

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

Clarissa Vasconcelos de Oliveira

**EFEITO DA ATORVASTATINA SOBRE AS ALTERAÇÕES
COMPORTAMENTAIS, HISTOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS EM
CAMUNDONGOS C57BL/6 COM STATUS EPILEPTICUS INDUZIDO
POR PILOCARPINA**

Santa Maria RS, Brasil
2017

Clarissa Vasconcelos de Oliveira

**EFEITO DA ATORVASTATINA SOBRE AS ALTERAÇÕES
COMPORTAMENTAIS, HISTOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS EM CAMUNDONGOS
C57BL/6 COM STATUS EPILEPTICUS INDUZIDO POR PILOCARPINA**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutora em Farmacologia**

Orientador: Prof Dr. Mauro Schneider Oliveira

Santa Maria, RS
2017

Clarissa Vasconcelos de Oliveira

EFEITO DA ATORVASTATINA SOBRE AS ALTERAÇÕES
COMPORTAMENTAIS, HISTOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS EM CAMUNDONGOS
C57BL/6 COM STATUS EPILEPTICUS INDUZIDO POR PILOCARPINA

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Farmacologia

Aprovado em 06 de março de 2017:

Mauro Schneider Oliveira

Mauro Schneider Oliveira, Dr.(UFSM)
(Presidente/Orientador)

Denis Broock Rosenberg

Denis Broock Rosenberg, Dr. (UFSM)

Fulvio Alexandre Scorzai

Fulvio Alexandre Scorzai, Dr. (UNIFESP)

Michele Rechia Fighera

Michele Rechia Fighera, Dra. (UFSM)

Rui Daniel L. Prediger

Rui Daniel Schröder Prediger, Dr.(UFSC)

Santa Maria, RS

2017

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Vasconcelos de Oliveira, Clarissa
EFEITO DA ATORVASTATINA SOBRE AS ALTERAÇÕES
COMPORTAMENTAIS, HISTOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS EM
CAMUNDONGOS C57BL/6 COM STATUS EPILEPTICUS INDUZIDO POR
PILOCARPINA / Clarissa Vasconcelos de Oliveira.- 2017.
138 p.; 30 cm

Orientador: Mauro Schneider Oliveira
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia, RS, 2017

1. Epilepsia do Lobo Temporal 2. Estatinas 3.
Epileptogênese 4. Inflamação 5. Gênero I. Schneider
Oliveira, Mauro II. Título.

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Genisa e Claro, cujo esforço em educar
abriram caminhos e trouxeram a
perspectiva de um futuro muito especial!*

AGRADECIMENTOS

O esforço em atender as expectativas depositadas em mim faz parte do caminho traçado, e resulta agora nesta tese que, embora tenha suas limitações, é fruto de muito trabalho e desenvolvimento pessoal. Como diz o trecho da música “*não é sobre chegar no topo do mundo e saber que venceu, é sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu*”. Ao longo desse caminho, algumas instituições e pessoas se fizeram presentes, e por isso merecem especial agradecimento:

Agradeço à Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia por receberem em suas instalações alunos com as mais variadas bagagens, oportunizando a qualificação profissional destes e a construção do conhecimento;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro durante todo o período desta pesquisa;

Ao professor Mauro, pelos ensinamentos e pelo exemplo de profissional. Agradeço a compreensão nos momentos difíceis e a confiança depositada em mim ao longo desses sete anos;

À Jéssica, minha querida amiga e meu braço direito na pesquisa. Obrigada pelo teu ombro amigo e por estar sempre disposta a me ajudar com toda a tua luz;

À Viviane e a Julia, pela amizade e pela parceria nos experimentos;

À minha família e aos amigos de perto e de longe, que estiveram ao meu lado, proporcionando momentos de alegria, descontração e felicidade;

À minha irmã Sibele, que é meu exemplo acadêmico, e que me motiva a fazer o melhor. Agradeço por ter sempre cumprido o teu “papel de irmã mais velha”, me mostrando o mundo com outra visão, e por não me deixar desistir do curso;

Por fim, agradeço a Deus por ter me dado a oportunidade de ter encarnado nesse plano com os pais que tenho, Genisa e Claro, pessoas mais do que especiais. São meus exemplos de vida, que em muitos momentos abriram mão de suas preferências individuais para dedicar tempo e recursos à educação das filhas. Obrigada por serem tão presentes na minha vida, por todo amor e cuidado. Sou grata por tudo!

