

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - LICENCIATURA

Helena Mafra Martins

Indução do modelo de epilepsia do lobo temporal por meio da administração intra-hipocampal de pilocarpina em ratos: avaliação comportamental e efeito protetor da cetamina intranasal

Florianópolis

2022

Helena Mafra Martins

Indução do modelo de epilepsia do lobo temporal por meio da administração intra-hipocampal de pilocarpina em ratos: avaliação comportamental e efeito protetor da cetamina intranasal

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Roger Walz.

Coorientador: Dr. Josiel Mileno Mack.

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Martins, Helena Mafra

Indução do modelo de epilepsia do lobo temporal por meio da administração intra-hipocampal de pilocarpina em ratos: avaliação comportamental e efeito protetor da cetamina intranasal / Helena Mafra Martins ; orientador, Roger Walz, coorientador, Josiel Mileno Mack, 2022.
39 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Epilepsia. 3. Modelo animal de epilepsia. 4. Pilocarpina intra-hipocampal. 5. Cetamina intranasal. I. Walz, Roger. II. Mack, Josiel Mileno. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

Helena Mafra Martins

Indução do modelo de epilepsia do lobo temporal por meio da administração intra-hipocampal de pilocarpina em ratos: avaliação comportamental e efeito protetor da cetamina intranasal

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de Licenciada em Ciências Biológicas e aprovado em sua forma final pelo Curso de Ciências Biológicas.

Florianópolis, 15 de julho de 2022.

Prof. Daniela Cristina de Toni, Dra.
Coordenadora do Curso

Banca examinadora

Prof. Roger Walz, Dr.
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Cristiane Ribeiro de Carvalho, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Hiago Murilo de Melo, Me.
Universidade Federal de Santa Catarina

*Este trabalho é dedicado à minha mãe, Rosimeri
Mafra, que sempre me incentivou e acreditou no meu potencial.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer ao Professor Roger Walz, por me aceitar como aluna do Laboratório de Ciências Médicas, e posteriormente por aceitar me orientar nesse Trabalho de Conclusão de Curso. Acompanhar um pesquisador com tal experiência foi um privilégio e acrescentou muito na minha carreira como cientista.

Ao Dr. Josiel Mileno Mack, meu coorientador neste trabalho, por ter me concedido a oportunidade de fazer essa iniciação científica, por toda a ajuda e paciência, principalmente nos momentos mais difíceis. Obrigada por me entender, me amparar, me ensinar boa parte do que sei hoje e pela amizade incrível que construímos ao longo desse período. Serei eternamente grata.

As minhas companheiras de laboratório e iniciação científica, Júlia e Emily. Obrigada pelo apoio nos experimentos, nos momentos difíceis e por se dedicarem a me ajudar nessa jornada, vocês tornaram essa experiência única.

Agradeço as minhas amigas feitas na Graduação: Roberta, Duda, Sarah, Rafaela, Jéssica, Fernanda, Leonardo, Bernardo e Uriel. Cada um de vocês marcou a minha experiência ao longo da Graduação e teve um papel fundamental para que eu chegasse no lugar que estou hoje. Nunca vou me esquecer dos momentos incríveis, de felicidade, de apoio e também as dificuldades que enfrentamos juntos, uns mais presentes, outros menos, mas cada um foi importante pra mim. Ainda assim, a pessoa que mais me marcou em todos esses anos foi a Roberta, a primeira pessoa que eu tive contato no meu primeiro dia de aula no Curso e a que me salvou muitas vezes, me fazendo não desistir, Obrigada.

As minhas duas amigas que fizeram meus dias na UFSC e fora dela serem muito melhores, Ariela e Carla. Agradeço por todo apoio, todas as conversas, desabafos, conselhos e diversão que tive com vocês.

Agradeço ao meu namorado Yan Wiggers, por estar comigo em todos os momentos, dos mais felizes aos mais difíceis. Seu apoio e paciência de sempre foram fundamentais, principalmente nesse último ano. Ter você comigo tornou tudo mais fácil.

Acima de tudo agradeço a minha família, pela educação que me deu. Agradeço principalmente a minha mãe Rosimeri, minha eterna gratidão por acreditar em mim, me apoiar e me auxiliar de todas as formas possíveis. Agradeço por ter feito o possível e o impossível para que eu chegasse até aqui. Sem você esse trabalho não teria acontecido.

“What is important is to not stop asking questions”. (EINSTEIN, Albert)

RESUMO

A epilepsia é uma doença neurológica caracterizada por episódios de súbita atividade neuronal anormal e exagerada que se repetem periodicamente, as chamadas crises epiléticas. Essas crises podem ser focais, ou generalizadas e se perdurarem por mais de 5 minutos podem ser caracterizadas como *status epilepticus* (SE). A administração de pilocarpina em roedores mimetiza a epilepsia lobo temporal (ELT). Neste modelo, após o SE ocorre um período latente, caracterizado pela ausência de crises, que antecede a fase crônica, quando ocorrem crises espontâneas recorrentes. Durante o período de latência ocorre o processo de epileptogênese em que alterações bioquímicas e estruturais aumentam a susceptibilidade da ocorrência de crises espontâneas, semelhante ao processo que ocorre em humanos após lesões encefálicas que provocam epilepsia. Estudos recentes têm demonstrado alterações comportamentais e bioquímicas durante o período de latência no modelo da pilocarpina. Atualmente, ainda não existem terapias efetivas para impedir a epileptogênese. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo a avaliação das possíveis alterações comportamentais na fase de latência do modelo de epilepsia do lobo temporal induzido pela administração intra-hipocampal de pilocarpina, assim como um possível efeito protetor da administração de cetamina intranasal após o *status epilepticus* em ratos. Após 24 horas da indução do SE, foi administrado cetamina via intranasal nos animais na dose de 10 mg/kg, procedimento o qual foi repetido durante 12 dias consecutivos. Vinte dias após a primeira aplicação de cetamina, foi dado início as avaliações comportamentais: campo aberto (dia 21), labirinto em cruz elevado (dia 23), teste da borrifada de sacarose (dia 25), discriminação olfatória (dia 27) e realocação de objetos (dias 29, 30 e 31). A administração de pilocarpina intra-hipocampal na dose de 1,4mg/sítio e a administração intranasal de cetamina na dose de 10mg/kg não foram capazes de induzir alterações comportamentais significativas nos animais nos testes do campo aberto, labirinto em cruz elevado, borrifada de sacarose, discriminação olfatória e realocação de objetos. Porém, observou-se uma redução de 16% na mortalidade dos animais que receberam cetamina i.n e pilocarpina i.h. Sendo assim, foi realizada a padronização do modelo animal de ELT induzido pela administração intra-hipocampal de pilocarpina, no qual obteve-se alta reprodutibilidade e baixa mortalidade. Demonstrou-se ainda que durante a fase de latência (epileptogênese) os danos neurológicos não são suficientes para provocar alterações comportamentais, ou nossas metodologias não foram suficientemente sensíveis para detectá-las. Finalmente, a administração intranasal de cetamina após o SE demonstrou proteger contra a mortalidade induzida pela pilocarpina. Esse dado torna-se de grande relevância, dado que não existem terapias capazes de atuar na fase de epileptogênese. Dessa forma, mais estudos são necessários para a investigação do efeito protetor da cetamina e seu possível potencial anti-epileptogênico.

Palavras-chave: Cetamina intranasal. Epilepsia. Epileptogênese. Pilocarpina intra-hipocampal. Ratos.

ABSTRACT

Epilepsy is a neurological disease characterized by episodes of sudden abnormal and exaggerated neuronal activity that recur periodically, called epileptic seizures. These seizures can be focal or generalized and if they last for more than 5 minutes they can be characterized as *status epilepticus* (SE). The administration of pilocarpine in rodents mimics temporal lobe epilepsy (TLE). In this model, after SE there is a latent period, characterized by the absence of seizures, which precedes the chronic phase, when recurrent spontaneous seizures occur. During the latency period, the epileptogenesis process occurs in which biochemical and structural changes increase the susceptibility of spontaneous seizures, similar to the process that occurs in humans after brain injuries that cause epilepsy. Recent studies have demonstrated behavioral and biochemical changes during the latency period in the pilocarpine model. There are currently no effective therapies to prevent epileptogenesis. In addition, there is little information in the literature regarding behavioral changes, as well as intranasal administration of ketamine in the latency phase of the intrahippocampal model of pilocarpine. Thus, the aim of the present study is to evaluate the effect of intranasal administration of ketamine on behavioral changes induced by the temporal lobe epilepsy model induced by intrahippocampal administration of pilocarpine in rats. After 24 hours of SE induction, ketamine was administered intranasally to the animals at a dose of 10 mg/kg, a procedure which was repeated for 12 consecutive days. Twenty days after ketamine application, behavioral tests were initiated: open field (day 21), elevated datum plus maze (day 23), splash test (day 25), olfactory discrimination (day 27) and object relocation (29th, 30th and 31st). The administration of intrahippocampal pilocarpine at a dose of 1.4mg/site and the intranasal administration of ketamine at a dose of 10/mg/kg were not able to induce significant behavioral changes in the animals in the open field, elevated plus maze, splash test, olfactory discrimination, and object reallocation tests. However, a 16% reduction in mortality was observed in animals that received i.n. ketamine and i.h. pilocarpine. Therefore, the standardization of the animal model of TLE induced by intra-hippocampal administration of pilocarpine was performed, in which high reproducibility and low mortality were obtained. It was also demonstrated that during the latency phase (epileptogenesis) the neurological damage is not enough to cause behavioral changes, or our methodologies were not sensitive enough to detect them. Finally, intranasal administration of ketamine after SE has been shown to protect against pilocarpine-induced mortality. This data becomes of great relevance, given that there are no therapies capable of acting in the epileptogenesis phase. Thus, further studies are needed to investigate the protective effect of ketamine and its possible anti-epileptogenic potential.

