicações cruciais para elucidar como as lesões cerebrais decorrentes da atividade epiléptica poderiam contribuir para a ocorrência de comorbidades psicológicas na epilepsia.

Por último, a relevância do comportamento materno em relação aos filhotes e a influência das diferenças sexuais na epilepsia não podem ser superestimadas. Estudos experimentais anteriores e recentes mostram mudanças sequenciais, como diminuição das crises epilépticas durante a gravidez, alterações hormonais de progestrona e estrogênio e interrupção dos cuidados maternos e recuperação do filhote na epilepsia (AMADO; CAVALHEIRO; BENTIVOGLIO, 1993; BERZAGHI MDA; AMADO; CAVALHEIRO, 1987; GODOY; GARCIA-CAIRASCO, 2021). É digno de nota, as mudanças sequenciais que ocorrem em ratas epilépticas demonstram provável envolvimento de lesões estruturais que participam do cuidado e comportamento materno, essas estruturas incluem o bulbo olfatório, amígdala e hipocampo. A compreensão dessas mudanças estruturais é desejada e justifica um estudo para saber a extensão dos danos da lesão no modelo de epilepsia com pilocarpina.

1.5 Padrões de crises recorrentes

Os circuitos epilépticos, independentemente do mecanismo subjacente, levam a um desequilíbrio entre a atividade excitatória do glutamato e inibitória do GABA (PAZ; HUGUENARD, 2015). Esse desequilíbrio parece estar associado a alterações que contribuem, direta ou indiretamente, para a disfunção límbica e distúrbios comportamentais observados no modelo de epilepsia por pilocarpina. Convulsões recorrentes são a marca registrada da manifestação comportamental da epilepsia do lobo temporal (CERSÓSIMO; FLESLER; BARTULUCHI; SOPRANO *et al.*, 2011). Estudos no modelo de epilepsia da pilocarpina mostraram que as crises límbicas causam danos neuronais e interrupção de circuitos límbicos (TURSKI; CAVALHEIRO; SCHWARZ; CZUCZWAR *et al.*, 1983; WULSIN; FRANCO-VILLANUEVA; ROMANCHECK; MORANO *et al.*, 2018). Diferentes linhas de evidência relataram que a caracterização mecanicista das crises recorrentes é mal compreendida e carente de estudos que levem em conta a diferença entre os sexos na epilepsia (SAMBA REDDY, 2017; SCHARFMAN; MACLUSKY, 2014). Além disso, claramente não entendemos como a morte neuronal e a reorganização dos circuitos presentes no cérebro epiléptico podem induzir distúrbios comportamentais em ratos machos e fêmeas .

Estudos experimentais têm caracterizado as crises epilépticas e recorrentes observadas no modelo da pilocarpina, mas a maioria dos estudos são realizados em animais machos, sem mostrar discrepâncias abrangentes entre as crises no modelo de epilepsia da pilocarpina entre os sexos (ARIDA; SCORZA; PERES; CAVALHEIRO, 1999; GOFFIN; NISSINEN; VAN LAERE; PITKÄNEN, 2007; TURSKI; IKONOMIDOU; TURSKI; BORTOLOTTO *et al.*, 1989).

O padrão de ocorrência de crises epilépticas em animais não tratados no modelo de pilocarpina mostrou que há um processo de maturação nos estágios iniciais e este processo acelerador pode ser de valor preditivo para o tratamento da epilepsia de como a atividade epiléptica progride no cérebro epiléptico (ARIDA; SCORZA; PERES; CAVALHEIRO, 1999).

Estudos anteriores, através de vídeo-monitoramento ou mesmo através da observação visual, mostrou alto grau de reprodutibilidade no modelo da pilocarpina no que diz respeito ao período de latência e frequência das crises epilépticas. Foi observado que o período de latência variou entre 10 e 18 dias e que os animais apresentavam entre 1 a 2 crises por dia durante um longo período de tempo (ARIDA; SCORZA; PERES; CAVALHEIRO, 1999; GOFFIN; NISSINEN; VAN LAERE; PITKÄNEN, 2007).

Além disso, observou-se que as primeiras crises recorrentes eram predominantemente do tipo focal. Progressivamente, a indicência de generalização secundária aumentava e este padrão permanecia durante todo o tempo de estudo (ARIDA; SCORZA; PERES; CAVALHEIRO, 1999; GOFFIN; NISSINEN; VAN LAERE; PITKÄNEN, 2007).

1.6 Influência do sexo e das variáveis hormonais na epilepsia

Existe uma interdependência bidirecional e complexa entre os hormônios esteróides sexuais e a epilepsia, isto é, os hormônios influenciam as crises epilépticas e essas interferem com a produção e liberação hormonais (VELÍŠKOVÁ; DESANTIS, 2013). Os hormônios esteróides sexuais femininos e masculinos influenciam a excitabilidade do cérebro. Em relação aos hormônios esteróides sexuais femininos, a progesterona e seus metabólitos são atuam como

agentes anticonvulsivantes, enquanto os estrogênios são principalmente próconvulsivantes (ALAM; AHMAD; AL-ABBASI; AHMAD, 2013). Há fortes indicações de que as flutuações mensais nos níveis hormonais de estrogênio e progesterona sejam a base da epilepsia catamenial (AMADO; CAVALHEIRO, 1998). Os andrógenos são principalmente anticonvulsivantes, mas os efeitos são mais variados, provavelmente devido aos efeitos de seus metabólitos (LUEF; MADERSBACHER, 2015).

Os mecanismos envolvidos no efeito excitatório dos estrogênios são complexos e, em algumas circunstâncias, a ação dos estrogênios em alguns de seus receptores podem até ser anticonvulsivantes (VELÍŠKOVÁ; DESANTIS, 2013). Os estrogênios, como os demais hormônios esteróides sexuais, exercem seus efeitos via receptores intracelulares, os receptores de estrogênio ERa e ERb, dos quais o efeito deste último é o mais importante para os efeitos não reprodutivos do hormônio (FRYE; RYAN; RHODES, 2009). Alguns experimentos descobriram que baixas doses de estrogênio podem realmente reduzir as convulsões agindo no ERb, e a exposição a longo prazo ao estrogênio pode diminuir a suscetibilidade a crises induzidas por cainato (VELÍSKOVÁ; VELÍSEK, 2007).

Em geral, entretanto, o efeito dos estrogênios deve ser considerado excitatório (AMADO; CAVALHEIRO, 1998). Importante para o efeito geralmente excitatório é a capacidade dos neurônios de responder rapidamente ao efeito excitatório do glutamato (SMITH; WOOLLEY, 2004). Acredita-se que este efeito potencializador ocorra por sua ação nos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA),

mas também sobre os receptores de glutamato não-NMDA (SMITH; WATERHOUSE; WOODWARD, 1988; SMITH; WOOLLEY, 2004).

Os mecanismos pelos quais a progesterona e seus metabólitos exercem seus efeitos sobre a excitabilidade cerebral são, como para os estrogênios, também por mecanismos clássicos e não clássicos, sendo o último o mais importante. Os receptores de progesterona são amplamente distribuídos no cérebro e a progesterona circulando no sangue ganha acesso rápido e relativamente irrestrito a todas as partes do sistema nervoso (REDDY, 2013a). Além disso, o tecido cerebral contêm a enzima 5a-redutase que é capaz de converter progesterona em alopregnanolona, que tem se mostrado um anticonvulsivante muito eficaz (VELÍŠKOVÁ; DESANTIS, 2013).

Os efeitos dos andrógenos são principalmente anticonvulsivantes, mas o oposto também pode ser o caso. As ações variáveis da testosterona podem ser parcialmente devidas ao seu metabolismo (VELÍSKOVÁ; VELÍSEK, 2007). A testosterona pode ser metabolizada em 17b-estradiol, que geralmente é excitatório, mas também em androstanodiol e dihidrotestosterona, que exercem efeitos antiepilépticos potentes. Os andrógenos também agem claramente em receptores de membrana não clássicos. Vários dos metabólitos androgênicos atuam como moduladores poderosos e positivos do receptor GABA-A (VELÍŠKOVÁ; DESANTIS, 2013). Por exemplo, Reddy e Jian (2010) mostraram que o androstanodiol produziu aumento dependente da concentração das correntes ativadas por GABA (REDDY; JIAN, 2010). Na ausência de GABA, o

androstanodiol teve poucos efeitos diretos nas correntes mediadas pelo receptor GABA-A, mesmo em altas concentrações.

1.7 Papéis da neuroinflamação na epilepsia

Até o momento, não há estudos sobre o papel das diferenças sexuais e da patologia glial na epilepsia de longo prazo. A maioria dos estudos analisa a neuroinflamação em relação à indução SE ou na fase inicial da SRS (LOPIM; VANNUCCI CAMPOS; GOMES DA SILVA; DE ALMEIDA *et al.*, 2016). Uma revisão publicada por Cavalheiro e seu grupo enfatizou a importância de elucidar os mecanismos subjacentes à patologia glial nas formas crônicas de epilepsia (SCORZA; ARIDA; NAFFAH-MAZZACORATTI MDA; SCERNI *et al.*, 2009).

Em resumo, o que acontece durante o SE e a epileptogênese durante a neuroinflamação da epilepsia. Atualmente, há ampla evidência experimental e clínica da teoria inflamatória da epileptogênese e da desregulação das (BERMÚDEZ. 2012: RIZZI: WEISSBERG: MILIKOVSKY: neurotrofinas FRIEDMAN, 2016). A ativação da microglia e da astrogliose contribuem para o processo inflamatório crônico na epilepsia, que danifica os neurônios. A inflamação no sistema nervoso central é baseada na lesão da barreira hematoencefálica (BBB) na TLE (VAN VLIET; ARONICA; GORTER, 2014). As citocinas têm papel central nesse processo, principalmente por serem pró e anticonvulsivantes naturais. A influência das citocinas na transmissão neuronal dos mediadores contribui para o desenvolvimento da hiperexcitabilidade dos neurônios (VEZZANI; BALOSSO; RAVIZZA, 2008). A ativação imune mediada por células e o processo de inflamação induzem a desregulação de um fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), resultando em uma diminuição na neurogênese hipocampal e na neurodegeneração associada à epileptogênese(LAFRANCE; LEAVER; STOPA; PAPANDONATOS *et al.*, 2010).