Ninguém ignora tudo, ninguém sabe tudo. Por isso aprendemos sempre.
Paulo Freire

RESUMO

EFEITO DA ATORVASTATINA SOBRE AS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS, HISTOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS EM CAMUNDONGOS C57BL/6 COM STATUS EPILEPTICUS INDUZIDO POR PILOCARPINA

AUTORA: Clarissa Vasconcelos de Oliveira
ORIENTADOR: Mauro Schneider Oliveira

Epilepsia é uma doença neurológica crônica, que afeta cerca de 65 milhões de pessoas em todo o mundo. A epilepsia do lobo temporal (TLE) é o tipo de epilepsia focal mais comum em adultos, e também a de maior índice de refratariedade ao tratamento farmacológico. Além das crises epilépticas, os pacientes com TLE sofrem com comorbidades médicas, tais como depressão, ansiedade e alterações cognitivas. Modelos experimentais de epileptogênese, tal como o modelo da TLE pós-SE (*status epilepticus*) induzido por pilocarpina, têm aumentado muito a compreensão dos processos que levam à epilepsia e, assim, de potenciais alvos para terapia antiepileptogênica. Considerando o papel crucial da inflamação para o desenvolvimento da epileptogênese, acredita-se que moléculas que tenham efeitos anti-inflamatórios seriam uma estratégia interessante para prevenir ou reduzir as consequências de um insulto cerebral epileptogênico. Nesse sentido, as estatinas, que são fármacos utilizados no tratamento das dislipidemias, apresentam efeitos pleiotrópicos, entre eles efeito anti-inflamatório, o qual parece ser eficaz na prevenção da neuroinflamação e da morte neuronal em uma variedade de doenças neurológicas, inclusive na epilepsia. No entanto, são poucos os estudos sobre o efeito do tratamento com estatinas durante o período epileptogênico. Assim, considerando o potencial efeito neuroprotetor das estatinas em diferentes doenças do sistema nervoso central, o presente estudo tem como objetivo avaliar o efeito do tratamento com atorvastatina nas doses de 10 e 100 mg/Kg, sobre as alterações cognitivas e comportamentais, bem como na susceptibilidade as crises induzidas por PTZ durante o processo epileptogênico em camundongos submetidos ao SE induzido pela pilocarpina. Considerando a importância dos estudos pré-clínicos serem desenvolvidos em animais de ambos os sexos, camundongos machos e fêmeas foram utilizados. Os resultados obtidos mostram que o tratamento com atorvastatina exerce um sutil efeito modificador da doença, pois elevou o limiar convulsivo dos animais e melhorou parcialmente os déficits cognitivos, os quais parecem estar relacionados com o seu efeito anti-inflamatório. Além disso, os efeitos observados nos animais de ambos os性os são similares, exceto pelo fato de que nas fêmeas uma dose maior é necessária para apresentar efeito, o que reforça a importância dos estudos pré-clínicos serem desenvolvidos em animais de ambos os sexos. No entanto mais estudos são necessários para avaliar o potencial efeito dessa estatina no tratamento da epilepsia.

Palavras-chave: Epilepsia do Lobo Temporal. Estatinas. Epileptogênese. Inflamação.

ABSTRACT

EFFECT OF ATORVASTATIN ON BEHAVIORAL, HISTOLOGICAL AND BIOCHEMISTRY ALTERATIONS IN C57BL/6 MICE SUBMITTED TO STATUS EPILEPTICUS PILOCARPINE-INDUCED

AUTHOR: Clarissa Vasconcelos de Oliveira

ADVISOR: Mauro Schneider Oliveira

Epilepsy is a chronic neurological disease that affects 65 million people worldwide. Temporal lobe epilepsy (TLE) is the most common type of focal epilepsy in adults, and also the one with the highest refractoriness index to pharmacological treatment. In addition to epileptic seizures, patients with TLE suffer from medical comorbidities such as depression, anxiety, and cognitive impairment. Experimental models of epileptogenesis, such as model of TLE post-SE pilocarpine-induced, have greatly increased the understanding of the processes leading to epilepsy and, thus, potential targets for antiepileptogenic therapy. Considering the crucial role of inflammation in the development of epileptogenesis, it is believed that drugs that have anti-inflammatory effects would be an interesting strategy to prevent or reduce the consequences of epileptogenic brain insult. In this sense, statins, which are drugs used to treat dyslipidemias, present pleiotropic effects, including anti-inflammatory effect, which seems to be effective in preventing neuroinflammation and neuronal death in a variety of neurological diseases, including epilepsy. However, there are few studies on the effect of treatment with statins during the epileptogenic period. Thus, considering the potential neuroprotective effect of statins in different diseases of the central nervous system, the present study aims to evaluate the effect of treatment with atorvastatin at doses of 10 and 100 mg/kg on cognitive and behavioral changes, as well as on the susceptibility to seizures induced by PTZ during the epileptogenic process in mice submitted to the SE pilocarpine-induced. Considering the importance of the preclinical studies being developed in animals of both genders, male and female mice were used. The results show that the treatment with atorvastatin exerts a subtle disease-modifying effect, raising the convulsive threshold of the animals and improving in part the cognitive deficits, which seem to be related to its anti-inflammatory effect. In addition, the protective effects were similar in both female and male mice, except for the fact that a high dose of atorvastatin was required for females. These data reinforce the importance of developing preclinical studies in animals of both sexes. However more studies are needed to evaluate the potential effect of this statin in the treatment of epilepsy.