Keywords: Epilepsy. Epileptogenesis. Intranasal ketamine. Intrahippocampal pilocarpine. Rats.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Desenho experimental e protocolos comportamentais usados para a avaliação das alterações induzidas pela administração i.h. de pilocarpina seguidas por i.n de cetamina.	19
Figura 2 - Ilustração do protocolo utilizado no teste da borrifada de sacarose.	23
Figura 3 – Ilustração do aparato utilizado no teste de discriminação olfatória.	24
Figura 4 – Ilustração do protocolo utilizado para a realização do teste de realocação de objetos.....	25
Figura 5 - Efeitos da administração i.h. de pilocarpina e tratamento i.n. com cetamina sobre os parâmetros de locomoção e ansiedade avaliados no teste do campo aberto.	27
Figura 6 - Efeitos da administração i.h. de pilocarpina e tratamento i.n. com cetamina sobre comportamentos relacionados a ansiedade avaliados no teste do labirinto em cruz elevado.....	28
Figura 7 - Efeitos da administração i.h. de pilocarpina e tratamento i.n. com cetamina sobre comportamentos relacionados a anedonia e autocuidado no teste da borrifada de sacarose.	29
Figura 8 - Efeitos da administração i.h. de pilocarpina e tratamento i.n. com cetamina sobre a capacidade olfativa dos animais no teste de discriminação olfatória.....	30
Figura 9 - Efeitos da administração i.h. de pilocarpina e tratamento i.n. com cetamina sobre a memória espacial de longo prazo no teste de realocação de objetos.	31
Figura 10 - Efeitos da administração i.h. de pilocarpina e tratamento i.n. com cetamina sobre a mortalidade entre os grupos.	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

CA1: Corno de Ammon 1

EEG: Eletroencefalograma

ELT: Epilepsia do Lobo Temporal

FDA: Food and Drug Administration

LCE: Labirinto em Cruz Elevado

i.h.: intra-hipocampal

i.n.: Intranasal

i.p.: Intraperitoneal

NMDA: N-metil-D-aspartato

s.c.: Subcutâneo

SE: *Status Epilepticus*

UFSC: Universidade Federal de Santa Catarina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	OBJETIVOS	17
1.1.1	Objetivo Geral.....	17
1.1.2	Objetivos Específicos	17
2	MATERIAL E MÉTODOS	18
2.1	ANIMAIS	18
2.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	18
2.2.1	Cirurgia estereotáxica	20
2.2.2	Administração intra-hipocampal de pilocarpina.....	20
2.2.3	Administração intranasal de cetamina	21
2.3	AVALIAÇÕES COMPORTAMENTAIS.....	22
2.3.1	Campo aberto.....	22
2.3.2	Labirinto em cruz elevado	22
2.3.3	Teste da borrifada de sacarose	23
2.3.4	Discriminação olfatória	23
2.3.5	Realocação de objetos.....	24
2.4	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	25
3	RESULTADOS	26
3.1	PADRONIZAÇÃO DAS COORDENADAS ESTEREOTÁXICAS.....	26
3.2	CURVA DOSE-RESPOSTA DE PILOCARPINA INTRA-HIPOCAMPAL	26
3.3	TESTES COMPORTAMENTAIS	26
3.3.1	Teste do Campo Aberto.....	26
3.3.2	Teste do labirinto em cruz elevado.....	28
3.3.3	Teste da borrifada de sacarose	29
3.3.4	Teste de discriminação olfatória	30

3.3.5	Teste de realocação de objetos.....	30
3.3.6	Mortalidade.....	31
4	DISCUSSÃO	33
5	CONCLUSÃO.....	37
	REFERÊNCIAS.....	38

1 INTRODUÇÃO

A epilepsia é uma doença que caracteriza-se pela ocorrência espontânea e recorrente de episódios breves ou prolongados de atividade neuronal excessiva, devido a um estado de hiperexcitabilidade neuronal e hipsincronia. Essas alterações nas descargas neuronais geram as crises que podem ser localizadas, chamadas crises focais, compreendendo um dos hemisférios cerebrais, ou difusa, crises generalizadas que ocorrem quando ambos os hemisférios cerebrais são atingidos. Pode-se dividir, ainda, as crises em diversos tipos, dependendo do estado de consciência do indivíduo e do comprometimento do hemisfério (FISHER *et al.*, 2005). A ocorrência mais duradoura (5 minutos ou mais) de descargas epiléticas é descrita como *status epilepticus* (SE), o qual pode ser convulsivo ou não-convulsivo, podendo ser detectado por meio de alterações no registro do eletroencefalograma (EEG) (MADER JR *et al.*, 2012). Ademais, a perda neuronal, em especial no hipocampo, é um achado comum na Epilepsia do Lobo Temporal (ELT) e associada à gliose – condição comumente denominada de esclerose hipocampal que ocorre principalmente devido a excitotoxicidade celular por consequência do aumento de glutamato na fenda sináptica após o *status epilepticus* (COSTA *et al.*, 2004).

A administração de pilocarpina em roedores mimetiza a ELT de humanos. Esse modelo foi desenvolvido em 1983 por Turski e colaboradores, sendo, atualmente um dos mais utilizados modelos de epilepsia, tendo em vista que suas características histológicas, bioquímicas, farmacológicas, eletrofisiológicas e comportamentais reproduzem, similarmente as encontradas em humanos portadores de ELT (TURSKI *et al.*, 1989). A pilocarpina é um alcaloide extraído da planta Jaborandi, que é uma angiosperma da família das Rutáceas sendo a *Pilocarpus microphyllus* a espécie que mais produz o alcaloide e pode ser encontrada, principalmente, no norte do Brasil (PINHEIRO, 1997).

Em modelos experimentais a administração de pilocarpina em altas doses por via intraperitoneal (acima de 300 mg/kg) promove episódios comportamentais de ordem epileptogênica, os quais são associados a alterações eletrográficas (nos registros no EEG) que aumentam progressivamente na sua duração e dispersão (A CAVALHEIRO *et al.*, 1991). A Recentemente tem sido descrita uma alternativa para o modelo da pilocarpina sistêmica: a administração de pilocarpina intra-hipocampal. A administração de pilocarpina intra-hipocampal induz o *status epilepticus* com uma eficiência maior do que a administração

sistêmica, com a vantagem de reduzir drasticamente a mortalidade e os efeitos periféricos (FURTADO *et al.*, 2011, 2002).

Nos modelos experimentais de epilepsia induzida pela pilocarpina, após a indução do SE, ocorre um período latente, onde não ocorrem crises, seguido pelo surgimento de crises espontâneas recorrentes (A CAVALHEIRO *et al.*, 1991); promoção de lesões esparsas no encéfalo, sendo algumas delas localizadas nos mesmos locais afetados em humanos e associadas à reorganização da rede neural em regiões hipocâmpais (WIESER, 2004). Durante o período de latência, os animais que apresentaram o *status epilepticus* após a administração sistêmica de pilocarpina exibem diversas alterações comportamentais. Estudos demonstraram déficits relacionados à memória espacial, depressão e ansiedade, que em muito se assemelham a alterações em pacientes epiléticos (FURTADO *et al.*, 2002; MÜLLER *et al.*, 2009).

Lopes e colaboradores (2016) avaliaram alterações comportamentais durante o período de latência em ratos submetidos ao modelo de ELT induzido pela pilocarpina. Os animais apresentaram déficits na memória social de curto prazo; uma disfunção das habilidades olfatórias, assim como ocorre nos pacientes acometidos pela ELT e um comportamento do tipo ansioso também foi evidenciado no teste do labirinto em cruz elevado.

O tratamento farmacológico tem como principal objetivo interpor as crises através da administração de fármacos antiepiléticos, embora apresente-se ineficaz em 30% dos pacientes, sendo a grande parte desses indivíduos acometidos pela ELT associada à esclerose do hipocampo (LÖSCHER, 2002). Além disso, até o momento, não existem terapias eficazes para inibir a epileptogênese, evitando que o indivíduo que sofreu uma lesão inicial desenvolva a epilepsia (BRAUN, 2017; CHANG *et al.*, 2019). Nesse sentido, alguns estudos apontam que a cetamina, um antagonista não competitivo dos receptores glutamatérgicos N-metil-D-aspartato (NMDA), apresenta atividade antiepilética em pacientes e em estudos com modelos animais (FANG; WANG, 2015; SYNOWIEC *et al.*, 2013). Por outro lado, Clements e colaboradores (1982) demonstraram que a administração de cetamina por via oral em pacientes com epilepsia apresenta baixa biodisponibilidade e baixa eficácia na redução das crises epiléticas.

A via intranasal para administração de fármacos tem surgido como uma possível alternativa à via oral, principalmente, quando trata-se de fármacos de ação central. Essa via apresenta vantagens pelo contato do fármaco com as terminações nervosas dos nervos olfatório (I) e trigêmio (V), que podem realizar o transporte de substâncias de forma retrógrada. A

cavidade nasal é altamente vascularizada e transporta substâncias para a circulação sistêmica sem o metabolismo hepático de primeira passagem (LOCHHEAD; THORNE, 2012). Recentemente, a cetamina intranasal foi aprovada pelo Food and Drug Administration (FDA) em 2019 para quadros de depressão resistente a medicação regular.

Tendo-se em vista a atividade de inibição glutamatérgica apresentada pela cetamina, um mecanismo importante para inibição da epileptogênese, o presente projeto objetiva avaliar o efeito da administração intranasal de cetamina durante a fase de latência (epileptogênese) sobre alterações comportamentais e bioquímicas no modelo de epilepsia do lobo temporal induzida pela administração intra-hipocampal de pilocarpina em ratos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar as possíveis alterações comportamentais na fase de latência do modelo de epilepsia do lobo temporal induzido pela administração intra-hipocampal de pilocarpina, assim como um possível efeito protetor da administração de cetamina intranasal em ratos.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Realizar a padronização da cirurgia estereotáxica, ajustando as coordenadas para o implante de cânula guia no CA1 do hipocampo direito dos animais;
- Avaliar o efeito de diferentes doses de pilocarpina intra-hipocampal quanto a indução de *status epilepticus*;
- Investigar a mortalidade induzida pela administração intra-hipocampal de diferentes doses de pilocarpina;
- Avaliar o efeito da administração de cetamina intranasal sobre comportamentos relacionados à:
 - Locomoção e ansiedade: teste do campo aberto;
 - Comportamentos tipo depressivos: teste da borrifada de sacarose;
 - Ansiedade: teste do labirinto em cruz elevado;
 - Capacidade olfativa dos animais: teste da discriminação olfatória;
 - Memória espacial: teste da realocação de objetos.