A inflamação pode causar crises epilépticas recorrentes de várias maneiras. A alteração da neurotransmissão glutamatérgica e GABAérgica pode aumentar a excitabilidade neuronal. As citocinas pró-inflamatórias estão aumentadas em vários modelos animais de epilepsia, e sua ativação versus inativação diminui e aumenta o limiar convulsivo, respectivamente (RAVIZZA; BOER; REDEKER; SPLIET *et al.*, 2006; VEZZANI; BALOSSO; RAVIZZA, 2008). Essas citocinas promovem danos celulares e efeitos excitotóxicos, inibem a captação de glutamato, estimulam os receptores NMDA e reduzem a função do receptor GABA (VEZZANI; BALOSSO; RAVIZZA, 2008).

A inflamação relacionada às crises epilépticas pode contribuir para a perda celular e reorganização sináptica. A epilepsia do lobo temporal está frequentemente associada à expressão aumentada de interleucinas e; IL-1β e receptor de IL tipo 1, astrócitos e microglia (RAVIZZA; GAGLIARDI; NOÉ; BOER *et al.*, 2008).

As células gliais influenciam a função neuronal por seu papel na homeostase do íon extracelular, metabolismo cerebral, barreira hematoencefálica e função imunológica (MIDDELDORP; HOL, 2011), a desregulação das funções gliais pode induzir hiperexcitabilidade. A gliose reativa é uma característica marcante da epilepsia do lobo temporal em humanos e em vários modelos animais. Essa alteração pode ser encontrada examinando a expressão da proteína glial fibrilar ácida (GFAP), um indicador de astrogliose reativa. A astrogliose foi amplamente analisada após a indução do estado de mal epiléptico (BABB; MATHERN; PRETORIUS; CIFUENTES, 1996; FORESTI; ARISI; SHAPIRO, 2011; SCHMIDT-KASTNER; INGVAR, 1996). A degeneração neuronal foi relatada no hilo sete dias após SE e reduziu astrócitos positivos para GFAP no giro denteado 14 dias após SE (KANG; KIM; KWAK; KIM *et al.*, 2006). Da mesma forma, a perda astroglial foi encontrada na região CA1 e córtex entorrinal quatro semanas após SE (KIM; KWAK; CHOI *et al.*, 2008).

Há plausibilidade de dados a respeito da neuroimunodulação em ratas com epilepsia crônica, o entendimento das alterações que ocorrem nas estruturas celulares neuronais e não neuronais da via olfativa-límbica é crucial na epilepsia do lobo temporal.
JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

As comorbidades na epilepsia compartilham mecanismos patogênicos comuns e complexos, cujo mecanismo fisiopatológico é pouco compreendido e precisa ser estudado como parte essencial da pesquisa em epilepsia (KANNER; RIBOT; MAZARATI, 2018; MAZARATI, 2019).

Embora a ocorrência de comorbidades psiquiátricas e comportamentais associadas à epilepsia seja bem conhecida (MULA, 2020), os mecanismos subjacentes a essas comorbidades em humanos e em animais com epilepsia do lobo temporal são mal compreendidos.

Este trabalho é continuum de trabalho de doutorado anterior e dados obtidos sobre distúrbios comportamentais no modelo de epilepsia da pilocarpina que orienta para construir mais conhecimento sobre a nossa compreensão do cérebro epiléptico (AMADO, 1996; BERZAGHI, 1991).

Por último, e devido à importância sensorial e comportamental do bulbo olfatório associada às suas conexões com o sistema límbico, faz-se necessário conhecer como a epilepsia experimental induzida pela pilocarpina pode alterar esta circuitaria e que efeitos tais alterações podem ter sobre o comportamento animal. Tais relações tornam-se mais relevantes quando estudamos os aspectos translacionais das epilepsias.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

O objetivo principal do presente estudo foi compreender se a ocorrência de distúrbios comportamentais em ratos machos e fêmeas submetidos ao modelo de epilepsia pela pilocarpina está relacionada a diferentes padrões da neuropatologia límbica, incluindo o bulbo olfatório e se tais alterações são dependentes do sexo do animal. Compreender as modificações que ocorrem no bulbo olfatório, amígdala e hipocampo subjacentes às crises epilépticas e recorrente de longo prazo é importante na fisiopatologia da epilepsia do lobo temporal e pode avançar nossa compreensão das vias cerebrais epilépticas e nvolvidas nas comorbidades associadas.

3.2 Específicos

Avaliar os padrões das crises epiléptoicas recorrentes entre ratos epilépticos machos e fêmeas no modelo de epilepsia por pilocarpina usando a escala de pontuação de Racine. As seguintes variáveis serão usadas nessa comparação: aspectos gerais da fase aguda, frequência das crises durante o período crônico, duração e intensidade (escala de Racine) de cada crise epiléptica.

Verificar o grau de lesão celular nas 3 estruturas mencionadas (bulbo olfatório, amigdala e hipocampo) nos machos e fêmeas com epilepsia através do método do fracionador óptico.

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Declaração ética

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo (CEUA / UNIFESP) sob o número de referência 8624210118. Todos os experimentos com animais estavam de acordo com as diretrizes internacionais de cuidados com animais (NATIONAL RESEARCH COUNCIL COMMITTEE FOR THE UPDATE OF THE GUIDE FOR THE; USE OF LABORATORY, 2011) e diretrizes ARRIVE para a realização de experimentos in vivo de animais de pesquisa (PERCIE DU SERT; HURST; AHLUWALIA; ALAM *et al.*, 2020).

4.2 Animais e grupos experimentais

Foram utilizados 30 ratos Wistar, constituídos por ratos machos e fêmeas de 210 a 245g que foram agrupados em 4 grupos, a saber: machos controle (n = 5), fêmeas controle (n = 5), machos com epilepsia (n = 10) e fêmeas com epilepsia (n = 10), respectivamente. Os animais foram alojados em grupos de quatro em condições climáticas controladas (ciclo claro-escuro de 12 horas, luzes acesas entre 7h00 e 19h00 e temperatura constante de (19-23 ° C), com livre acesso à água e alimentos.

4.3 Citologia Vaginal

Um conta gotas não invasivo foi introduzido na vagina das ratas Wistar para obtenção do conteúdo vaginal. O conteúdo obtido foi analisado sob microscopia óptica para determinação do padrão do ciclo estral desse animais. Tal exame era realizado a intervalo de 8-10 horas por 4 dias consecutivos (duração do ciclo estral em ratas). Apenas animais com padrão de fase estral típico foram incluídos no estudo e submetidos à administração de pilocarpina (DO VALE; DA SILVA; LIMA; DE LIMA *et al.*, 2010).

4.4 Modelo de epilepsia por pilocarpina

O modelo de epilepsia da pilocarpina representa um paradigma adequado para estudar os mecanismos fisiopatológicos da epilepsia do lobo temporal e tem sido utilizado em inúmeros estudos (CURIA; LONGO; BIAGINI; JONES *et al.*, 2008). Em resumo, ratas Wistar em estro e machos foram pré-tratados com metil escopolamina (Sigma Co.) na dose de 1 mg / kg por via subcutânea para inibir os efeitos colinérgicos sistêmicos da pilocarpina (AMADO; CAVALHEIRO, 1998). Trinta minutos depois, cloridrato de pilocarpina (Sigma Co.) na dose de 330 mg / kg foi injetado por via intraperitoneal para induzir alterações comportamentais e eletrográficas sequenciais progressivas levando a estado de mal epiléptico de longa duração (AMADO; CAVALHEIRO, 1998; TURSKI; CAVALHEIRO; SCHWARZ; CZUCZWAR *et al.*, 1983). Após cinco horas de estado de mal epiléptico, diazepam (Merck) na dose de 10 mg / kg foi administrado por via subcutânea para limitar as crises motoras (LEMOS;

CAVALHEIRO, 1995). Os animais sobreviventes (7 machos e 9 fêmeas) foram alimentados com dieta fracionada especial até a recuperação e, a partir de então, observados através de vídeo-monitoramento. Ratos machos e fêmeas controle foram injetados com metil escopolamina (1 mg / kg, s.c.) seguido, 30 minutos mais tarde, por injeção ip de solução salina (1 ml / kg, i.p.) no lugar da pilocarpina.

4.5 Vídeo-monitoramento das crises epilépticas

Um sistema de vídeo de alta definição (Intelbras VT 4 S 120 HD) foi usado para monitorar, 24h/dia, as crises epilépticas comportamentais nos animais tratados com pilocarpina (LOPIM; VANNUCCI CAMPOS; GOMES DA SILVA; DE ALMEIDA *et al.*, 2016). A observação foi realizadas por três meses após a ocorrência da primeira crise espontânea (SRS). Os seguintes parâmetros foram analisados: : número, duração e intensidade (escala de Racine) das crises recorrentes. Todos os animais sobreviventes do estado de mal epiléptico evoluíram para a fase crônica do modelo.

A distribuição das crises em 24h foi registrada para os períodos claro (07: 00-18: 59h) e escuro (19: 00-06: 59h). A intensidade de cada crise foi classificada de acordo com a escala progressiva proposta por Racine para o kindling da amígdala (RACINE, 1972), a saber: 1. movimentos bucais e faciais; 2. clonias da cabeça; 3. movimentos clônicos das patas anteriores; 4. Movimentos clônicos das patas anteriore e elevação do corpo sob as patas posteriores (rearing); 5. Crise generalizada . De acordo com a literatura (JAFARPOUR; HIRSCH; GAÍNZA-LEIN; KELLINGHAUS *et al.*, 2019),

consideramos agrupamento (cluster) de crises quando o animal apresentava mais de duas crises seguidas num período de 24 horas.

4.6 Método fracionador isotrópico

Este método é usado para quantificar o número de células neuronais e não neuronais no cérebro total ou em áreas selecionadas que tem sido empregado e comparado aos métodos estereológicos clássicos em várias publicações. Esta técnica não precisa de software especial, mas segue os princípios semelhantes usados na análise estereológica para produzir cerca de 100% do número de células no cérebro (HERCULANO-HOUZEL; VON BARTHELD; MILLER; KAAS, 2015).