Palavras-chave: Temporal Lobe Epilepsy. Statins. Epileptogenesis. Inflammation

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

INTRODUÇÃO

Figura 1: Inibição da síntese de colesterol pelas estatinas.....	33
Figura 2: Estrutura das estatinas.....	34
Figura 3: Via do mevalonato e dos efeitos pleiotrópicos das estatinas.....	37

METODOLOGIA

Figura 1: Esquema de indução do SE pela pilocarpina.....	49
Figura 2: Esquema do experimento 1.....	50
Figura 3: Esquema dos experimentos 2 e 3, e análise histológica.....	50
Figura 4: Esquema bateria de testes de comportamento e análise de citocinas.....	52

ARTIGO 1

Figure 1: Gender-related differences in the sensitivity to pilocarpine-induced SE.....	59
Figure 2: Effect of pilocarpine-induced SE and gender on mice behavior in the open-field test.....	59
Figure 3: Effect of pilocarpine-induced SE and gender on mice behavior in the object recognition test.....	60
Figure 4: Effect of pilocarpine-induced SE and gender on mice behavior in the beam walk test or in the rotarod test	61
Figure 5: Effect of pilocarpine-induced SE and gender on the latency to find the escape box in the Barnes maze.....	61
Figure 6: Effect of pilocarpine-induced SE and gender on mice behavior in the forced swimming and taste preference tests	62
Figure 7: Effect of pilocarpine-induced SE and gender on the number of hilar cells in the dentate gyrus of mice hippocampus.....	62

MANUSCRITO 1

Figure 1: Schematic illustration of the experimental protocol used in this study.....	77
--	----

Figure 2: Effect of oral administration of increasing doses of atorvastatin (10 or 100 mg/kg; ig) on myoclonic jerks induced by low dose of PTZ (30 mg/Kg; ip).....	78
Figure 3: Effect of oral administration of increasing doses of atorvastatin (10 or 100 mg/kg; ig) on tonic-clonic seizures induced by low dose of PTZ (30 mg/kg; ip).....	79
Figure 4: Effect of oral administration of increasing doses of atorvastatin (10 or 100 mg/kg; ig) on the number of hilar cells in the dentate gyrus.....	80
Table 1: Data about animals used in the study.....	81

MANUSCRITO 2

Figure 1: Schematic illustration of the experimental protocol used in this study.....	98
Figure 2: Effect of oral administration of increasing doses of atorvastatin (10 or 100 mg/kg; i.g.) on mice behavior in the open-field test during epileptogenic period after SE induction.....	99
Figure 3: Effect of oral administration of increasing doses of atorvastatin (10 or 100 mg/kg; i.g.) on mice behavior in the object recognition test during epileptogenic period after SE induction.....	99
Figure 4: Effect of oral administration of increasing doses of atorvastatin (10 or 100 mg/kg; i.g.) on mice behavior in the rotarod test during epileptogenic period after SE induction.....	100
Figure 5: Effect of oral administration of increasing doses of atorvastatin (10 or 100 mg/kg; i.g.) on mice behavior in the forced swimming and taste preference tests during epileptogenic period after SE induction.....	100
Figures 6 - 10: Effect of oral administration of increasing doses of atorvastatin (10 or 100 mg/kg; i.g.) on cytokines levels (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ and IL-10) in mice hippocampus and cerebral cortex during epileptogenic period after SE induction.....	101-105
Supplementary figure 1: Effect of oral administration of increasing doses of atorvastatin (10 or 100 mg/kg; i.g.) and gender on cytokines levels in mice hippocampus during epileptogenic period after SE induction.....	106
Supplementary figure 2: Effect of oral administration of increasing doses of atorvastatin (10 or 100 mg/kg; i.g.) and gender on cytokines levels in mice cerebral cortex during epileptogenic period after SE induction.....	107
Table 1: Data about animals used in the study.....	108