- Investigar o efeito da administração de cetamina intranasal sobre a mortalidade induzida pela administração intra-hipocampal de pilocarpina.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos adultos, com idade aproximada de 2 a 3 meses, com peso entre 200-300 g. Os animais foram cedidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina e acondicionados em biotério local (Laboratório de Ciências Médicas) com temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) em número de 3 a 4 animais por caixa, com ração e água *ad libitum* e com um ciclo claro-escuro de 12 h (luzes acesas às 7:00). Todos os procedimentos experimentais foram realizados no período da tarde (entre 13:00-18:00 h). O projeto foi previamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o número 3033210521.

2.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

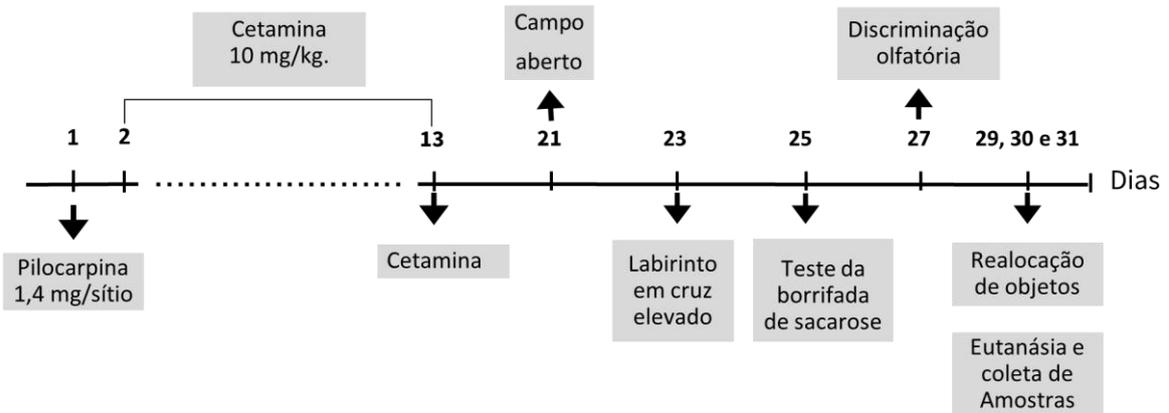
Experimento 1: Curva dose-resposta de pilocarpina intra-hipocampal. Para a avaliação da indução do modelo de epilepsia do lobo temporal por meio da administração intra-hipocampal de pilocarpina os animais foram, primeiramente, submetidos à cirurgia estereotáxica para o implante de cânulas guia no hipocampo direito, após 5 dias de recuperação, foram separados em 4 grupos: pilocarpina intra-hipocampal em 3 diferentes doses (1, 1,4 e 2 mg/sítio), veículo intra-hipocampal (1 μL /sítio). Após a administração da pilocarpina ou veículo, os animais foram submetidos a avaliações para caracterização do *status epilepticus* e a mortalidade induzida pelo modelo foi registrada.

Experimento 2: Para investigação do efeito da cetamina intranasal sobre os déficits comportamentais induzidos pelo modelo de ELT os animais foram divididos em 4 grupos:

- **Grupo Controle:** Veículo i.h. + Salina i.n. (10 μL /narina);
- **Grupo Cetamina:** Veículo i.h. + Cetamina i.n. (10 mg/kg);
- **Grupo Pilocarpina:** Pilocarpina i.h. 1,4 mg/sítio + Salina i.n. (10 μL /narina);
- **Grupo Pilo + Cet:** Pilocarpina i.h. 1,4 mg/sítio + Cetamina i.n. (10 mg/kg);

A dose de pilocarpina utilizada nesse experimento foi selecionada no Experimento 1 e como controle da atividade da cetamina foi utilizada a administração de solução salina 0,9%. Após 24 horas da indução do SE, foi administrado cetamina via intranasal nos animais na dose de 10 mg/kg (CHANG *et al.*, 2019), procedimento o qual foi repetido durante 12 dias consecutivos. O dia da administração de pilocarpina e foi considerado como dia 1. Posteriormente, 20 dias após a primeira aplicação de cetamina, foi dado início as avaliações comportamentais: campo aberto (dia 21), labirinto em cruz elevado (dia 23), teste da borrifada de sacarose (dia 25), discriminação olfatória (dia 27) e realocação de objetos (dias 29, 30 e 31). Após o término das avaliações comportamentais foram coletadas amostras de hipocampo, amígdala, estriado, bulbo olfatório e córtex pré-frontal para futuras análises bioquímicas. Foram realizados registros da mortalidade dos diferentes grupos para posterior análise estatística da sobrevivência.

Figura 1: Desenho experimental e protocolos comportamentais usados para a avaliação das alterações induzidas pela administração i.h. de pilocarpina seguidas por i.n. de cetamina.



Legenda: linha do tempo representando a administração i.h. de pilocarpina, a duração da administração i.n. de cetamina e a distribuição temporal das avaliações comportamentais e coleta de amostras.

2.2.1 Cirurgia estereotáxica

Para definição das coordenadas, primeiramente, utilizou-se os parâmetros disponibilizados no atlas Paxinos e na literatura (FURTADO et al., 2002; PAXINOS; WATSON, 2007). Os animais foram pesados e em seguida anestesiados com uma mistura de cetamina 75-100 mg/kg e xilazina 10 mg/kg, intraperitoneal, e tramadol 2 mg/kg, subcutâneo. Após a perda dos tónus muscular foi feita a tricotomia da cabeça e o animal foi colocado no aparelho estereotáxico sobre uma placa de calor (para manter a temperatura corporal). Com o rato devidamente fixado ao aparelho foi feita a assepsia da pele do crânio (com solução de clorexidina 2%) em seguida foi feita uma injeção subcutânea de anestésico local (0,2 ml/s.c. lidocaína 3% com adrenalina 1:5000) no local da incisão. Após a raspagem e exposição do perióstio o crânio foi perfurado para a inserção das cânulas guia de aço inoxidável (22 gauge de calibre e 8 mm de comprimento) de acordo com as respectivas coordenadas (AP= - 5,5 mm, ML= 4,0 mm e DV= 3,5 mm) obtidas de acordo com o atlas (PAXINOS; WATSON, 2007) para implantação no CA1 do hipocampo direito. As cânulas foram fixadas ao crânio com parafusos e cimento acrílico dental (JET Artigos Odontológicos Clássico Ltda., SP, Brasil). Foi inserido um mandril de aço inoxidável (0,25 mm de diâmetro) dentro da cânula guia para impedir a sua obstrução. No final da cirurgia, cada animal recebeu uma injeção i.p. de solução salina (até 1 ml) ligeiramente aquecida para prevenir hipotermia e desidratação. Em seguida, foi colocado em uma caixa forrada com papel e mantido em um local reservado e aquecido com aquecedor elétrico até a sua completa recuperação da anestesia (1-2h). A analgesia pós cirúrgica imediata consistiu na administração de meloxicam 2 mg/kg, por via subcutânea. Posteriormente, os animais receberam ibuprofeno 200 mg/kg, por via oral, a cada 12 horas, durante 3 dias. Os animais operados foram submetidos à administração de pilocarpina aproximadamente 5 dias após a cirurgia e os seus respectivos testes comportamentais, 25 dias após a cirurgia.

2.2.2 Administração intra-hipocampal de pilocarpina

Os ratos receberam a administração de pilocarpina intra-hipocampal em 3 diferentes doses (1, 1,4 e 2 mg/sítio) em um volume de 1 μ L, com o auxílio de uma micro-seringa (Hamilton, USA) através da cânula guia implantada como descrito anteriormente. A avaliação

comportamental das crises ocorreu por 2h após a injeção de pilocarpina através da análise de vídeos por um observador cego ao tratamento, de acordo com a escala de Racine, com escores de severidade 0-7 (DE CARVALHO *et al.*, 2016): 0 = comportamento normal; 1 animal fica subitamente imóvel e/ou com olhar fixo, imóvel; 2 = estereotípias (espasmos faciais com movimento de focinho e/ou olho); 3 = wet dog shakes, abalos e/ou espasmos na região do pescoço e trapézio; 4 mioclonias esporádicas nas patas dianteiras na posição sentado; 5 = convulsões incluindo crises clônicas e/ou tônico-clônicas enquanto em decúbito ventral e/ou crises tônicas; 6 convulsões incluindo crises clônicas e/ou tônico-clônicas enquanto em decúbito lateral e/ou perda de reflexo postural e/ou apresentando saltos; 7 óbito durante a observação em até 2h. Após desenvolverem o *status epilepticus* os animais receberam uma injeção de diazepam (4 mg/kg i.p.) a fim de reduzir a excitabilidade neuronal e manter um bloqueio residual das crises epiléticas (KOW *et al.*, 2014). Os animais que não desenvolveram o *status epilepticus* em até 2 horas foram excluídos do estudo e eutanasiados.

2.2.3 Administração intranasal de cetamina

Vinte quatro horas pós a administração de pilocarpina, foi iniciado o tratamento com cetamina intranasal, na dose de 10 mg/kg (CHANG *et al.*, 2019), durante 12 dias consecutivos. Os animais foram retirados randomicamente das suas respectivas caixas e levemente contidos com a ajuda de uma flanela. Para a administração, uma pipeta contendo a cetamina foi posicionada tocando levemente a narina dos animais e foram sendo liberadas pequenas gotículas pela ponteira da pipeta, fazendo com que fossem aspiradas pelos animais naturalmente durante a respiração, totalizando 20 μ L por narina.