Resumidamente, ao final do período de observação de 3 meses, todos os animais de cada grupo foram completamente anestesiados com tiopental sódico (80 mg / kg, sc - Tiopentax) e perfundidos transcardialmente com solução tamponada com fosfato (0,01 M - pH 7,4) e, posteriormente, paraformaldeído a 4% em PBS. Seus cérebros foram cuidadosamente removidos e fixados em paraformaldeído a 4% por 24 horas. Em seguida, os cérebros foram separados em três estruturas de interesse: bulbo olfatório, amígdala e formação hipocampal usando fatias de cérebro de rato (1 mm, Kent) fixadas em gelo picado e marcos anatômicos consistentes sob um estereomicroscópio Leica. Os bulbos olfatórios foram separados por corte próximo aos pólos frontais. A formação hipocampal foi cuidadosamente dissecada de cada hemisfério, destacando-a do estriado e do tecido cortical. As amígdalas foram identificadas lateralmente ao hipotálamo e à porção ventral do sulco rinal, permitindo o isolamento da amígdala composta por suas porções basolateral e centromedial (GILBERT; GODBOUT; ROUSSEAU, 2016). Cada estrutura cerebral era dissociada mecanicamente em solução salina com Triton X-100

1% e transformada em suspensão isotrópica de núcleos isolados, mantidos homogêneos por agitação. O número total de células foi estimado pela determinação do número de núcleos em pequenas alíquotas coradas com dicloridrato de marcador de DNA fluorescente 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, 1: 1000; Sigma-Aldrich, D9542) utilizando um microscópio Zeiss Axiovert 100 com objetiva de 40x, utilizando hemocitômetro para quantificação (câmara de Neubauer, Loptik Labor). Para determinar o número de células neuronais e não neuronais, as amostras foram então incubadas com o anticorpo primário contra a proteína nuclear neuronal específica (NeuN, 1: 100; Abcam, ab104225) a 4 ° C durante a noite e, subsequentemente, com anticorpo secundário conjugado para AlexaFluor®488 (Abcam; ab150077) diluído em PBS (1: 200) e soro de cabra normal a 10% (Vector labs, S-1000-20) por 2 h. A fração neuronal em cada amostra foi estimada pela contagem de núcleos marcados com NeuN em pelo menos 500 núcleos corados com DAPI e o número de núcleos não neuronais foi obtido por subtração (HERCULANO-HOUZEL; MOTA; LENT, 2006).

4.7 Análise Estatística

O teste de Shapiro-Wilk foi feito para verificar a normalidade dos dados usando Graph Pad Prism versão 8.4.2 (Graph Pad Software, La Jolla California USA). O teste t não pareado foi usado para analisar a duração do período latente em animais tratados com pilocarpina. Dois ANOVA (medidas repetidas) e o teste post-hoc de Sidak foram realizados para variáveis dependentes de convulsões. ANOVA bidirecional independente e teste post-hoc de Tukey foram realizados em variáveis dependentes: massa, número de neurônios e células não neuronais de estruturas cerebrais. Os dados foram apresentados em média e desvio padrão com nível de significância de 0,05.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Indução do modelo de epilepsia da pilocarpina

O início do estado de mal epiléptico em todos os animais foi observado em média 25 minutos após a administração da pilocarpina (intervalo de 15-37,8 minutos). Ratos Wistar machos e fêmeas foram expostos a 5 horas de status epilepticus (SE). As crises epilépticas que se sucediam de forma contínua durante o estado de mal se mantiveram no estádio 3 ou superior da escala de Racine.



Figura 3. Período latente de ratos epilépticos machos e fêmeas induzido pelo modelo de epilepsia da pilocarpina. Dados expressos como média ± desvio padrão. Teste t não pareado.

O período latente, isto é, o tempo, em dias, entre a indução do estado de mal epiléptico e a ocorrência da primeira crise espontânea não foi diferente entre os ratos Wistar machos (15,1 \pm 2,7 dias) e fêmeas (14,6 \pm 6,6 dias), p> 0,627.





Figura 4. Número de crises recorrentes em ratos epilépticos machos e fêmeas durante a fase crônica do modelo da pilocarpina. Dados expressos como média ± desvio padrão. * p <0,05 para significância.

Para a quantificação das crises epilépticas espontâneas que correram na fase crônica do modelo da pilocarpina, os ratos machos e fêmeas foram vídeo-monitorados continuamente por 3 meses, 24 horas/dia.

crises 0 número de espontâneas em ratos epilépticos fêmeas foi significativamente maior do que o observado em ratos epilépticos machos durante os 2 primeiros meses de observação [F (1, 8) = 26,02; p <0,0009) para diferença de sexo; (F (1,973, 15,79) = 34,32; p <0,0001 para o mês de observação]. Os testes post-hoc de Sidak revelaram que ratos epilépticos machos tiveram menos crises espontâneas quando comparados com ratos epilépticos fêmeas no primeiro (intervalo médio = 7,2 crises, p < 0,0003) e no 2º mês (intervalo médio = 4 crises, p < 0,004) de observação. Não houve diferença no número de crises durante o 3º mês.



Figura 5. Duração das crises epilépticas espontâneas (segundos) para ratos epilépticos machos e fêmeas . * p <0,05 para significância.

O teste ANOVA bidirecional de medidas repetidas revelou efeito significativo do sexo (F (1, 8) = 91,35; p <0,0001), do tempo (F (1,301, 10,41) = 88,03; p <0,0001) e interação entre sexo e tempo (F (2, 16) = 31,60; p <0,0001) na duração da convulsão ao longo de um período de 3 meses. Os testes post-hoc de Sidak mostraram que a duração de cada crise foi maior em ratos machos em comparação com ratos epilépticos fêmeas no primeiro (intervalo médio = 109,8 segundos, p <0,003), no segundo (intervalo médio = 274,8 segundos, p <0,001), e no terceiro mês (intervalo médio = 610,4 seg, p <0,008) de observação.



Figura 6. Frequência de crises epilépticas agrupadas (mais de duas crises reentrantes em 24 hs) em ratos machos e fêmeas com epilepsia. Dados expressos como média ± desvio padrão. * p <0,05 para significância.

A ocorrência de crises epilépticas agrupadas durante o período de observação também se mostrou influenciada pelo sexo (F (1, 8) = 43,20; P <0,0002) e pelo tempo (F (2, 16) = 4,098; p <0,03). Os testes post-hoc de Sidak mostraram que os ratos epilépticos machos tiveram menos grupos de convulsões durante o primeiro mês do que os ratos epilépticos fêmeas (variação média = 4 grupos de crises, p <0,0001). Porém, nenhuma diferença foi observada nos 2º e 3º meses (p> 0,05) de observação.



Figura 7. Intensidade das crises epilépticas observadas nos ratos epilépticos machos e fêmeas. Dados expressos como média ± desvio padrão. * p <0,05 para significância.

A Figura 7 mostrou que o efeito significativo do sexo (F (1, 8) = 88,20; p <0,0001), do tempo (F (1,985, 15,88) = 25,57; p <0,0001) e da interação entre sexo e tempo (F (2, 16) = 4,696; P <0,02) na gravidade das crises. Os testes post-hoc de Sidak revelaram que a gravidade das crises espontâneas com base na escala de Racine em ratos epilépticos machos foi maior do que a observada em ratos epilépticos fêmeas no 1º (intervalo médio = 1, p <0,004), no 2º (intervalo médio = 1,4, p <0,007), e no 3º mês (intervalo médio = 2, p <0,0003).



Figura 8. Distribuição das crises epilépticas recorrentes a cada 24 horas durante o período de 3 meses. O o ciclo claro (07: 00-18: 59h) e escuro (19: 00-06: 59h) estão separados pelo tracejado vertical. Dados expressos como média ± desvio padrão. * p <0,05 para significância.

A ANOVA bidirecional de medidas repetidas demonstrou efeitos principais significativos do sexo F (1, 8) = 27075; p <0,0001), tempo (F (1,393, 11,14) = 7411; p <0,0001) e interação entre sexo e tempo (F (11, 88) = 37,23; p <0,0001) no padrão de distribuição de crises recorrentes espontâneas registradas durante o ciclo claro / escuro por um período de 3 meses no total. Os testes post-hoc de Sidak mostraram que ratos epilépticos fêmeas tiveram um aumento significativo no número de convulsões durante os ciclos claro / escuro quando comparados com ratos machos epilépticos ao longo das 24 horas, p <0,0001.



5.3 Peso das estruturas cerebrais (bulbo olfatório, amígdala e formação hipocampal)

Figura 9. Massa (em gramas) do cérebro total de ratos Wistar epilépticos machos e fêmeas em comparação aos respectivos controles. * P <0,05 para significância.

A ANOVA de duas vias demonstrou um efeito principal significativo do sexo (F (1, 16) = 30,48; p <0,0001), mas não do grupo (F (1, 16) = 1,976; p = 0,1789) e interação entre sexo e grupo (F (1, 16) = 0,4245; p = 0,5240) na massa cerebral entre controle e ratos epilépticos machos e fêmeas. Os testes post-hoc de Tukey mostraram diminuição significativa na massa cerebral entre machos de controle e ratos machos epilépticos (intervalo médio = 0,14g, p <0,0159), fêmeas de controle e ratos fêmeas epilépticos (intervalo médio = 0,18g, p <0,0024), mas nenhum outro diferenças significativas entre os grupos foram observadas p> 0,05.



Figura 10. Massa (em gramas) do hipocampo de ratos Wistar epilépticos machos e fêmeas em comparação com os respectivos grupos de controle. * P <0,05 para significância.

A Figura 10 mostrou que a massa do hipocampo diminuiu significativamente (F (1, 16) = 27,38; p <0,0001) em animais epilépticos (machos ou fêmeas) em comparação com animais de controle (machos ou fêmeas). Porém, a diminuição da massa relacionada à presença de epilepsia foi semelhante para os animais de ambos os sexos (F (1, 16) = 2.420; p = 0,1394), ou seja, a diminuição do hipocampo epiléptico foi de 32% para os machos (p <0,0173) e 33,3% para o sexo feminino (p <0,0051) em relação aos respectivos controles.



Figura 11. Massa (em gramas) da amígdala de ratos Wistar epilépticos machos e fêmeas em comparação com os respectivos grupos de controle. * P <0,05 para significância.

Pode-se observar que a massa da amígdala foi significativamente reduzida (F (1, 16) = 3,556; p = 0,0002) em animais machos e fêmeas com epilepsia quando comparados aos controles. Porém, ao analisar a perda de massa da amígdala entre ratos fêmeas e machos com epilepsia, nota-se que a perda de massa da amígdala em ratas com epilepsia (57,1%) foi maior do que a observada em ratos machos com epilepsia (41,8%).



Figura 12. Massa (em gramas) do bulbo olfatório de ratos Wistar epilépticos machos e fêmeas em comparação com os respectivos grupos de controle. * P <0,05 para significância.