LISTA DE ABREVIATURAS

- AC – Anidrase carbônica
ATV - Atorvastatina
AVC – Acidente vascular cerebral
CA1 - Corno de amon setor 1
CA2 - Corno de amon setor 2
CA3 - Corno de amon setor 3
DALY - Disability-adjusted life year
DC – Dieta cetogênica
EAE - Encefalomielite autoimune experimental
EEG – Eletroencefalograma
eNOS - Óxido nítrico endotelial
FDA - *Food and Drug Administration*
FJC – Fluoro Jade C
FPP -Farnesilpirofosfato
FXS - Síndrome do X frágil
GBD - *Global burden of disease*
GGPP - Geranilgeranilpirofosfato
HDL -Lipoproteínas de alta densidade
HMG-CoA redutase - 3-hidroxi-3-methyl-glutaril-CoA redutase
i.g. – Intragástrica
i.p. - Intraperitoneal
IBE - *International Bureau for Epilepsy*
IL - Interleucina
ILAE - *International League Against Epilepsy*
INF- γ - Interferon- γ
iNOS - Óxido nítrico induzível
LDL - Lipoproteínas de baixa densidade
MMPs - Metaloproteinases de matriz
NADPH oxidase - Nicotinamida adenina dinucléotido fosfato-oxidase
NF1 –Neurofibromatose tipo 1
NIH - National Institutes of Health
NO - Óxido nítrico
OATPs - *Organic Anion Transporting Polypeptides*
OMS - Organização Mundial da Saúde
PTZ - Pentilenotetrazol
SCAP - *SREBF cleavage activating protein*
SE - *Status epilepticus*
SNC – Sistema nervoso central
SREBFs - *Sterol responsive element binding factor*
SRSs - Crises recorrentes espontâneas
SUDEP - Morte súbita e inesperada na epilepsia
TBI - Lesão cerebral traumática
TDAH - Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade
TG – Triglicerídeos
TLE – Epilepsia do lobo temporal
TNF- α - Fator de necrose tumoral α

LISTA DE APÊNDICES E ANEXOS

ANEXO A - Carta de aprovação da Comissão de ética no Uso de Animais da UFSM.....135

ANEXO B - Carta de aprovação da Comissão de ética no Uso de Animais da UFSM.....136

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 DESENVOLVIMENTO.....	16
2.1 EPILEPSIA	16
2.1.1 Dados Epidemiológicos.....	16
2.1.2 Conceitos e definições.....	17
2.1.3 Terminologias e classificações.....	19
2.1.4 Implicações do gênero sobre a epilepsia	21
2.1.5 Inflamação e epilepsia.....	25
2.2 EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL.....	25
2.2.1 Aspectos gerais.....	25
2.2.2 Comorbidades médicas na TLE	26
2.2.3 Modelo experimental de TLE	28
2.3 ESTATINAS.....	31
2.3.1 Breve histórico	31
2.3.2 Mecanismo de ação e aspectos farmacocinéticos	32
2.3.3 Efeitos pleiotrópicos e neuroproteção	36
2.3.4 Estatinas e epilepsia	41
3 OBJETIVO	46
4 METODOLOGIA.....	48
5 ARTIGO 1	55
6 MANUSCRITO 1	65
7 MANUSCRITO 2	82
8 DISCUSSÃO	109
9 CONCLUSÃO.....	114
10 REFERÊNCIAS	115
ANEXO A - Carta de aprovação da Comissão de ética no Uso de Animais da UFSM..	130
ANEXO B - Carta de aprovação da Comissão de ética no Uso de Animais da UFSM..	131

1 INTRODUÇÃO

Epilepsia é uma doença do cérebro caracterizada pela predisposição duradoura em gerar crises epilépticas e pelas consequências neurobiológicas, cognitivas, psicológicas e sociais desta condição (FISHER et al., 2005; FISHER et al., 2014). A epilepsia afeta diretamente cerca de 65 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo que 80% destas vivem nos países em desenvolvimento (NGUGI et al., 2010; THURMAN et al., 2011).

A epilepsia do lobo temporal (TLE), caracterizada pela ocorrência de crises epilépticas originárias no lobo temporal, é o tipo de epilepsia mais prevalente em adultos, e também a de maior índice de refratariedade ao tratamento farmacológico (ENGEL, 2001). De acordo com a origem das crises, a TLE pode ser dividida em mesial ou neocortical. A esclerose hipocampal é uma característica histopatológica desse tipo de TLE mesial, e é marcada pela perda neuronal em regiões específicas da formação hipocampal (YILMAZER-HANKE et al., 2000). Além das crises epilépticas, muitos pacientes com TLE sofrem com comorbidades cognitivas e comportamentais, tais como depressão, ansiedade e danos nos diferentes tipos de memória, que podem ser consequências das alterações morfológicas e funcionais no lobo temporal decorrentes das crises epilépticas (MARCANGELO; OVSIEW, 2007).