2.3 AVALIAÇÕES COMPORTAMENTAIS

2.3.1 Campo aberto

A avaliação da locomoção espontânea dos animais foi realizada utilizando-se o teste do campo aberto, como descrito previamente (PREDIGER *et al.*, 2008). O aparato é feito em acrílico, com paredes transparentes e chão na cor cinza, medindo 100 cm x 100 cm x 40 cm. Os animais foram colocados individualmente no centro do campo aberto para explorar livremente o aparato durante 5 minutos. Os comportamentos realizados pelos animais durante o período que permanecem no aparato foram gravados a partir de um sistema de monitoramento por uma câmera localizada perpendicularmente ao centro do aparato. As medidas de distância total percorrida, número de entradas no centro e tempo de permanência no centro do aparato, assim como os mapas de percurso e ocupação foram realizadas com o auxílio do software ANYmaze[®] (Stoelting, EUA).

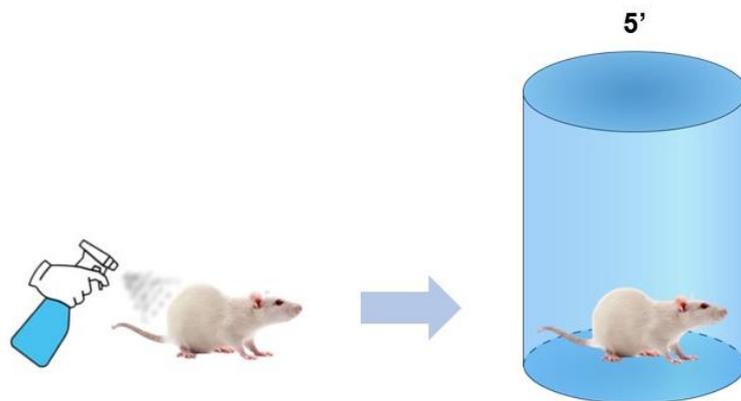
2.3.2 Labirinto em cruz elevado

O aparato de labirinto em cruz elevado (LCE) é feito de madeira e consiste em dois braços abertos opostos (50 cm x 10 cm) e dois braços fechados opostos (50 cm x 10 cm x 30 cm) montados num ângulo de 90°, todos voltados para uma plataforma central (10 cm x 10 cm), elevado a 40 cm do chão. Para evitar quedas, os braços abertos possuem uma borda de 1 cm de altura. O aparelho foi colocado numa pequena sala fechada iluminada por uma luz branca de intensidade 30 lux. Cada rato foi colocado individualmente na plataforma central de frente para um braço fechado. A frequência de entradas em braços abertos ou fechados, bem como o tempo gasto em cada tipo de braço foram registrados (em segundos) durante 5 minutos. O aparelho foi limpo com solução de etanol a 10% entre as sessões.

2.3.3 Teste da borrifada de sacarose

O teste foi realizado com iluminação ambiente de baixa intensidade (30 lux). O procedimento consiste em esguichar por duas vezes uma solução de sacarose 10% sobre o dorso dos animais. Em seguida, os animais foram colocados sob um cilindro de acrílico transparente para a avaliação comportamental. Devido à sua viscosidade, a solução de sacarose se adere à pelagem dos ratos e estes iniciam o comportamento de autolimpeza. Posteriormente, os animais foram avaliados por um período de 5 minutos, registrando o tempo de autolimpeza direcionado ao dorso como uma medida de autocuidado e comportamento motivacional. Após o fim de cada teste, o cilindro de acrílico foi limpo com uma solução de etanol 10% e seco com papel toalha. O teste avalia uma forma de comportamento motivacional considerado semelhante com alguns sintomas de anedonia e apatia (WILLNER, 2005).

Figura 2 - Ilustração do protocolo utilizado no teste da borrifada de sacarose.



Legenda: Representação do protocolo utilizado no teste da borrifada de sacarose, com a primeira etapa onde a sacarose a 10% é borrifada no dorso do animal e em seguida representando-o já transferido para um cilindro de acrílico. Fonte: a autora (2022).

2.3.4 Discriminação olfatória

Para avaliar a capacidade olfatória dos animais foi realizado o teste de discriminação olfatória, que foi descrito por Soffié e Lamberty (1988) e adaptado por Prediger e colaboradores (2005). O teste é realizado em um aparato de acrílico preto, dividido em 2 compartimentos (30 x 30 x 20cm) conectados entre si por uma abertura (suficiente para a passagem dos animais) na divisória de acrílico. Os compartimentos foram classificados como Familiar e Não-familiar,

conforme o tipo de maravalha acomodada em cada um. No compartimento denominado Familiar foi colocada maravalha suja, advinda da caixa onde o próprio animal esteve durante 72 h, já no compartimento Não-familiar foi colocada maravalha limpa. Para a realização do teste os animais foram colocados no compartimento Não-familiar com a cabeça virada para o Familiar, ultrapassando o limite da abertura entre os compartimentos. Foram avaliados o tempo de estadia dos animais em ambos os compartimentos e o número de cruzamentos de um compartimento para o outro durante 5 minutos. Após cada avaliação o aparato foi limpo com etanol a 10% e ambas as maravalhas foram repostas para a avaliação seguinte.

Figura 3 – Ilustração do aparato utilizado no teste de discriminação olfatória.



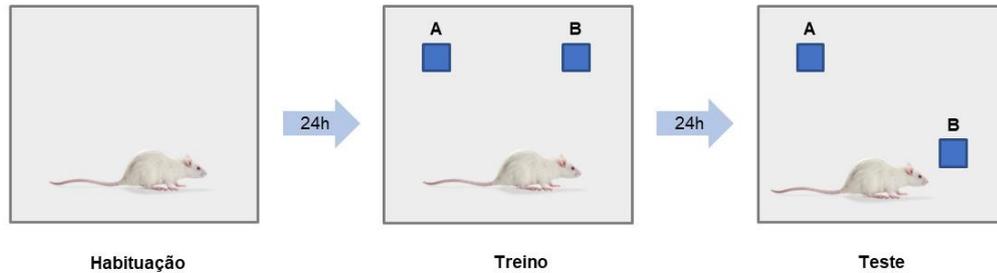
Legenda: Representação do aparato utilizado no teste de discriminação olfatória com seus respectivos compartimentos Familiar e Não-familiar e a abertura na divisória entre eles. Fonte: a autora (2022).

2.3.5 Realocação de objetos

A tarefa de realocação de objetos foi realizada em uma caixa de campo aberto (100 cm x 100 cm x 40 cm). Os objetos utilizados na tarefa foram constituídos de plástico, com formatos e cores distintas. O protocolo foi realizado em três etapas: habituação, apresentação dos objetos e teste. A habituação ao campo aberto ocorreu no dia 1, onde os animais foram colocados individualmente no campo aberto e exploraram livremente o aparato na ausência de objetos por 15 minutos. No dia seguinte (dia 2), os animais foram submetidos à apresentação de 2 objetos idênticos. Nesta etapa os animais foram individualmente colocados no campo aberto de costas para os dois objetos (nomeados de A e B), para que explorassem livremente durante 10 minutos. No dia seguinte (dia 3) o objeto B foi realocado a 20 centímetros de distância, de sua posição

original e o tempo de exploração em cada objeto foi registrado durante 5 minutos (adaptado de ASSINI; DUZZIONI; TAKAHASHI, 2009).

Figura 4 – Ilustração do protocolo utilizado para a realização do teste de realocação de objetos.



Legenda: Representação do aparato e objetos utilizados durante o teste de realocação de objetos, bem como as respectivas posições dos objetos A e B no dia do treino e teste do comportamento, ambos com 24 h de intervalo entre si. Fonte: a autora (2022).

2.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados serão inicialmente analisados quanto à distribuição normal por meio do teste Kolmogorov-Smirnov. Confirmada a distribuição normal, os dados comportamentais foram avaliados por ANOVA (Análise de variância) de duas vias, seguida pelo teste *post-hoc* Newman Keuls. Os dados de mortalidade foram avaliados pelo teste de Log-rank (Mantel-Cox). Valores de $p < 0,05$ serão considerados estatisticamente significativos.

3 RESULTADOS

3.1 PADRONIZAÇÃO DAS COORDENADAS ESTEREOTÁXICAS

O primeiro passo para a realização do projeto foi a padronização das coordenadas estereotáxicas para atingir a estrutura encefálica necessária; o CA1 do hipocampo. Imediatamente após o implante da cânula guia, com os animais ainda anestesiados realizou-se a infusão de 2 μ L de uma solução de azul de metileno. Após a infusão do corante os animais foram eutanasiados e seus encéfalos foram removidos para conferência da localização da cânula guia. Com esse registro foi possível a realização dos ajustes necessários aos parâmetros fornecidos pela literatura. As coordenadas para acessar o CA1 do hipocampo dos animais foram definidas como: médio-lateral 4,4 mm; anteroposterior -5,0 mm e dorsoventral 3,5 mm.

3.2 CURVA DOSE-RESPOSTA DE PILOCARPINA INTRA-HIPOCAMPAL

Após a padronização da cirurgia estereotáxica, procedeu-se com a padronização da dose capaz de induzir o *Status Epilepticus* (SE) nos animais com o mínimo de mortalidade, com a intenção de aprimorar o modelo tradicional de pilocarpina administrada sistemicamente, o qual produz alta mortalidade. Utilizamos inicialmente a dose de 2 mg/sítio, a qual induziu o SE em 100% dos animais (8 animais), mas induziu a mortalidade de 12,5% (1 animal). Com a redução da dose para 1,4 mg/sítio, houve a indução de SE em 100% dos animais (8 animais), sem nenhuma mortalidade. Reduzindo-se ainda mais a dose para 1mg/sítio houve a indução de SE em apenas 50% dos animais, sem mortalidade. Assim, a dose de 1,4 mg/sítio foi definida como a dose de pilocarpina a ser utilizada nesse estudo.