Notamos que uma diferença significativa na massa dessa estrutura já estava presente entre as fêmeas e os machos controle. O bulbo olfatório em ratos fêmeas é aproximadamente 19,5% mais pesado do que em ratos machos (p <0,02). Em ambos os grupos, a presença de epilepsia diminuiu significativamente a massa do bulbo olfatório em animais de ambos os sexos e, curiosamente, a perda de massa foi maior em ratos machos com epilepsia (F (1, 16) = 44,31; p <0,0001) do que em ratos fêmeas com epilepsia ((F (1, 16) = 37,23; p <0,0001).





Hipocampo

Figura 13. Número de neurônios (em milhões) na formação hipocampal de ratos Wistar epilépticos machos e fêmeas e respectivos controles. Os dados e os níveis básicos são expressos como média ± desvio padrão. * P <0,05 para significância.

O método do fracionador isotrópico foi usado para examinar as células neuronais e não neuronais no hipocampo, amígdala e bulbo olfatório, respectivamente. Figura 10, ANOVA bidirecional mostrou efeito principal significativo de sexo (F (1, 16) = 93,77; p <0,0001), grupo (F (1, 16) = 38,60; p <0,0001), mas não interação entre sexo e grupo (F (1, 16) = 4,23; p = 0,0564) no número de células neuronais do hipocampo. Os testes post-hoc de Tukey mostraram diferença significativa no número de células neuronais do hipocampo entre os grupos (machos controle e machos epilépticos com redução de 29,8%, p <0,0001), (fêmeas controle e fêmeas epilépticas com redução de 17,5%, p <0,0003), (machos epilépticos e fêmeas epilépticas com redução de 12,3%, p <0,0001) e (machos controle e fêmeas controle com aumento de 10,5%, p <0,04).



Figura 14. Número de células neuronais (em milhões) na amígdala de ratos Wistar epilépticos machos e fêmeas e respectivos controles. Os dados e os níveis básicos são expressos como média ± desvio padrão. * P <0,05 para significância.

A Figura 14 mostra o efeito principal significativo do sexo (F (1, 16) = 136,7; p <0,0001), interação entre sexo e grupo (F (1, 16) = 18,20), mas não o grupo (F (1, 16) = 2,49 ; p = 0,1337) no número de células neuronais da amígdala. Os testes post-hoc de Tukey mostraram diminuição significativa no número de células neuronais da amígdala entre os grupos (machos controle e machos epilépticos com redução de 17,7%, p <0,0004), (fêmeas controle e fêmeas epilépticas com redução de 35,8%, p <0,0001), (

machos epilépticos e fêmeas epilépticas com redução de 18,1%, p <0,0003), mas não foram observadas diferenças entre os outros grupos.



Bulbo olfatório

Figura 15. Número de células neuronais (em milhões) no bulbo olfatório de ratos Wistar epilépticos machos e fêmeas e respectivos controles. Os dados e os níveis básicos são expressos como média ± desvio padrão. * P <0,05 para significância.

A contagem de células neuronais no bulbo olfatório revelou efeito principal significativo do sexo (F (1, 16) = 126,8; p <0,0001), do grupo (F (1, 16) = 47,64; p <0,0001), mas não da interação entre sexo e grupo (F (1, 16) = 1,31; p = 0,2681). Os testes post-hoc de Tukey mostraram diferença significativa no número de células neuronais do bulbo olfatório entre os grupos (machos controle e machos epilépticos com

redução de 27%, p <0,0001), (fêmeas controle e fêmeas epilépticas com redução de 19,5%, p <0,0001), (machos e fêmeas epilépticos com redução de 7,5%, p <0,0002) e (machos e fêmeas controle com aumento de 12,5%, p <0,004).

5.5 Número total de células não neuronais



Hipocampo

Figura 16. Número de células não neuronais (em milhões) na formação hipocampal de ratos Wistar epilépticos machos e fêmeas e respectivos controles. Os dados são expressos como média ± desvio padrão. * p <0,05 para significância.

Em relação às células não neuronais presentes nas estruturas analisadas, o teste ANOVA two-way mostrou variação significativa no número dessas células dependendo do grupo (controle versus epilepsia; F (1,16) = 72,38; p <0,0001), da interação entre sexo e grupo (F (1,16) = 7,66; p = 0,0137), mas não sexo (F (1,16) = 2,35; P = 0,1443). Os testes post-hoc de Tukey mostraram um aumento significativo no número de células

não neuronais entre os grupos (ratos fêmeas controle versus ratos fêmeas com epilepsia com aumento de 10%, p <0,03), (ratos controle machos versus ratos controle fêmeas com aumento de 17%, p <0,004), (ratos epilépticos machos versus ratos epilépticos fêmeas com aumento de 36,1%, p <0,0001), mas não foram observadas diferenças entre os outros grupos.



Amígdala

Figura 17. Número de células não neuronais (em milhões) na amígdala de ratos Wistar epilépticos machos e fêmeas e respectivos controles. Os dados são expressos como média ± desvio padrão. * p <0,05 para significância.

O número de células não neuronais na amígdala variou significativamente de acordo com o grupo (animais controle versus animais com epilepsia; F (1, 16) = 43,28; p

<0,0001), e ao analisar a interação entre grupos e sexo (F (1,16) = 13,50; P = 0,0021), mas não houve diferença significativa quando a única variável considerada foi o sexo dos animais (F (1,16) = 3,21; P = 0,0917). Os testes post-hoc de Tukey mostraram um aumento significativo no número de células das tonsilas não neuronais entre os grupos (ratas de controle e ratas com epilepsia com um aumento de 7,4%, p <0,006) e (ratos machos com epilepsia versus ratas com epilepsia com aumento de 14,7%, p <0,0001). Não foram observadas diferenças significativas entre os outros grupos.



Bulbo olfatório

Figura 18. Número de células não neuronais (em milhões) do bulbo olfatório de formação hipocampal de ratos Wistar epilépticos machos e fêmeas e respectivos controles. Os

dados e os níveis básicos são expressos como média ± desvio padrão. * p <0,05 para significância.

Para o bulbo olfatório, observou-se efeito predominante do sexo (F (1,16) = 5,15; p = 0,0374), do grupo (F (1,16) = 183,6; p < 0,0001) e da interação entre os sexos e grupo (F (1,16) = 11,32; p = 0,0039) no número de células não neuronais. Os testes post-hoc de Tukey mostraram um aumento significativo (9,9%, p < 0,005) no número de células não neuronais no bulbo olfatório de ratas com epilepsia quando comparado aos valores obtidos no bulbo olfatório de ratas controle. Não observamos diferenças estatísticas quando essa análise foi realizada comparando o número de células não neuronais presentes no bulbo olfatório de ratos machos controle com os valores encontrados em ratos machos com epilepsia (p > 0,864). Outro achado importante observado no estudo do bulbo olfatório foi o maior número (37%, p < 0,0001) de células não neuronais presentes em ratas com epilepsia quando comparadas ao encontrado em machos com epilepsia.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

O presente estudo fornece dois novos achados principais no cérebro epiléptico. Em primeiro lugar, existem diferenças significativas nos padrões de crises recorrentes espontâneas entre ratos machos e fêmeas submetidos ao modelo de epilepsia com pilocarpina. Em segundo lugar, a distribuição topográfica da morte neuronal e não neuronal difere nos cérebros de ratos epilépticos machos e fêmeas. Esses achados fornecem uma possível explicação para a disfunção do circuito límbico e a ocorrência de distúrbios comportamentais observados no modelo de epilepsia por pilocarpina. Existem poucos dados sobre os padrões de crises epilépticas em ratas, a maioria dessas informações foi adaptada para das crises observadas durante o estado de mal epiléptico que não atende aos critérios de comparação das crises espontâneas isoladas.

A presente evidência resume diferenças significativas ligadas ao sexo nas estruturas principais e padrões de crises epilépticas de longo prazo: ratos machos e fêmeas demonstraram diferenças de redução de massa de 41,8% na amígdala e 18,2% no bulbo olfatório, enquanto hipocampo, amígdala e perda neuronal olfatória e a morte de células não neuronais variou entre (7-21)%, respectivamente. Além disso, ratos machos epilépticos exibiram aumento gradual na duração e gravidade das crises e mostraram menos crises durante os ciclos de claro / escuro por dia durante todo o período, enquanto as fêmeas epilépticas mostraram um aumento significativo na

frequência de crises e grupos de crises nos primeiros meses quando comparados durante os 3 meses períod.

É importante observar que o modelo de epilepsia da pilocarpina é um paradigma apropriado para estudar lesões hipocampais e extra-hipocampais na epilepsia do lobo temporal (CURIA; LONGO; BIAGINI; JONES et al., 2008; RUSINA; BERNARD; WILLIAMSON, 2021). A morte neuronal induzida pela pilocarpina no circuito límbico segue uma cascata de eventos que vai da ativação dos receptores muscarínicos à hiperativação dos receptores AMPA e NMDA, culminando em aumento importante da permeabilidade ao cálcio, levando à lesão morte neuronal. Insights sobre o desenvolvimento de circuitos hiperexcitáveis a partir da ativação glutamatérgica foram obtidos nos estudos de kindling (ARONIADOU-ANDERJASKA; FRITSCH; QASHU; BRAGA, 2008). Por exemplo, o kindling do bulbo olfatório facilita a disseminação da atividade convulsiva por meio de extensas conexões com a amígdala e com o hipocampo, levando a mudanças estruturais permanentes nessas estruturas (BAIMBRIDGE; MODY; MILLER, 1985). Além disso, o kindling da amígdala resulta em intensa atividade epiléptica e reorganização sináptica da zona subventricular do bulbo olfatório (SATO; IWAI; NAGANO; SHOJI et al., 2002). Assim, é possível que a ocorrência de atividade epiléptica duradoura em todo o circuito límbico durante o estado de mal induzido pela pilocarpina facilite a criação de uma circuitaria hiperexcitável incluindo a participação do bulbo olfatório. Dessa forma, sua participação nos distúrbios comportamentais exibidos pelos animais epilépticos pela pilocarpina poderia ser explicada.

A diferente distribuição da morte neuronal e não neuronal nas estruturas estudadas entre os ratos machos e fêmeas com epilepsia parece a distribuição diferencial de receptores para hormônios sexuais nessas mesmas estruturas, bem como as conexões formadas entre eles ao longo da vida, além de outros fatores o ciclo circadiano. O fato de ratas expressarem maior densidade e distribuição diferencial de receptores de estrogênio nas estruturas límbicas em comparação com ratos machos e a influência do ciclo estral e do ciclo circadiano no número e função desses receptores é bem conhecido (ZHANG; CAI; ZHOU; SU, 2002).