3.3 TESTES COMPORTAMENTAIS

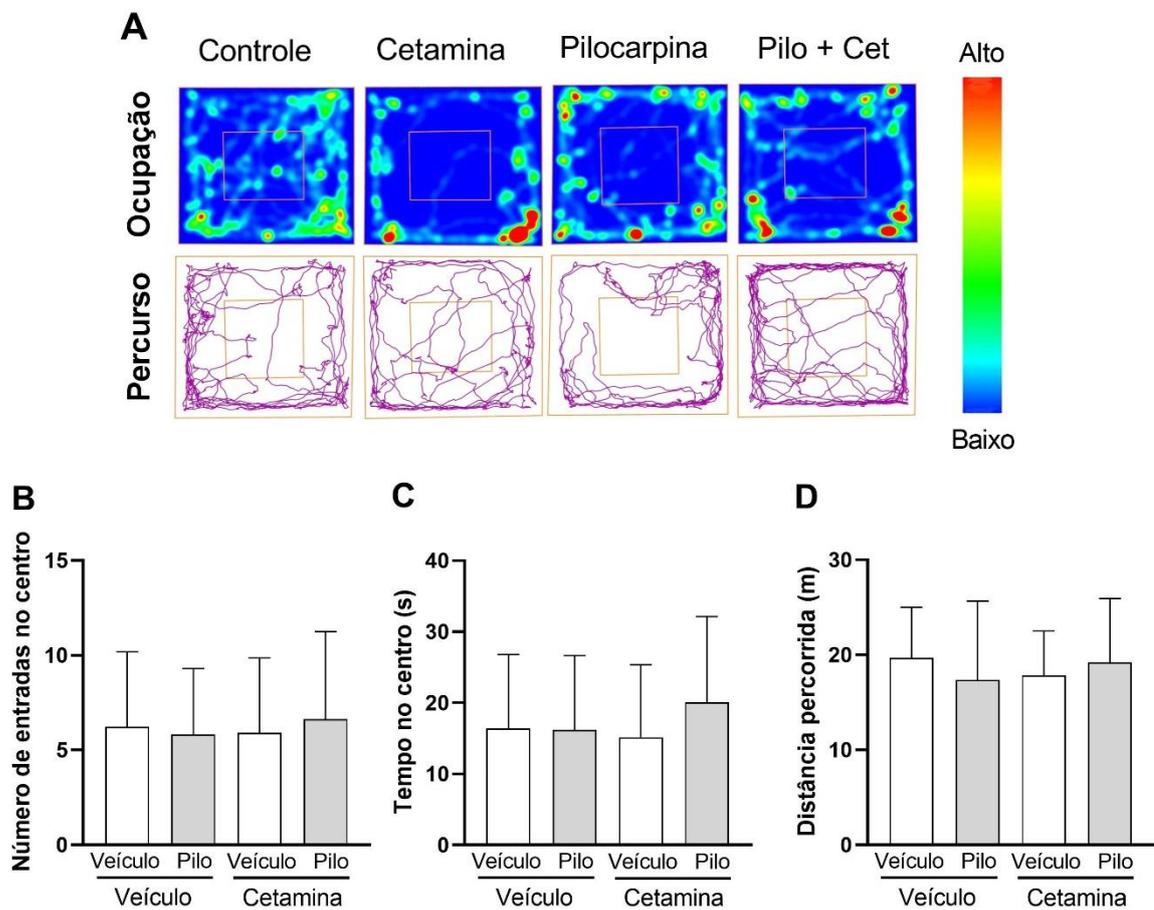
3.3.1 Teste do Campo Aberto

No teste do Campo Aberto (Figura 5) não houve diferença significativa entre os grupos experimentais no parâmetro distância percorrida ($p > 0,05$), indicando assim que a

administração de pilocarpina, bem como o tratamento com a administração de cetamina intranasal, não provocaram alterações na locomoção desses animais.

A ANOVA de duas vias também não indicou diferença significativa entre os grupos nos parâmetros de comportamento do tipo ansioso como o número de entradas no centro e o tempo que os animais permaneceram no centro do aparato, mostrando assim que a administração intra-hipocampal de pilocarpina não altera a locomoção dos animais no período de latência do modelo.

Figura 5 - Efeitos da administração i.h. de pilocarpina e tratamento i.n. com cetamina sobre os parâmetros de locomoção e ansiedade avaliados no teste do campo aberto.

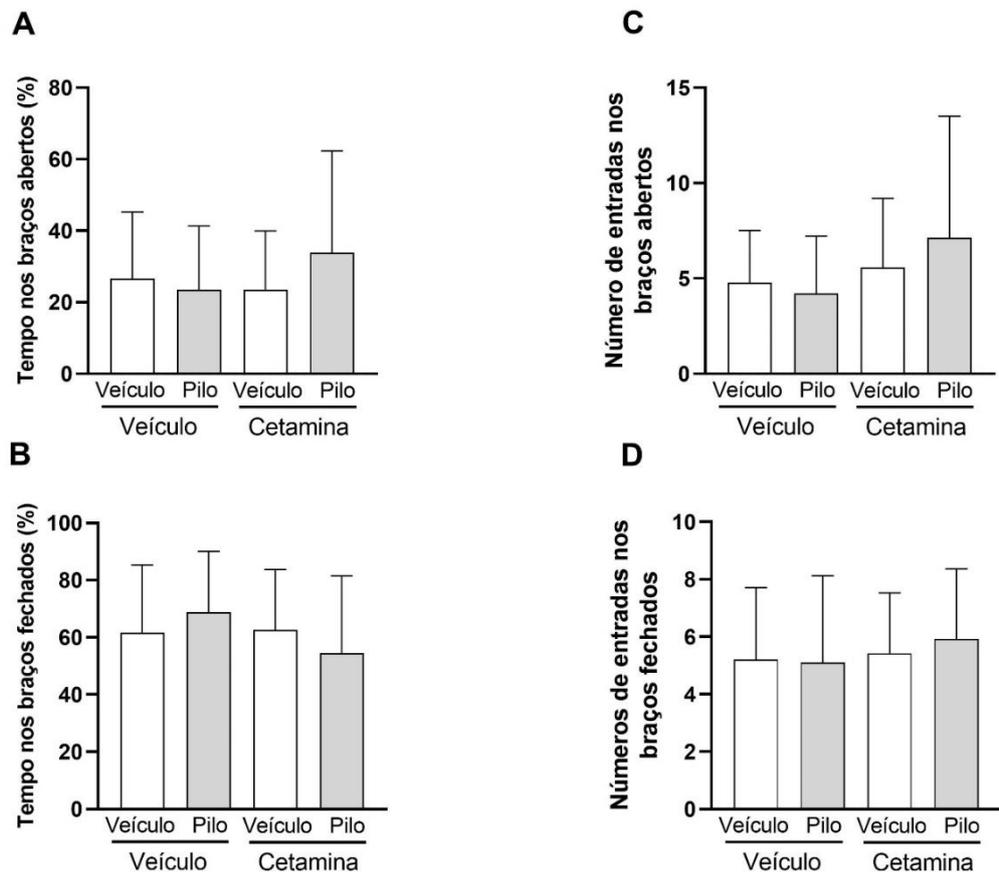


Legenda: Vinte e quatro horas após a indução do *Status Epilepticus* com pilocarpina intra-hipocampal, foi iniciado o tratamento com cetamina (10 mg/kg/dia, i.n.) ou veículo (20 μ L/narina/dia), o qual foi repetido por 12 dias consecutivos). Oito dias após a última administração os animais foram submetidos ao teste do campo aberto. Figuras representativas da ocupação e do percurso no teste do campo aberto (A), número de entradas no centro do aparato (B), tempo no centro (C), distância percorrida (D). n= 9-12/grupo. Os dados representam a média \pm D.P.

3.3.2 Teste do labirinto em cruz elevado

Na Figura 6 estão apresentados os resultados obtidos no teste do labirinto em cruz elevado. Como pode-se observar nas figuras 6A e 6C, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos avaliados no número de entradas nem no tempo nos braços abertos, bem como no número de entradas e no tempo nos braços fechados nas figuras 6B e 6D. Esse resultado indica que o modelo de ELT utilizado, assim como o tratamento com cetamina, não foram capazes de induzir alterações no comportamento tipo ansioso na fase do modelo avaliada.

Figura 6 - Efeitos da administração i.h. de pilocarpina e tratamento i.n. com cetamina sobre comportamentos relacionados a ansiedade avaliados no teste do labirinto em cruz elevado.

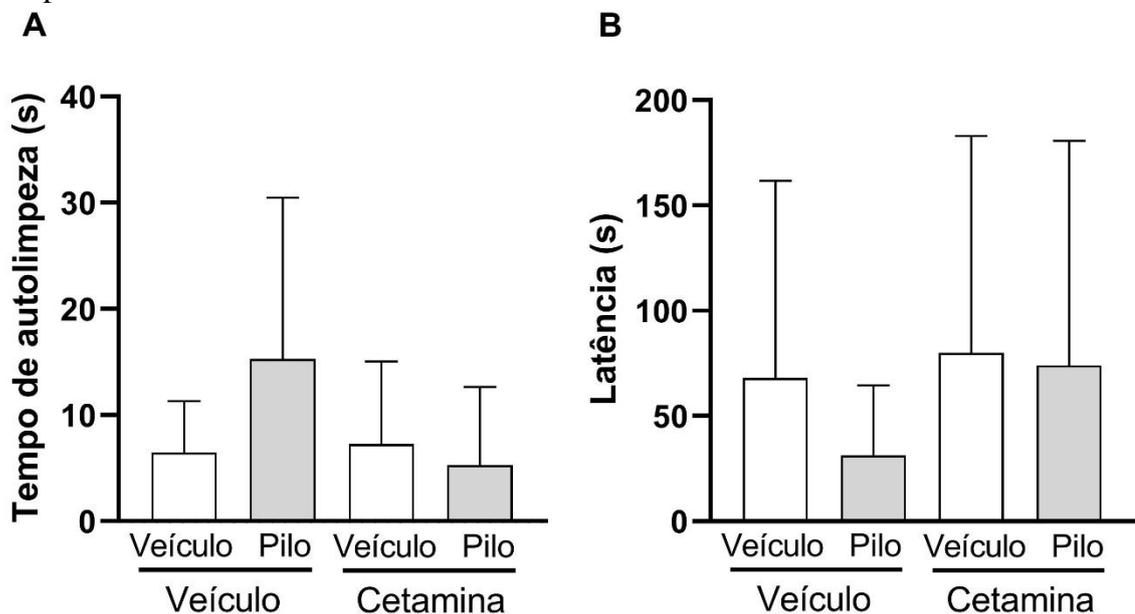


Legenda: Vinte e quatro horas após a indução do *Status Epilepticus* com pilocarpina intra-hipocampal, foi iniciado o tratamento com cetamina (10 mg/kg/dia, i.n.) ou veículo (20 μ L/narina/dia), o qual foi repetido por 12 dias consecutivos. Dez dias após a última administração os animais foram submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado. Tempo de permanência nos braços abertos (A), Tempo de permanência nos braços fechados (B), número de entradas nos braços abertos (C), número de entradas nos braços fechados (D). $n = 9-12$ /grupo. Os dados representam a média + D.P.

3.3.3 Teste da borrifada de sacarose

O Teste da borrifada de sacarose foi utilizado para a avaliação do componente anedônico do comportamento tipo depressivo nos animais. Como pode-se observar (Fig. 7), embora houve uma variação entre os grupos Controle e Pilocarpina de 141% no parâmetro de tempo de autolimpeza (Fig. 7A) e de 54,41% no parâmetro latência (Fig. 7B), a análise estatística não demonstrou diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos avaliados.

Figura 7 - Efeitos da administração i.h. de pilocarpina e tratamento i.n. com cetamina sobre comportamentos relacionados a anedonia e autocuidado no teste da borrifada de sacarose.

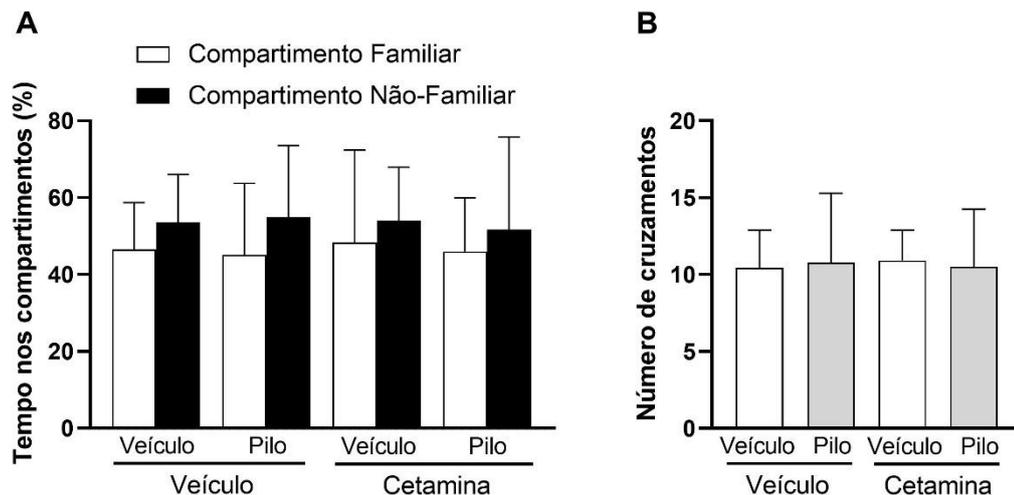


Legenda: Vinte e quatro horas após a indução do *Status Epilepticus* com pilocarpina intra-hipocampal, foi iniciado o tratamento com cetamina (10 mg/kg/dia, i.n.) ou veículo (20 μ L/narina/dia), o qual foi repetido por 12 dias consecutivos. Doze dias após a última administração os animais foram submetidos ao teste da borrifada de sacarose. Tempo realizando a autolimpeza (A) Tempo de latência para a realização da autolimpeza (B). n= 9-12/grupo. Os dados representam a média + D.P.

3.3.4 Teste de discriminação olfatória

Na figura 8 estão apresentados os dados obtidos no teste de discriminação olfatória. Na Figura 8A observa-se que os grupos avaliados não apresentaram preferência pelo compartimento familiar, o que é indicado pela falta de diferença significativa ($p > 0,05$) entre o percentual de tempo de permanência no compartimento familiar e o valor teórico de 50%. Corroborando os dados obtidos no teste do campo aberto, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos experimentais no parâmetro número de cruzamentos (Fig. 8B), demonstrando que na fase de latência do modelo de ELT utilizado não há alteração de locomoção, e o tratamento com cetamina também não provocou alterações nesse parâmetro.

Figura 8 - Efeitos da administração i.h. de pilocarpina e tratamento i.n. com cetamina sobre a capacidade olfativa dos animais no teste de discriminação olfatória.



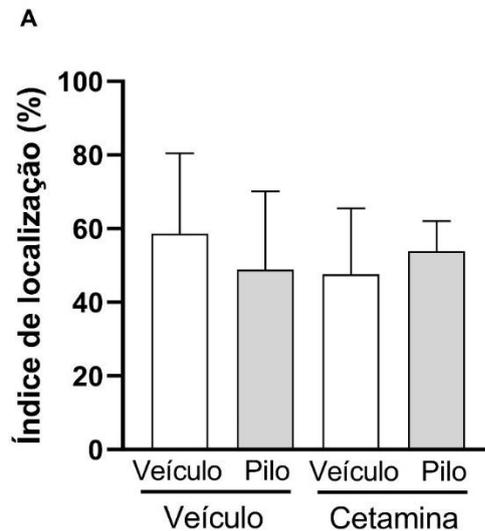
Legenda: Vinte e quatro horas após a indução do *Status Epilepticus* com pilocarpina intra-hipocampal, foi iniciado o tratamento com cetamina (10 mg/kg/dia, i.n.) ou veículo (20 μ L/narina/dia), o qual foi repetido por 12 dias consecutivos. Quatorze dias após a última administração os animais foram submetidos ao teste de discriminação olfatória. Tempo gasto nos compartimentos Familiar (A – colunas brancas) e Não-Familiar (A – colunas pretas) e número de cruzamentos (B). $n = 9-12$ /grupo. Os dados representam a média + D.P.

3.3.5 Teste de realocação de objetos

No teste de realocação de objetos, na figura 9, pode-se observar a partir do índice de localização na figura 9A, que os grupos não diferiram no tempo de exploração entre o objeto B (realocado) e o objeto A ($p > 0,05$), quando comparados ao grupo controle. Sendo assim, o

modelo de ELT utilizado, bem como o tratamento com a cetamina, não foram capazes de alterar a memória espacial de longo prazo dos animais.

Figura 9 - Efeitos da administração i.h. de pilocarpina e tratamento i.n. com cetamina sobre a memória espacial de longo prazo no teste de realocação de objetos.

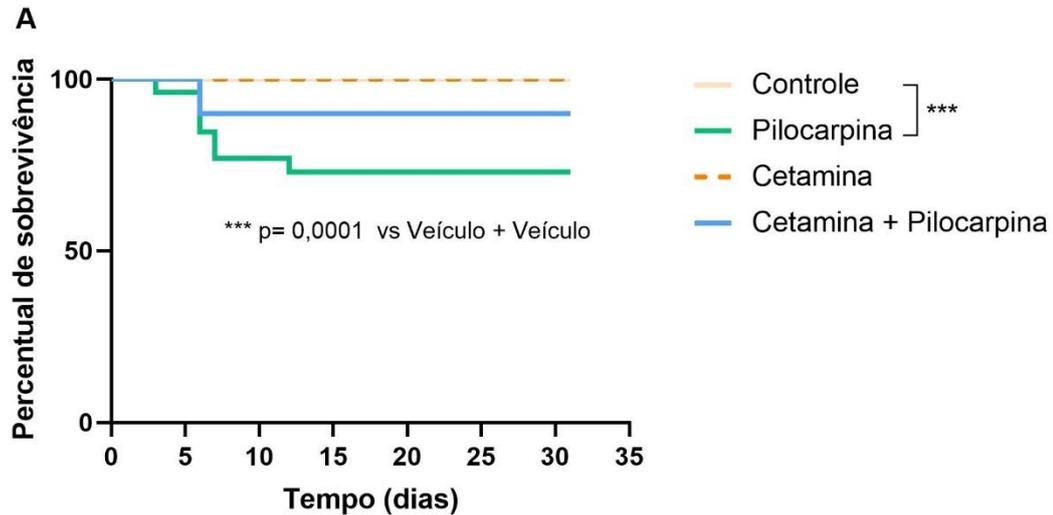


Legenda: Vinte e quatro horas após a indução do *Status Epilepticus* com pilocarpina intra-hipocampal, foi iniciado o tratamento com cetamina (10 mg/kg/dia, i.n.) ou veículo (20 µL/narina/dia), o qual foi repetido por 12 dias consecutivos. Dezesesseis dias após a última administração os animais foram submetidos ao teste de realocação de objetos. Índice de localização dos objetos (A). n= 9-12/grupo. Os dados representam a média + D.P.

3.3.6 Mortalidade

A figura 10 representa o percentual de sobrevivência dos animais. Ao final do protocolo experimental, que teve um total de 31 dias, foi analisada a taxa de mortalidade entre os grupos experimentais no decorrer do experimento e constatou-se que o grupo Pilo + cet totalizou um percentual de 20% de mortes, já o grupo Pilocarpina totalizou 36% de mortalidade. O teste de Log-rank (Mantel-Cox) demonstrou que o grupo Pilocarpina teve uma redução na taxa de sobrevivência quando comparado ao grupo Controle ($p < 0,0001$) (Fig. 10A). Apesar da redução de 16% na taxa de mortalidade do grupo Pilo + cet, não houve diferença significativa de sobrevivência entre ele esses grupos ($p > 0,05$). No entanto, o grupo Pilo + cet, diferentemente do grupo pilocarpina, não reduziu significativamente a sobrevivência dos animais em comparação ao grupo Controle ($p > 0,05$), o que demonstra que o tratamento com cetamina protegeu contra a mortalidade induzida pela pilocarpina.

Figura 10 - Efeitos da administração i.h. de pilocarpina e tratamento i.n. com cetamina sobre a mortalidade entre os grupos.



Legenda: Vinte e quatro horas após a indução do *Status Epilepticus* com pilocarpina intra-hipocampal, foi iniciado o tratamento com cetamina (10 mg/kg/dia, i.n.) ou veículo (20 μ L/narina/dia), o qual foi repetido por 12 dias consecutivos. Trinta e um dias após a administração de pilocarpina i.h. chegou-se ao final do protocolo experimental e foi feita a análise da mortalidade entre os grupos pelo teste de Log-rank (Mantel-Cox). Os dados representam o percentual de sobrevivência ao decorrer dos dias (A). *** p= 0,0001 comparado ao grupo Pilocarpina. n= 9-12/grupo.