Em relação à epilepsia experimental, nosso laboratório demonstrou anteriormente que ratas com epilepsia no modelo da pilocarpina apresentam maior liberação de estradiol e redução dos níveis de progesterona (AMADO; CAVALHEIRO, 1998). Durante o ciclo menstrual normal, as ratas epilépticas são suscetíveis à retirada da progesterona, predispondo ao aumento da frequência das crises e diminuição dos níveis de alopregnanolona têm sido implicados neste fenômeno (SCHARFMAN; MACLUSKY, 2014).

Os mecanismos pelos quais esses dois hormônios facilitam ou inibem a atividade epiléptica nos circuitos límbicos não são totalmente compreendidos (AMADO; CAVALHEIRO, 1998). Em resumo, dentro dos circuitos cerebrais, o estradiol é um ligante bidirecional que exerce seus efeitos pró-epilépticos através do receptor NMDA e antiepilépticos através do Neuropeptídeo Y (LEDOUX; SMEJKALOVA; MAY; COOKE *et al.*, 2009; VELÍSKOVÁ; VELÍSEK, 2007). A progesterona medeia sua ação antiepiléptica por meio da alopregnanolona (FRYE; RHODES; WALF; HARNEY, 2002; REDDY, 2013b), que é um metabólito da progesterona e que, também, pode ser sintetizada no

organismo a partir do colesterol. Sua ação antiepiléptica se deve, principalmente à sua ação modeladora dos receptores GABAérgicos centrais. Além disso, a progesterona mostrou papel importante no controle da morte celular neuronal e não neuronal, da neuroinflamação e da neoneurogênese em ratas com epilepsia (REDDY, 2013b). A testosterona, ao ser convertida em estradiol, mostra sua ação epileptogênica e estudos têm evidenciado que a testosterona é capaz de induzir crises tônico-clônicas intensas em ratos machos epilépticos (FRYE; RYAN; RHODES, 2009; TEYLER; VARDARIS; LEWIS; RAWITCH, 1980).

Em linha com nosso estudo, a perda de células astrocitárias positivas para GFAP no hipocampo foi relatada em ratos epilépticos machos após 4 semanas de estado de mal epiléptico, o que está relacionado ao que observamos em ratos machos tratados com pilocarpina após três meses de crises epilépticas recorrentes (KIM; KIM; KWAK; CHOI *et al.*, 2008).

Em apoio aos nossos achados (figuras 1 e 2), os modelos de epilepsia induzidos pelo ácido caínico e a pilocarpina mostram que existe agravamento progressivo das crises epilépticas em ratos machos ao longo da vida. Esse agravamento pode ser caracterizado pelo aumento da duração, frequência e intensidade das crises epilépticas espontâneas observadas durante o ciclo claro-escuro ao longo de longo período de observação (ARIDA; SCORZA; PERES; CAVALHEIRO, 1999; GOFFIN; NISSINEN; VAN LAERE; PITKÄNEN, 2007; UPADHYA; KODALI; GITAI; CASTRO *et al.*, 2019). Clusters de crises também têm sido identificados nesse período, mas não em todos os animais estudados. Tal como relatado em seres humanos com TLE. Entretanto, os mecanismos exatos pelos quais os microcircuitos disfuncionais são capazes de desencadear,

propagar ou interromper as crises epilépticas dos mais variados padrões permanecem elusivos (GOFFIN; NISSINEN; VAN LAERE; PITKÄNEN, 2007). Além disso, perda neuronal progressiva também é observada em ratos machos com epilepsia, a qual pode ser explicada pela ocorrência de crises espontâneas ou pela presença de mecanismos decorrentes da própria patologia, ainda a serem identificados (LOPIM; VANNUCCI CAMPOS; GOMES DA SILVA; DE ALMEIDA *et al.*, 2016).

Em conjunto, tanto as diferenças sexuais e os amplos efeitos mecanicistas dos hormônios gonadais na excitabilidade límbica e na vulnerabilidade às crises epilépticas podem ser influenciados por vários fatores, incluindo as disparidades dimórficas em regiões epileptogênicas do cérebro que desencadeiam ou interrompem as crises, a conectividade intrínseca do cérebro, a distribuição dos receptores e as vias de sinalização (VELÍŠKOVÁ; DESANTIS, 2013). Essas mudanças podem contribuir para as diferenças nos padrões de crises recorrentes, incluindo frequência, duração, ocorrência de clusters e intensidade das crises.

6.1 Relevância e contribuição para a compreensão dos distúrbios comportamentais que acompanham as epilepsias

A observação de que a morte neuronal e não neuronal é diferente nos ratos machos e fêmeas com epilepsia pela pilocarpina ocorre em estruturas participantes de circuitos neuronais muito importantes e que têm papel predominante na emissão de comportamentos e que, ao mesmo tempo, formam uma janela sensorial para o ambiente externo em ratos. As crises epilépticas recorrentes e de longo prazo promovem a perda gradual de neurônios, alterando ou interrompendo esses (LOPIM; VANNUCCI CAMPOS; GOMES DA SILVA; DE ALMEIDA *et al.*, 2016). Por exemplo, estudos em epilepsia

experimental têm mostrado alterações importantes no circuito GABAérgico/parvalbumina do bulbo olfatório (YU; PARK; YOO; KIM, 2020), da amígdala basolateral (ARONIADOU-ANDERJASKA; FRITSCH; QASHU; BRAGA, 2008) e do hipocampo (YI; DECAN; STOLL; MARCEAU *et al.*, 2015).

Tem-se também observado que a região CA1 do hipocampo ventral e a amígdala basolateral dependem fortemente de inputs olfatórios na modulação do medo (PI; GAO; WU; WANG *et al.*, 2020), do humor e na expressão de comportamentos símiles à ansiedade e essas regiões são justamente aquelas que também exibem maior grau de perda neuronal em decorrência de crises epilépticas (ARONIADOU-ANDERJASKA; FRITSCH; QASHU; BRAGA, 2008; YI; XU; LONG; FENG *et al.*, 2014). Além disso, essas regiões também contêm vias de circuito de ansiedade para o córtex pré-frontal e hipotálamo (JIMENEZ; SU; GOLDBERG; LUNA *et al.*, 2018; PARFITT; NGUYEN; BANG; AQRABAWI *et al.*, 2017). Todos esses dados em conjunto parecem indicar que na epilepsia do lobo temporal, a disfunção glutamatérgica olfatória pode induzir hiperexcitabilidade em regiões da amígdala e do hipocampo, aumentando a frequência e intensidade das crises e alterando a função de circuitos responsáveis pelo controle do comportamento animal.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÕES

Nossos resultados sugerem que:

7.1 – Ratos machos e fêmeas com epilepsia pelo modelo da pilocarpina diferem quanto algumas características do modelo: número, duração e gravidade das crises epilépticas.

7.2 – Ratos machos e fêmeas com epilepsia pela pilocarpina diferem quanto à perda neuronal e de células não neuronais no bulbo olfatório, amígdala e formação hipocampal.

Concluímos que diferenças ligadas ao sexo e nos padrões das crises epilépticas recorrentes no modelo de epilepsia do lobo temporal induzida pela pilocarpina podem estar subjacentes à variação nos padrões de morte celular no sistema límbico e, assim, contribuir para a ocorrência de distúrbios comportamentais observados nesse modelo experimental.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

ALAM, M. N.; AHMAD, A.; AL-ABBASI, F. A.; AHMAD, A. Female ovarian steroids in epilepsy: a cause or remedy. **Pharmacol Rep**, 65, n. 4, p. 802-812, 2013.

AMADO, D. Disfunção hormonal no modelo de epilepsia induzido por pilocarpina. 1996.

AMADO, D.; CAVALHEIRO, E. A. Hormonal and gestational parameters in female rats submitted to the pilocarpine model of epilepsy. **Epilepsy Res**, 32, n. 1-2, p. 266-274, Sep 1998.

AMADO, D.; CAVALHEIRO, E. A.; BENTIVOGLIO, M. Epilepsy and hormonal regulation: the patterns of GnRH and galanin immunoreactivity in the hypothalamus of epileptic female rats. **Epilepsy Research**, 14, n. 2, p. 149-159, 1993/02/01/1993.

ARIDA, R. M.; SCORZA, F. A.; PERES, C. A.; CAVALHEIRO, E. A. The course of untreated seizures in the pilocarpine model of epilepsy. **Epilepsy Res**, 34, n. 2-3, p. 99-107, Apr 1999.

ARONIADOU-ANDERJASKA, V.; FRITSCH, B.; QASHU, F.; BRAGA, M. F. M. Pathology and pathophysiology of the amygdala in epileptogenesis and epilepsy. **Epilepsy research**, 78, n. 2-3, p. 102-116, 2008/02// 2008.

BABB, T. L.; MATHERN, G. W.; PRETORIUS, J. K.; CIFUENTES, F. Astrocytes may contribute to the latent period in progressive neuron loss, axon sprouting, and chronic seizures in rat kainate hippocampal epilepsy. **Epilepsy Res Suppl**, 12, p. 343-354, 1996.

BAIMBRIDGE, K. G.; MODY, I.; MILLER, J. J. Reduction of rat hippocampal calciumbinding protein following commissural, amygdala, septal, perforant path, and olfactory bulb kindling. **Epilepsia**, 26, n. 5, p. 460-465, Sep-Oct 1985.

BARTEL, D. L.; RELA, L.; HSIEH, L.; GREER, C. A. Dendrodendritic synapses in the mouse olfactory bulb external plexiform layer. **J Comp Neurol**, 523, n. 8, p. 1145-1161, Jun 1 2015.

BAUM, M. J.; CHERRY, J. A. Processing by the main olfactory system of chemosignals that facilitate mammalian reproduction. **Horm Behav**, 68, p. 53-64, Feb 2015.

BEGHI, E. The Epidemiology of Epilepsy. **Neuroepidemiology**, 54, n. 2, p. 185-191, 2020.

BEGHI, E.; GIUSSANI, G.; NICHOLS, E.; ABD-ALLAH, F. *et al.* Global, regional, and national burden of epilepsy, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **The Lancet Neurology**, 18, n. 4, p. 357-375, 2019.

BELLINI, I.; POLICARDO, L.; ZACCARA, G.; PALUMBO, P. *et al.* Identification of prevalent patients with epilepsy using administrative data: the Tuscany experience. **Neurol Sci**, 38, n. 4, p. 571-577, Apr 2017.

BELNOUE, L.; MALVAUT, S.; LADEVÈZE, E.; ABROUS, D. N. *et al.* Plasticity in the olfactory bulb of the maternal mouse is prevented by gestational stress. **Scientific Reports**, 6, n. 1, p. 37615, 2016/11/25 2016.