4 DISCUSSÃO

Modelos animais são de extrema importância para conhecer, entender e caracterizar diferentes parâmetros de diversas doenças, dentre elas, a epilepsia (CURIA *et al.*, 2008; LÖSCHER, 2002). O modelo da pilocarpina intraperitoneal tem sido amplamente aplicado como um modelo de indução de ELT em animais, porém, devido ao alto índice de mortalidade do modelo (A CAVALHEIRO *et al.*, 1991; CURIA *et al.*, 2008; TURSKI *et al.*, 1983), propôs-se uma via alternativa, a intra-hipocampal (FURTADO *et al.*, 2002), que tem como objetivo a diminuição da mortalidade e dos efeitos periféricos presente no modelo IP. Neste estudo, realizamos a indução do modelo de ELT, por meio da administração intra-hipocampal de pilocarpina, no Laboratório de Ciências Médicas - CCS/UFSC, utilizando a dose de 1,4 mg/sítio, pois esta dose, além de induzir SE em 100% dos animais, apresentou uma taxa de mortalidade de 0% durante a indução.

A utilização desse modelo vai de encontro com o preconizado pelos 3Rs criado por Russel & Burch, (1959) . A sigla tem como significado a Substituição (Replacement), Redução (Reduction) e Refinamento (Refine) no uso de animais experimentais e é a premissa para uma pesquisa humanitária, classificada como a base para uma pesquisa de qualidade. A proposta da aplicação na via intra-hipocampal dos animais está de acordo, principalmente, com o que diz respeito a redução no uso de animais, por apresentar baixa mortalidade e refinamento do método utilizado devido redução de dor e estresse por evitar os efeitos periféricos do modelo IP.

Muitos dos pacientes diagnosticados com epilepsia não só convivem com as crises, mas com muitas outras comorbidades, como transtornos psiquiátricos (BORO; HAUT, 2003). Dentre eles, os que ocorrem com mais frequência são transtornos relacionados a depressão e ansiedade (MANCHANDA *et al.*, 1996). Grande parte dos trabalhos experimentais em modelos animais de ELT avaliam esses tipos de comportamentos na fase crônica do modelo, quando os animais apresentam crises espontâneas recorrentes (CURIA *et al.*, 2008). No trabalho de Lopes e colaboradores (2016) foram realizadas avaliações comportamentais na fase de latência, porém no modelo de ELT induzida pela administração intraperitoneal de pilocarpina (LOPES *et al.*, 2016). Dessa forma, ao realizar a avaliação de comportamentos relacionados a locomoção, ansiedade, depressão e memória na fase de latência do modelo de ELT induzido pela pilocarpina intra-hipocampal, nosso trabalho adiciona dados inéditos à literatura desse campo de estudo.

No Teste do campo aberto não observamos alterações na locomoção dos animais, bem como a presença de comportamentos do tipo ansioso. O mesmo foi observado na avaliação do labirinto em cruz elevado, onde se pôde observar que os animais não apresentaram comportamentos do tipo ansioso na fase de latência do modelo. Entretanto, estudos anteriores demonstraram que há alterações ansiogênicas na fase crônica do modelo de ELT induzida por pilocarpina (GRÖTICKE; HOFFMANN; LÖSCHER, 2007). Dessa forma, observa-se que durante a fase de latência, onde ocorre a epileptogênese, não ocorrem alterações estruturais suficientes para provocar o desenvolvimento de comportamentos desse tipo.

Com relação aos comportamentos do tipo depressivo foi utilizado o teste da borrifada de sacarose para avaliar o componente de anedonia como indicativo de depressão, que é uma alteração presente em animais submetidos ao modelo de ELT. No presente estudo, não foi possível identificar comportamentos do tipo depressivo nos animais, avaliando a fase de latência, sugerindo então que estes tipos de comportamentos só estão presentes no período crônico do modelo (TCHEKALAROVA *et al.*, 2018). Assim como comportamentos do tipo depressivo, alterações na memória espacial de longo prazo só foram encontradas na fase crônica do modelo de ELT (NEJM *et al.*, 2021). Contudo, não se pôde observar essa alteração no período de latência do modelo. Então de acordo com as avaliações feitas no presente estudo, esse déficit de memória de longo prazo ainda não se demonstra significativo no período de latência do modelo de ELT.

Com relação as alterações comportamentais na fase de latência do modelo, uma das alterações encontradas é a alteração da capacidade olfativa dos animais, no teste de discriminação olfatória (LOPES *et al.*, 2016). Entretanto, uma limitação no nosso estudo foi que não foi possível avaliar efetivamente a capacidade olfativa dos animais pois o grupo controle não foi capaz de reconhecer o compartimento familiar, impossibilitando assim a comparação entre os grupos. Portanto, a metodologia aplicada nessa avaliação deve ser revista para que isso não ocorra em futuros testes.

Atualmente, ainda não existe uma terapia farmacológica capaz de impedir a epileptogênese (CHANG *et al.*, 2019). Estudos mostram que há um processo inflamatório presente na epileptogênese que é fundamental para o desenvolvimento de crises esparsas e recorrentes características da doença (RANA; MUSTO, 2018). Portanto, um possível tratamento para evitar a epileptogênese seria a aplicação de um composto que atuem de forma a evitar esse processo (RONG *et al.*, 2019). A cetamina se mostrou um composto capaz de

evitar a inflamação exacerbada presente em vários tipos de processos inflamatórios (LOIX & DE KOCK, 2011), incluindo estudos em modelos animais (SHAKED *et al.*, 2004) e já foi testada, demonstrando bons resultados no tratamento de pacientes portadores de epilepsia refratária (SYNOWIEC *et al.*, 2013), bem como um potencial de redução de comportamentos depressivos na aplicação da dose de 10mg/kg intranasal em animais (CHANG *et al.*, 2019). Sendo assim, o presente estudo avaliou a capacidade do tratamento com cetamina intranasal sobre as possíveis alterações comportamentais induzidas pela pilocarpina intra-hipocampal durante a fase de latência do modelo. Para isso, a cetamina intranasal foi administrada nos primeiros dias após o SE, com o objetivo de bloquear a epileptogênese. No entanto, como demonstrado, o próprio modelo não provocou alterações comportamentais significativas. Além de não induzir alterações comportamentais nos grupos que receberam pilocarpina, os animais que receberam o tratamento com cetamina e veículo também não demonstraram alterações comportamentais, contrariando dados da literatura demonstrando que a administração de cetamina *per se* provoca alterações em parâmetros comportamentais relacionados a depressão, quando avaliado 3 h após a administração de cetamina (OUYANG *et al.*, 2021). Essa divergência possivelmente deve-se à diferença do tempo de avaliação após a administração de cetamina entre os estudos. Os dados presentes na literatura avaliam o efeito agudo da cetamina, enquanto em nosso estudo avaliamos os animais a partir de 8 dias após a administração da droga.

Por fim, embora a indução do SE na dose de 1,4 mg/sítio não tenha provocado a morte dos animais, alguns animais morreram ou foram sacrificados após atingirem o endpoint humanitário nos dias subsequentes ao SE. Nessa análise observamos que embora a administração intra-hipocampal de pilocarpina não tenha induzido déficits comportamentais, provocou um aumento da mortalidade dos animais ao logo do período avaliado. Por outro lado, os animais que receberam cetamina não diferiram em mortalidade do grupo controle, o que demonstra um efeito protetor da cetamina intranasal, corroborando estudos anteriores, onde o tratamento com cetamina se mostrou capaz de reduzir a mortalidade em modelos de ratos sépticos (SHAKED *et al.*, 2004).

Finalmente, os dados obtidos em nosso trabalho com o modelo de ELT induzido pela administração intrahipocampal de pilocarpina se contrapõe a dados presentes na literatura utilizando o modelo de pilocarpina i.p. Em contraponto aos resultados desses parâmetros comportamentais aqui obtidos, estudos com o modelo de pilocarpina intraperitoneal encontraram algumas dessas alterações presentes apenas na fase crônica do modelo, a partir de

5 semanas da injeção de pilocarpina (LOPES ET AL., 2016; MÜLLER ET AL., 2009; NEJM ET AL., 2021). Portanto é importante que mais estudos com o modelo intra-hipocampal de pilocarpina sejam feitos para averiguar se na fase crônica do modelo esses animais apresentam as mesmas alterações presentes no modelo de pilocarpina IP, podendo assim ser feita uma comparação mais eficiente.

5 CONCLUSÃO

O presente trabalho buscou o refinamento de um modelo animal consagrado na literatura internacional, o qual possui como limitação uma alta taxa de mortalidade e dificuldades de reprodutibilidade. Tendo por base escassos dados publicados, foi realizada a padronização em nosso laboratório do modelo animal de ELT induzido pela administração intra-hipocampal de pilocarpina, no qual obtivemos alta reprodutibilidade e baixa mortalidade. Demonstramos ainda que durante a fase de latência (epileptogênese) os danos neurológicos não são suficientes para provocar alterações comportamentais, ou nossas metodologias não foram suficientemente sensíveis para detectá-las. Finalmente, a administração intranasal de cetamina após o SE demonstrou proteger contra a mortalidade induzida pela pilocarpina. Esse dado torna-se de grande relevância, dado que não existem terapias capazes de atuar na fase de epileptogênese. Dessa forma, mais estudos são necessários para a investigação do efeito protetor da cetamina e seu possível potencial anti-epileptogênico.

REFERÊNCIAS

A CAVALHEIRO, I. E.; LEITE, J. P.; BORTOLOTTI, A.; TURSKI, W. A.; IKONOMIDOU, C.; TURSKI, L. Long-Term Effects of Pilocarpine in Rats: Structural Damage of the Brain Triggers Kindling and Spontaneous Recurrent Seizures. **Epilepsia**, v. 32, n. 6, p. 778–782, 1991.

ASSINI, F. L.; DUZZIONI, M.; TAKAHASHI, R. N. Object location memory in mice: Pharmacological validation and further evidence of hippocampal CA1 participation. **Behavioural Brain Research**, v. 204, n. 1, p. 206–211, 1 dez. 2009.

BORO, A.; HAUT, S. Medical comorbidities in the treatment of epilepsy. **Epilepsy and Behavior**, v. 4, p. S2–S12, 2003.

BRAUN, K. P. J. Preventing cognitive impairment in children with epilepsy. **Current Opinion in Neurology**, v. 30, n. 2, p. 140–147, 1 abr. 2017.

CHANG, L.; ZHANG, K.; PU, Y.; QU, Y.; WANG, S. ming; XIONG, Z.; REN, Q.; DONG, C.; FUJITA, Y.; HASHIMOTO, K. Comparison of antidepressant and side effects in mice after intranasal administration of (R,S)-ketamine, (R)-ketamine, and (S)-ketamine. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 181, p. 53–59, 1 jun. 2019.

CLEMENTS, J. A.; NIMMO, W. S.; GRANT, I. S. Bioavailability, Pharmacokinetics, and Analgesic Activity of Ketamine in Humans. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 71, n. 5, p. 539–542, 1982.

COSTA, M. S.; ROCHA, J. B. T.; PEROSA, S. R.; CAVALHEIRO, E. A.; NAFFAH-MAZZACORATTI, M. D. G. Pilocarpine-induced *status epilepticus* increases glutamate release in rat hippocampal synaptosomes. **Neuroscience Letters**, v. 356, n. 1, p. 41–44, 6 fev. 2004.

CURIA, G.; LONGO, D.; BIAGINI, G.; JONES, R. S. G.; AVOLI, M. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 172, p. 143–157, 30 jul. 2008.

DE CARVALHO, C. R.; HOELLER, A. A.; FRANCO, P. L. C.; MARTINI, A. P. S.; SOARES, F. M. S.; LIN, K.; PREDIGER, R. D.; WHALLEY, B. J.; WALZ, R. The cannabinoid CB2 receptor-specific agonist AM1241 increases pentylenetetrazole-induced seizure severity in Wistar rats. **Epilepsy Research**, v. 127, p. 160–167, 1 nov. 2016.

FANG, Y.; WANG, X. Ketamine for the treatment of refractory *status epilepticus*. **Seizure**, v. 30, p. 14–20, 1 ago. 2015.

FISHER, R. S.; VAN EMDE BOAS, W.; BLUME, W.; ELGER, C.; GENTON, P.; LEE, P.; ENGEL, J. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). **Epilepsia**, v. 46, n. 4, p. 470–472, abr. 2005.

FURTADO, M. A.; CASTRO, O. W.; DEL VECCHIO, F.; DE OLIVEIRA, J. A. C.; GARCIA-CAIRASCO, N. Study of spontaneous recurrent seizures and morphological alterations after *status epilepticus* induced by intrahippocampal injection of pilocarpine. **Epilepsy and Behavior**, v. 20, p. 257–266, fev. 2011.

FURTADO, M. D. A.; BRAGA, G. K.; OLIVEIRA, J. A. C.; VECCHIO, D.; GARCIA-CAIRASCO, N. Behavioral, Morphologic, and Electroencephalographic Evaluation of Seizures Induced by Intrahippocampal Microinjection of Pilocarpine. **Epilepsia**, v. 43, p. 37–39, 2002.

GRÖTICKE, I.; HOFFMANN, K.; LÖSCHER, W. Behavioral alterations in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in mice. **Experimental Neurology**, v. 207, p. 329–349, out. 2007.

KOW, R. L.; JIANG, K.; NAYDENOV, A. v; LE, J. H.; STELLA, N. Modulation of Pilocarpine-Induced Seizures by Cannabinoid Receptor 1. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. 95922, 2014.

LOCHHEAD, J. J.; THORNE, R. G. Intranasal delivery of biologics to the central nervous system. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 614–628, 15 maio 2012.

LOIX, S.; DE KOCK, M.; HENIN, P. The anti-inflammatory effects of ketamine: State of the art. **Acta Anaesth**, v. 62, p. 47–58, 2011.

LOPES, M. W.; LOPES, S. C.; SANTOS, D. B.; COSTA, A. P.; GONÇALVES, F. M.; DE MELLO, N.; PREDIGER, R. D.; FARINA, M.; WALZ, R.; LEAL, R. B. Time course evaluation of behavioral impairments in the pilocarpine model of epilepsy. **Epilepsy and Behavior**, v. 55, p. 92–100, 1 fev. 2016.

LÖSCHER, W. Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease-modifying drugs. A comparison of the pharmacology of kindling and post-*status epilepticus* models of temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Research**, v. 50, p. 105–123, 2002.

MADER JR, edward C.; MAURY, J. S.; SANTANA-GOULD, L.; CRAVER, R. D.; EL-ABASSI, R.; SEGURA-PALACIOS, enrique; SUMNER, A. J.; JR, M. Human Rabies with

Initial Manifestations that Mimic Acute Brachial neuritis and Guillain-Barré Syndrome. **Clinical Medicine Insights: Case Reports**, v. 5, p. 49–55, 2012.

MANCHANDA, R.; SCHAEFER, B.; MCLACHLAN, R. S.; BLUME, W. T.; WIEBE, S.; GIRVIN, J. P.; PARRENT, A.; DERRY, P. A. Psychiatric disorders in candidates for surgery for epilepsy. **Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry**, v. 61, p. 82–89, 1996.

MÜLLER, C. J.; BANKSTAHL, M.; GRÖTICKE, I.; LÖSCHER, W. Pilocarpine vs. lithium-pilocarpine for induction of *status epilepticus* in mice: Development of spontaneous seizures, behavioral alterations and neuronal damage. **European Journal of Pharmacology**, v. 619, p. 15–24, 1 out. 2009.

NEJM, M. B.; VICTORINO, D. B.; JONATHAS GUIMARÃES-MARQUES, M.; SCORZA, C. A.; FINSTERER, J.; SCORZA, F. A.; CYSNEIROS, R. M. Effects of fish oil supplementation on spatial memory in rats with pilocarpine-induced epilepsy assessed using the Morris Water Maze test. **Epileptic Disord**, v. 23, n. 3, p. 476–484, 2021.

OUYANG, X.; WANG, Z.; LUO, M.; WANG, M.; LIU, X.; CHEN, J.; FENG, J.; JIA, J.; WANG, X. Ketamine ameliorates depressive-like behaviors in mice through increasing glucose uptake regulated by the ERK/GLUT3 signaling pathway. **Scientific Reports**, v. 11, p. 1–13, 2021.

PINHEIRO, C. U. B. Jaborandi (*Pilocarpus* SP., Rutaceae): A Wild Species And Its Rapid Transformation Into A Crop¹. **Economic Botany**, v. 51, n. 1, p. 49–58, 1997.

PREDIGER, R. D. S.; BATISTA, L. C.; TAKAHASHI, R. N. Caffeine reverses age-related deficits in olfactory discrimination and social recognition memory in rats: Involvement of adenosine A1 and A2A receptors. **Neurobiology of Aging**, v. 26, n. 6, p. 957–964, 2005.

PREDIGER, R. D. S.; FERNANDES, M. S.; RIAL, D.; WOPEREIS, S.; PEREIRA, V. S.; BOSSE, T. S.; DA SILVA, C. B.; CARRADORE, R. S.; MACHADO, M. S.; CECHINEL-FILHO, V.; COSTA-CAMPOS, L. Effects of acute administration of the hydroalcoholic extract of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*) in animal models of learning and memory. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 3, p. 465–473, 8 dez. 2008.

RANA, A.; MUSTO, A. E. The role of inflammation in the development of epilepsy. **Journal of Neuroinflammation**, v. 15, p. 144, 15 maio 2018.

RONG, S.; WAN, D.; FAN, Y.; LIU, S.; SUN, K.; HUO, J.; ZHANG, P.; LI, X.; XIE, X.; WANG, F.; SUN, T. Amentoflavone affects epileptogenesis and exerts neuroprotective effects by inhibiting NLRP3 inflammasome. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, p. 1–13, 2019.

RUSSEL, W.; BURCH, R. **The principles of humane experimental technique**. [s.l.: s.n.]v. 394 p.

SHAKED, G.; CZEIGER, D.; DUKHNO, O.; LEVY, I.; ARTRU, A. A.; SHAPIRA, Y.; DOUVDEVANI, A. Ketamine improves survival and suppresses IL-6 and TNFalpha production in a model of Gram-negative bacterial sepsis in rats. **Resuscitation**, v. 62, p. 237–242, ago. 2004.

SOFFIÉ, M.; LAMBERTY, Y. Scopolamine effects on juvenile conspecific recognition in rats: possible interaction with olfactory sensitivity. **Behavioral Processes**, v. 17, p. 181–190, 1988.

SYNOWIEC, A. S.; SINGH, D. S.; YENUGADHATI, V.; VALERIANO, J. P.; SCHRAMKE, C. J.; KELLY, K. M. Ketamine use in the treatment of refractory *status epilepticus*. **Epilepsy Research**, v. 105, n. 1–2, p. 183–188, 1 jul. 2013.

TCHEKALAROVA, J.; ATANASOVA, D.; KORTENSKA, L.; ATANASOVA, M.; LAZAROV, N. Chronic agomelatine treatment prevents comorbid depression in the post-status epilepticus model of acquired epilepsy through suppression of inflammatory signaling. **Neurobiology of Disease**, v. 115, p. 127–144, 1 jul. 2018.

TURSKI, W. A.; CAVALHEIRO, E. A.; SCHWARZ L, M.; CZUCZWAR, S.-L. J.; TURSKI L'°, L. Limbic Seizures Produced by Pilocarpine in Rats: Behavioral, Electroencephalographic and Neuropathological Study. **Behavioural Brain Research**, v. 9, p. 315–335, 1983.

WIESER, H.-G. Mesial Temporal Lobe Epilepsy with Hippocampal Sclerosis. **Epilepsia**, v. 45, n. 6, p. 695–714, 2004.

WILLNER, P. **Chronic mild stress (CMS) revisited: Consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS** *Neuropsychobiology* ago. 2005.