BERMÚDEZ, C. M. [Clinical Applications of Peripheral Markers of Response in Antidepressant Treatment: Neurotrophins and Cytokines]. **Rev Colomb Psiquiatr**, 41, n. 1, p. 165-184, Mar 2012.

BERZAGHI MDA, P.; AMADO, D.; CAVALHEIRO, E. A. Pregnancy decreases the frequency of spontaneous recurrent seizures in rats with kainic acid lesions of the hippocampus. **Epilepsy Res**, 1, n. 2, p. 142-144, Mar 1987.

BERZAGHI, M. d. P. P. Estudo experimental dos efeitos de crises epilépticas sobre a gestação e a prole. 1991.

BOLLINGER, J. L.; COLLINS, K. E.; PATEL, R.; WELLMAN, C. L. Behavioral stress alters corticolimbic microglia in a sex- and brain region-specific manner. 12, n. 12, p. e0187631, 2017.

BOURNE, J. N.; SCHOPPA, N. E. Three-dimensional synaptic analyses of mitral cell and external tufted cell dendrites in rat olfactory bulb glomeruli. **J Comp Neurol**, 525, n. 3, p. 592-609, Feb 15 2017.

BOYD, A. M.; STURGILL, J. F.; POO, C.; ISAACSON, J. S. Cortical feedback control of olfactory bulb circuits. **Neuron**, 76, n. 6, p. 1161-1174, Dec 20 2012.

BURTON, S. D.; URBAN, N. N. Greater excitability and firing irregularity of tufted cells underlies distinct afferent-evoked activity of olfactory bulb mitral and tufted cells. **J Physiol**, 592, n. 10, p. 2097-2118, May 15 2014.

BYWALEZ, W. G.; ONA-JODAR, T.; LUKAS, M.; NINKOVIC, J. *et al.* Dendritic Arborization Patterns of Small Juxtaglomerular Cell Subtypes within the Rodent Olfactory Bulb. **Front Neuroanat**, 10, p. 127, 2016.

CERSÓSIMO, R.; FLESLER, S.; BARTULUCHI, M.; SOPRANO, A. M. *et al.* Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis: study of 42 children. **Seizure**, 20, n. 2, p. 131-137, Mar 2011.

COELHO, D. H.; COSTANZO, R. M. Spatial Mapping in the Rat Olfactory Bulb by Odor and Direct Electrical Stimulation. **Otolaryngol Head Neck Surg**, 155, n. 3, p. 526-532, Sep 2016.

CURIA, G.; LONGO, D.; BIAGINI, G.; JONES, R. S. *et al.* The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. **J Neurosci Methods**, 172, n. 2, p. 143-157, Jul 30 2008.

DEVINSKY, O.; VEZZANI, A.; O'BRIEN, T. J.; JETTE, N. *et al.* Epilepsy. **Nature Reviews Disease Primers**, 4, n. 1, p. 18024, 2018/05/03 2018.

DO VALE, T. G.; DA SILVA, A. V.; LIMA, D. C.; DE LIMA, E. *et al.* Seizures during pregnancy modify the development of hippocampal interneurons of the offspring. **Epilepsy Behav**, 19, n. 1, p. 20-25, Sep 2010.

ENNIS, M.; PUCHE, A. C.; HOLY, T.; SHIPLEY, M. T. Chapter 27 - The Olfactory System. *In*: PAXINOS, G. (Ed.). **The Rat Nervous System (Fourth Edition)**. San Diego: Academic Press, 2015. p. 761-803.

FARRELL, M. R.; SENGELAUB, D. R.; WELLMAN, C. L. Sex differences and chronic stress effects on the neural circuitry underlying fear conditioning and extinction. **Physiol Behav**, 122, p. 208-215, Oct 2 2013.

FORESTI, M. L.; ARISI, G. M.; SHAPIRO, L. A. Role of glia in epilepsy-associated neuropathology, neuroinflammation and neurogenesis. **Brain Res Rev**, 66, n. 1-2, p. 115-122, Jan 7 2011.

FRYE, C. A.; RHODES, M. E.; WALF, A.; HARNEY, J. Progesterone reduces pentylenetetrazol-induced ictal activity of wild-type mice but not those deficient in type I 5alpha-reductase. **Epilepsia**, 43 Suppl 5, p. 14-17, 2002.
FRYE, C. A.; RYAN, A.; RHODES, M. Antiseizure effects of 3α -androstanediol and/or 17 β -estradiol may involve actions at estrogen receptor β . **Epilepsy & Behavior**, 16, n. 3, p. 418-422, 2009.

FURUDONO, Y.; CRUZ, G.; LOWE, G. Glomerular input patterns in the mouse olfactory bulb evoked by retronasal odor stimuli. **BMC Neurosci**, 14, p. 45, Apr 8 2013.

GILBERT, K.; GODBOUT, R.; ROUSSEAU, G. Caspase-3 Activity in the Rat Amygdala Measured by Spectrofluorometry After Myocardial Infarction. **J Vis Exp**, n. 107, p. e53207, Jan 12 2016.

GODOY, L. D.; GARCIA-CAIRASCO, N. Maternal behavior and the neonatal HPA axis in the Wistar Audiogenic Rat (WAR) strain: Early-life implications for a genetic animal model in epilepsy. **Epilepsy & Behavior**, 117, p. 107877, 2021/04/01/2021.

GOFFIN, K.; NISSINEN, J.; VAN LAERE, K.; PITKÄNEN, A. Cyclicity of spontaneous recurrent seizures in pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in rat. **Exp Neurol**, 205, n. 2, p. 501-505, Jun 2007.

GOLDBERG, E. M.; COULTER, D. A. Mechanisms of epileptogenesis: a convergence on neural circuit dysfunction. **Nat Rev Neurosci**, 14, n. 5, p. 337-349, May 2013.

GORKA, A. X.; HANSON, J. L.; RADTKE, S. R.; HARIRI, A. R. Reduced hippocampal and medial prefrontal gray matter mediate the association between reported childhood maltreatment and trait anxiety in adulthood and predict sensitivity to future life stress. **Biol Mood Anxiety Disord**, 4, p. 12, 2014.

GRABSKA-BARWIŃSKA, A.; BARTHELMÉ, S.; BECK, J.; MAINEN, Z. F. *et al.* A probabilistic approach to demixing odors. **Nature Neuroscience**, 20, n. 1, p. 98-106, 2017/01/01 2017.

GRÖTICKE, I.; HOFFMANN, K.; LÖSCHER, W. Behavioral alterations in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in mice. **Exp Neurol**, 207, n. 2, p. 329-349, Oct 2007.

HERCULANO-HOUZEL, S.; MOTA, B.; LENT, R. Cellular scaling rules for rodent brains. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 103, n. 32, p. 12138-12143, Aug 8 2006.

HERCULANO-HOUZEL, S.; VON BARTHELD, C. S.; MILLER, D. J.; KAAS, J. H. How to count cells: the advantages and disadvantages of the isotropic fractionator compared with stereology. **Cell Tissue Res**, 360, n. 1, p. 29-42, Apr 2015.

HUANG, L.; GARCIA, I.; JEN, H. I.; ARENKIEL, B. R. Reciprocal connectivity between mitral cells and external plexiform layer interneurons in the mouse olfactory bulb. **Front Neural Circuits**, 7, p. 32, 2013.

IMAMURA, F.; ITO, A.; LAFEVER, B. J. Subpopulations of Projection Neurons in the Olfactory Bulb. **Frontiers in Neural Circuits**, 14, n. 58, 2020-August-28 2020. Review.

JAFARPOUR, S.; HIRSCH, L. J.; GAÍNZA-LEIN, M.; KELLINGHAUS, C. *et al.* Seizure cluster: Definition, prevalence, consequences, and management. **Seizure**, 68, p. 9-15, May 2019.

JANAK, P. H.; TYE, K. M. From circuits to behaviour in the amygdala. **Nature**, 517, n. 7534, p. 284-292, 2015/01/01 2015.

JANSEN, C.; FRANCOMME, L.; VIGNAL, J. P.; JACQUOT, C. *et al.* Interictal psychiatric comorbidities of drug-resistant focal epilepsy: Prevalence and influence of the localization of the epilepsy. **Epilepsy Behav**, 94, p. 288-296, May 2019.

JIMENEZ, J. C.; SU, K.; GOLDBERG, A. R.; LUNA, V. M. *et al.* Anxiety Cells in a Hippocampal-Hypothalamic Circuit. **Neuron**, 97, n. 3, p. 670-683.e676, Feb 7 2018.

JINDAL, A.; MAHESH, R.; BHATT, S. Etazolate, a phosphodiesterase-4 enzyme inhibitor produces antidepressant-like effects by blocking the behavioral, biochemical, neurobiological deficits and histological abnormalities in hippocampus region caused by olfactory bulbectomy. **Psychopharmacology (Berl)**, 232, n. 3, p. 623-637, Feb 2015.

JOHNSON, Z. V.; YOUNG, L. J. Evolutionary diversity as a catalyst for biological discovery. **Integr Zool**, 13, n. 6, p. 616-633, Nov 2018.

KADOHISA, M. Effects of odor on emotion, with implications. **Front Syst Neurosci**, 7, p. 66, Oct 10 2013.

KANG, T. C.; KIM, D. S.; KWAK, S. E.; KIM, J. E. *et al.* Epileptogenic roles of astroglial death and regeneration in the dentate gyrus of experimental temporal lobe epilepsy. **Glia**, 54, n. 4, p. 258-271, Sep 2006.

KANNER, A. M.; RIBOT, R.; MAZARATI, A. Bidirectional relations among common psychiatric and neurologic comorbidities and epilepsy: Do they have an impact on the course of the seizure disorder? **Epilepsia Open**, 3, n. Suppl Suppl 2, p. 210-219, Dec 2018.

KASS, M. D.; MOBERLY, A. H.; MCGANN, J. P. Spatiotemporal alterations in primary odorant representations in olfactory marker protein knockout mice. **PLoS One**, 8, n. 4, p. e61431, 2013.

KIM, D. S.; KIM, J. E.; KWAK, S. E.; CHOI, K. C. *et al.* Spatiotemporal characteristics of astroglial death in the rat hippocampo-entorhinal complex following pilocarpine-induced status epilepticus. **J Comp Neurol**, 511, n. 5, p. 581-598, Dec 10 2008.

KIM, J. Y.; CHOE, J. Distinct Developmental Features of Olfactory Bulb Interneurons. 43, n. 3, p. 215-221, Mar 31 2020.

LABUDDA, K.; ILLIES, D.; BIEN, C. G.; NEUNER, F. Interictal dysphoric disorder: Further doubts about its epilepsy-specificity and its independency from common psychiatric disorders. **Epilepsy Res**, 141, p. 13-18, Mar 2018.

LAFRANCE, W. C., Jr.; LEAVER, K.; STOPA, E. G.; PAPANDONATOS, G. D. *et al.* Decreased serum BDNF levels in patients with epileptic and psychogenic nonepileptic seizures. **Neurology**, 75, n. 14, p. 1285-1291, Oct 5 2010.

LEDOUX, V. A.; SMEJKALOVA, T.; MAY, R. M.; COOKE, B. M. *et al.* Estradiol Facilitates the Release of Neuropeptide Y to Suppress Hippocampus-Dependent Seizures. **The Journal of Neuroscience**, 29, n. 5, p. 1457-1468, 2009.

LEMOS, T.; CAVALHEIRO, E. A. Suppression of pilocarpine-induced status epilepticus and the late development of epilepsy in rats. **Exp Brain Res**, 102, n. 3, p. 423-428, 1995.

LEUNER, B.; SABIHI, S. The birth of new neurons in the maternal brain: Hormonal regulation and functional implications. **Front Neuroendocrinol**, 41, p. 99-113, Apr 2016.

LEVIRA, F.; THURMAN, D. J.; SANDER, J. W.; HAUSER, W. A. *et al.* Premature mortality of epilepsy in low- and middle-income countries: A systematic review from the Mortality Task Force of the International League Against Epilepsy. **Epilepsia**, 58, n. 1, p. 6-16, Jan 2017.

LI, A.; RAO, X.; ZHOU, Y.; RESTREPO, D. Complex neural representation of odour information in the olfactory bulb. **Acta Physiol (Oxf)**, 228, n. 1, p. e13333, Jan 2020.

LIMA, D. C.; VALE, T. G.; ARGANÃRAZ, G. A.; VARELLA, P. P. *et al.* Behavioral evaluation of adult rats exposed in utero to maternal epileptic seizures. **Epilepsy Behav**, 18, n. 1-2, p. 45-49, May 2010.

LIU, G.; FROUDARAKIS, E.; PATEL, J. M.; KOCHUKOV, M. Y. *et al.* Target specific functions of EPL interneurons in olfactory circuits. **Nature Communications**, 10, n. 1, p. 3369, 2019/07/29 2019.

LOPES, M. W.; LOPES, S. C.; SANTOS, D. B.; COSTA, A. P. *et al.* Time course evaluation of behavioral impairments in the pilocarpine model of epilepsy. **Epilepsy Behav**, 55, p. 92-100, Feb 2016.

LOPIM, G. M.; VANNUCCI CAMPOS, D.; GOMES DA SILVA, S.; DE ALMEIDA, A. A. *et al.* Relationship between seizure frequency and number of neuronal and non-neuronal cells in the hippocampus throughout the life of rats with epilepsy. **Brain Res**, 1634, p. 179-186, Mar 1 2016.

LUEF, G.; MADERSBACHER, H. Sexual dysfunction in patients with epilepsy. **Handb Clin Neurol**, 130, p. 383-394, 2015.

MA, L.; QIU, Q.; GRADWOHL, S.; SCOTT, A. *et al.* Distributed representation of chemical features and tunotopic organization of glomeruli in the mouse olfactory bulb. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 109, n. 14, p. 5481-5486, Apr 3 2012.

MAZARATI, A. Can we and should we use animal models to study neurobehavioral comorbidities of epilepsy? **Epilepsy Behav**, 101, n. Pt A, p. 106566, Dec 2019.

MAZARATI, A.; SIDDARTH, P.; BALDWIN, R. A.; SHIN, D. *et al.* Depression after status epilepticus: behavioural and biochemical deficits and effects of fluoxetine. **Brain**, 131, n. Pt 8, p. 2071-2083, Aug 2008.

MCCLINTOCK, T. S.; WANG, Q.; SENGOKU, T.; TITLOW, W. B. *et al.* Mixture and concentration effects on odorant receptor response patterns in vivo. **Chem Senses**, May 19 2020.

MCGANN, J. P. Poor human olfaction is a 19th-century myth. **Science**, 356, n. 6338, May 12 2017.

MIDDELDORP, J.; HOL, E. M. GFAP in health and disease. **Prog Neurobiol**, 93, n. 3, p. 421-443, Mar 2011.

MULA, M. The comorbidities of epilepsy explained. **Expert Rev Neurother**, 20, n. 12, p. 1207-1209, Dec 2020.

MUTLU, A. K.; SCHNEIDER, M.; DEBBANÉ, M.; BADOUD, D. *et al.* Sex differences in thickness, and folding developments throughout the cortex. **Neuroimage**, 82, p. 200-207, Nov 15 2013.

NAGAYAMA, S.; HOMMA, R.; IMAMURA, F. Neuronal organization of olfactory bulb circuits. **Front Neural Circuits**, 8, p. 98, 2014.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL COMMITTEE FOR THE UPDATE OF THE GUIDE FOR THE, C.; USE OF LABORATORY, A. The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health. *In*: **Guide for the Care and Use of Laboratory Animals**. Washington (DC): National Academies Press (US)

Copyright © 2011, National Academy of Sciences., 2011.

NUNEZ-PARRA, A.; MAURER, R. K.; KRAHE, K.; SMITH, R. S. *et al.* Disruption of centrifugal inhibition to olfactory bulb granule cells impairs olfactory discrimination. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 110, n. 36, p. 14777-14782, 2013.

OSINSKI, B. L.; KIM, A.; XIAO, W.; MEHTA, N. M. *et al.* Pharmacological manipulation of the olfactory bulb modulates beta oscillations: testing model predictions. 120, n. 3, p. 1090-1106, Sep 1 2018.

PADMANABHAN, K.; OSAKADA, F.; TARABRINA, A.; KIZER, E. *et al.* Diverse Representations of Olfactory Information in Centrifugal Feedback Projections. **The Journal of Neuroscience**, 36, n. 28, p. 7535-7545, 2016.

PARFITT, G. M.; NGUYEN, R.; BANG, J. Y.; AQRABAWI, A. J. *et al.* Bidirectional Control of Anxiety-Related Behaviors in Mice: Role of Inputs Arising from the Ventral Hippocampus to the Lateral Septum and Medial Prefrontal Cortex. **Neuropsychopharmacology**, 42, n. 8, p. 1715-1728, 2017/07/01 2017.

PAZ, J. T.; HUGUENARD, J. R. Microcircuits and their interactions in epilepsy: is the focus out of focus? **Nat Neurosci**, 18, n. 3, p. 351-359, Mar 2015.

PENG, W. F.; DING, J.; LI, X.; FAN, F. *et al.* N-methyl-D-aspartate receptor NR2B subunit involved in depression-like behaviours in lithium chloride-pilocarpine chronic rat epilepsy model. **Epilepsy Res**, 119, p. 77-85, Jan 2016.

PERCIE DU SERT, N.; HURST, V.; AHLUWALIA, A.; ALAM, S. *et al.* The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. **Br J Pharmacol**, 177, n. 16, p. 3617-3624, Aug 2020.

PERETTO, P.; SCHELLINO, R.; DE MARCHIS, S.; FASOLO, A. The Interplay between Reproductive Social Stimuli and Adult Olfactory Bulb Neurogenesis. **Neural Plasticity**, 2014, p. 497657, 2014/07/22 2014.

PI, G.; GAO, D.; WU, D.; WANG, Y. *et al.* Posterior basolateral amygdala to ventral hippocampal CA1 drives approach behaviour to exert an anxiolytic effect. **Nature Communications**, 11, n. 1, p. 183, 2020/01/10 2020.

PRESSLER, R. T.; STROWBRIDGE, B. W. Direct Recording of Dendrodendritic Excitation in the Olfactory Bulb: Divergent Properties of Local and External Glutamatergic Inputs Govern Synaptic Integration in Granule Cells. **J Neurosci**, 37, n. 49, p. 11774-11788, Dec 6 2017.

RACINE, R. J. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. **Electroencephalogr Clin Neurophysiol**, 32, n. 3, p. 281-294, Mar 1972.

RAVIZZA, T.; BOER, K.; REDEKER, S.; SPLIET, W. G. *et al.* The IL-1beta system in epilepsy-associated malformations of cortical development. **Neurobiol Dis**, 24, n. 1, p. 128-143, Oct 2006.

RAVIZZA, T.; GAGLIARDI, B.; NOÉ, F.; BOER, K. *et al.* Innate and adaptive immunity during epileptogenesis and spontaneous seizures: evidence from experimental models and human temporal lobe epilepsy. **Neurobiol Dis**, 29, n. 1, p. 142-160, Jan 2008.

REDDY, D. S. Neuroendocrine aspects of catamenial epilepsy. **Horm Behav**, 63, n. 2, p. 254-266, Feb 2013a.

REDDY, D. S. Role of hormones and neurosteroids in epileptogenesis. **Front Cell Neurosci**, 7, p. 115, 2013b.

REDDY, D. S.; JIAN, K. The Testosterone-Derived Neurosteroid Androstanediol Is a Positive Allosteric Modulator of GABA_A Receptors. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 334, n. 3, p. 1031-1041, 2010.

RIZZI, M.; WEISSBERG, I.; MILIKOVSKY, D. Z.; FRIEDMAN, A. Following a potential epileptogenic insult, prolonged high rates of nonlinear dynamical regimes of intermittency type is the hallmark of epileptogenesis. **Scientific Reports**, 6, n. 1, p. 31129, 2016/08/04 2016.

RUBIN, R. D.; SCHWARB, H.; LUCAS, H. D.; DULAS, M. R. *et al.* Dynamic Hippocampal and Prefrontal Contributions to Memory Processes and Representations Blur the Boundaries of Traditional Cognitive Domains. **Brain Sci**, 7, n. 7, Jul 12 2017.

RUDZINSKI, L. A.; MEADOR, K. J. Epilepsy and neuropsychological comorbidities. **Continuum (Minneap Minn)**, 19, n. 3 Epilepsy, p. 682-696, Jun 2013.

RUSINA, E.; BERNARD, C.; WILLIAMSON, A. The Kainic Acid Models of Temporal Lobe Epilepsy. **eneuro**, 8, n. 2, p. ENEURO.0337-0320.2021, 2021.

SALAZAR, I.; SANCHEZ-QUINTEIRO, P.; BARRIOS, A. W.; LÓPEZ AMADO, M. *et al.* Anatomy of the olfactory mucosa. **Handb Clin Neurol**, 164, p. 47-65, 2019.

SAMBA REDDY, D. Sex differences in the anticonvulsant activity of neurosteroids. J **Neurosci Res**, 95, n. 1-2, p. 661-670, Jan 2 2017.

SARNAT, H. B.; FLORES-SARNAT, L. Might the olfactory bulb be an origin of olfactory auras in focal epilepsy? **Epileptic Disord**, 18, n. 4, p. 344-355, Dec 1 2016.

SATO, K.; IWAI, M.; NAGANO, I.; SHOJI, M. *et al.* Expression of highly polysialylated neural cell adhesion molecule in rat subventricular zone with exposure to repeated kindled seizures. **Neurosci Lett**, 323, n. 3, p. 244-246, May 3 2002.

SCHARFMAN, H. E.; MACLUSKY, N. J. Sex differences in the neurobiology of epilepsy: a preclinical perspective. **Neurobiol Dis**, 72 Pt B, p. 180-192, Dec 2014.

SCHMIDT-KASTNER, R.; INGVAR, M. Laminar damage of neurons and astrocytes in neocortex and hippocampus of rat after long-lasting status epilepticus induced by pilocarpine. **Epilepsy Res Suppl**, 12, p. 309-316, 1996.

SCORZA, F. A.; ARIDA, R. M.; NAFFAH-MAZZACORATTI MDA, G.; SCERNI, D. A. *et al.* The pilocarpine model of epilepsy: what have we learned? **An Acad Bras Cienc**, 81, n. 3, p. 345-365, Sep 2009.

SMITH, S. S.; WATERHOUSE, B. D.; WOODWARD, D. J. Locally applied estrogens potentiate glutamate-evoked excitation of cerebellar Purkinje cells. **Brain Res**, 475, n. 2, p. 272-282, Dec 20 1988.

SMITH, S. S.; WOOLLEY, C. S. Cellular and molecular effects of steroid hormones on CNS excitability. **Cleve Clin J Med**, 71 Suppl 2, p. S4-10, Feb 2004.

STORACE, D. A.; COHEN, L. B. Measuring the olfactory bulb input-output transformation reveals a contribution to the perception of odorant concentration invariance. **Nat Commun**, 8, n. 1, p. 81, Jul 19 2017.

TEGEGNE, M. T.; MOSSIE, T. B.; AWOKE, A. A.; ASSAYE, A. M. *et al.* Depression and anxiety disorder among epileptic people at Amanuel Specialized Mental Hospital, Addis Ababa, Ethiopia. **BMC Psychiatry**, 15, p. 210, Sep 2 2015.

TEYLER, T. J.; VARDARIS, R. M.; LEWIS, D.; RAWITCH, A. B. Gonadal steroids: effects on excitability of hippocampal pyramidal cells. **Science**, 209, n. 4460, p. 1017-1018, Aug 29 1980.

TJØSTHEIM, T. A.; BALKENIUS, C. Cumulative inhibition in neural networks. 20, n. 1, p. 87-102, Feb 2019.

TURSKI, L.; IKONOMIDOU, C.; TURSKI, W. A.; BORTOLOTTO, Z. A. *et al.* Review: cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine: a novel experimental model of intractable epilepsy. **Synapse**, 3, n. 2, p. 154-171, 1989.

TURSKI, W. A.; CAVALHEIRO, E. A.; SCHWARZ, M.; CZUCZWAR, S. J. *et al.* Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. **Behav Brain Res**, 9, n. 3, p. 315-335, Sep 1983.

UPADHYA, D.; KODALI, M.; GITAI, D.; CASTRO, O. W. *et al.* A Model of Chronic Temporal Lobe Epilepsy Presenting Constantly Rhythmic and Robust Spontaneous Seizures, Co-morbidities and Hippocampal Neuropathology. **Aging Dis**, 10, n. 5, p. 915-936, Oct 2019.

VALENTE, S. G.; NAFFAH-MAZZACORATTI, M. G.; PEREIRA, M.; SILVA, I. *et al.* Castration in female rats modifies the development of the pilocarpine model of epilepsy. **Epilepsy Res**, 49, n. 3, p. 181-188, May 2002.

VAN VLIET, E. A.; ARONICA, E.; GORTER, J. A. Role of blood-brain barrier in temporal lobe epilepsy and pharmacoresistance. **Neuroscience**, 277, p. 455-473, Sep 26 2014.

VELÍŠKOVÁ, J.; DESANTIS, K. A. Sex and hormonal influences on seizures and epilepsy. **Horm Behav**, 63, n. 2, p. 267-277, Feb 2013.

VELÍSKOVÁ, J.; VELÍSEK, L. Beta-estradiol increases dentate gyrus inhibition in female rats via augmentation of hilar neuropeptide Y. **J Neurosci**, 27, n. 22, p. 6054-6063, May 30 2007.

VEZZANI, A.; BALOSSO, S.; RAVIZZA, T. The role of cytokines in the pathophysiology of epilepsy. **Brain Behav Immun**, 22, n. 6, p. 797-803, Aug 2008.

VINCIS, R.; GSCHWEND, O.; BHAUKAURALLY, K.; BEROUD, J. *et al.* Dense representation of natural odorants in the mouse olfactory bulb. **Nature Neuroscience**, 15, n. 4, p. 537-539, 2012/04/01 2012.

WAGNER, R. G.; BOTTOMLEY, C.; NGUGI, A. K.; IBINDA, F. *et al.* Incidence, Remission and Mortality of Convulsive Epilepsy in Rural Northeast South Africa. **PLoS One**, 10, n. 6, p. e0129097, 2015.

WANG, D.; CHEN, Y.; CHEN, Y.; LI, X. *et al.* Improved Separation of Odor Responses in Granule Cells of the Olfactory Bulb During Odor Discrimination Learning. **Front Cell Neurosci**, 14, p. 579349, 2020.

WIGG, C. M.; FILGUEIRAS, A.; GOMES MDA, M. The relationship between sleep quality, depression, and anxiety in patients with epilepsy and suicidal ideation. **Arq Neuropsiquiatr**, 72, n. 5, p. 344-348, May 2014.

WOLPERT, D.; PEARSON, K.; GHEZ, C.; KANDEL, E. *et al.* Principles of neural science. **The Organization and Planning of Movement. 5th ed. New York: McGraw-Hill**, p. 475-497, 2013.

WULSIN, A. C.; FRANCO-VILLANUEVA, A.; ROMANCHECK, C.; MORANO, R. L. *et al.* Functional disruption of stress modulatory circuits in a model of temporal lobe epilepsy. **PLoS One**, 13, n. 5, p. e0197955, 2018.

YI, F.; DECAN, E.; STOLL, K.; MARCEAU, E. *et al.* Muscarinic excitation of parvalbuminpositive interneurons contributes to the severity of pilocarpine-induced seizures. **Epilepsia**, 56, n. 2, p. 297-309, Feb 2015.

YI, F.; XU, H. W.; LONG, L. L.; FENG, L. *et al.* Vulnerability of calbindin-positive interneurons to status epilepticus varies in different regions of rat hippocampus. **Neurochemical Journal**, 8, n. 4, p. 306-310, 2014/10/01 2014.

YU, Y. H.; PARK, D.-K.; YOO, D. Y.; KIM, D.-S. Altered expression of parvalbumin immunoreactivity in rat main olfactory bulb following pilocarpine-induced status epilepticus. **BMB reports**, 53, n. 4, p. 234-239, 2020.

YUAN, M. Y.; CHEN, Z. K.; NI, J.; WANG, T. X. *et al.* Ablation of olfactory bulb glutamatergic neurons induces depressive-like behaviors and sleep disturbances in mice. 237, n. 8, p. 2517-2530, Aug 2020.

ZHANG, J. Q.; CAI, W. Q.; ZHOU, D. S.; SU, B. Y. Distribution and differences of estrogen receptor beta immunoreactivity in the brain of adult male and female rats. **Brain Res**, 935, n. 1-2, p. 73-80, May 10 2002.

ZHOU, G.; LANE, G.; COOPER, S. L.; KAHNT, T. *et al.* Characterizing functional pathways of the human olfactory system. *eLife*, 8, p. e47177, 2019/07/24 2019.

ANEXO

9. ANEXO Anexo 1 - Aprovação do comitê de ética em pesquisa



Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Elucidação do comportamento materno em um modelo pilocarpina da epilepsia", protocolada sob o CEUA nº 8624210118 (10 006679), sob a responsabilidade de **Daniel Matovu** *e equipe; Esper Abrão Cavalheiro* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo (CEUA/UNIFESP) na reunião de 23/02/2018.

We certify that the proposal "Elucidation of maternal behavior in the pilocarpine model of epilepsy", utilizing 280 Heterogenics rats (120 males and 160 females), protocol number CEUA 8624210118 (ID 006679), under the responsibility of **Daniel Matovu** and team; *Esper Abrão Cavalheiro* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Sao Paulo (CEUA/UNIFESP) in the meeting of 02/23/2018.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 03/2018 a 11/2020 Área: Neurociências/neurologia

Origem:	CEDEME - Centro de Desenvolvimento de Modelos E	perimentais par	a Medicina e B	iologia			
Espécie:	Ratos heterogênicos sexo	Fêmeas	idade:	6 a 10 semanas	N:	160	
Linhagem:	Wistar		Peso:	150 a 300 g			
	CEDEME - Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia						
Origem:	CEDEME - Centro de Desenvolvimento de Modelos E	perimentais par	a Medicina e B	iologia			
Origem: Espécie:	CEDEME - Centro de Desenvolvimento de Modelos E Ratos heterogênicos sexo	perimentais par Machos	a Medicina e B idade:	iologia 6 a 10 semanas	N:	120	

Local do experimento: Laboratório de Neurociência, sala de cirurgia, sala de imuno histoquímica, sala de eletrofisiologia.

São Paulo, 24 de setembro de 2020

Monicapaytwalersen

Profa. Dra. Monica Levy Andersen Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais Universidade Federal de São Paulo

Dammesannes.

Profa. Dra. Daniela Santoro Rosa Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais Universidade Federal de São Paulo

Rua Botucatu, 740 - 1º andar - Vila Clementino - CEP 04023-061 - São Paulo/SP - tel: +55 (11) 5576-4848 VOIP 1239 Horário de atendimento: 2º a 6º, das 8h às 12h e das 14h às 17h : e-mail: ceuasecretaria@gmail.com CEUA N 8624210118