Os modelos animais de epileptogênese têm aumentado muito a compreensão dos processos que levam à epilepsia e, assim, de potenciais alvos para terapia antiepileptogênica (LÖSCHER; BRANDT, 2010). Dentre esses modelos está o da TLE pós-SE (*status epilepticus*) induzido pela pilocarpina, o qual permite a reprodução das principais características histopatológicas e comportamentais encontradas em humanos com esse tipo de epilepsia (TURSKI et al., 1983; TURSKI et al., 1984).

Uma possível estratégia racional para a descoberta de fármacos capazes de interromper o desenvolvimento da epilepsia seria o teste de compostos experimentais que interferem com um ou vários dos mecanismos subjacentes à epileptogênese (LÖSCHER; BRANDT, 2010). Nesse sentido, sabe-se que os processos neuroinflamatórios, induzidos por diferentes tipos de insultos cerebrais, possuem um papel crucial para o desenvolvimento da epileptogênese (VEZZANI; GRANATA, 2005; VEZZANI et al., 2013), e, portanto, moléculas que tenham efeitos anti-inflamatórios seriam uma estratégia interessante para prevenir ou reduzir as consequências do dano epileptogênico (LÖSCHER; BRANDT, 2010; VEZZANI et al., 2013; SCICCHITANO et al., 2015).

Como a busca por novos fármacos exige um longo tempo de estudo, grandes recursos financeiros e ainda um elevado risco de perda dos investimentos, torna-se plausível realizar o reposicionamento de fármacos (*drug repositioning*). Ou seja, nesse caso, fármacos utilizados clinicamente para outros tratamentos, e que também possuem indicação potencial para a inibição da neuroinflamação, merecem ser investigados para uma possível atividade antiepileptogênica. Entre esses fármacos estão as estatinas (SCICCHITANO et al., 2015).

As estatinas são fármacos inibidores da enzima limitante da via de biossíntese do colesterol (HMG-CoA redutase), largamente utilizadas para o tratamento das dislipidemias (ENDO, 2010). Além do efeito sobre os níveis lipídicos, estudos clínicos e experimentais relatam que estes compostos possuem efeitos pleiotrópicos, tais como ação antioxidant, anti-inflamatória, imunomoduladora, entre outros, os quais ocorrem por mecanismos secundários à inibição da síntese de intermediários isoprenóides da via do mevalonato (ZEICHNER et al., 2012).

Esse potencial anti-inflamatório das estatinas parece ser eficaz na prevenção da neuroinflamação e da morte neuronal em uma variedade de doenças neurológicas, conforme relatado por estudos em modelos animais de isquemia cerebral, lesão cerebral traumática, esclerose múltipla e epilepsia (MALFITANO et al., 2014; PENG et al., 2014). No entanto, poucos estudos relatam o efeito do tratamento com estatinas no processo epileptogênico.

Devido à falta de estudos referentes ao uso dos inibidores da HMG-CoA redutase durante o desenvolvimento da epilepsia (epileptogênese), a presente pesquisa foi desenvolvida com o objetivo de avaliar o efeito do tratamento com atorvastatina, a estatina mais prescrita (ADAMS et al., 2015), sobre o desenvolvimento das alterações cognitivas e comportamentais e na susceptibilidade às crises induzidas por pentilenotetrazol (PTZ) durante o processo epileptogênico em camundongos C57BL/6 submetidos ao SE induzido pela pilocarpina. Considerando os dados clínicos e experimentais que indicam que o sexo pode afetar a progressão do processo epileptogênico (PITKÄNEN et al., 2014), e que uma droga pode ser efetiva em um sexo, mas não em outro (SCHARFMAN et al., 2009; IBARRA et al., 2013), o estudo foi desenvolvido em machos e fêmeas.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 EPILEPSIA

2.1.1 Dados Epidemiológicos

A epilepsia afeta diretamente cerca de 65 milhões de pessoas em todo o mundo, e envolve outros tantos milhões como membros da família e cuidadores de pacientes, sendo que 80% destas pessoas vivem nos países em desenvolvimento (NGUGI et al., 2010; THURMAN et al., 2011). Globalmente, estima-se que 2,4 milhões de pessoas são diagnosticadas com epilepsia a cada ano (WHO, 2015). No entanto, os índices de incidência, prevalência e mortalidade da epilepsia no âmbito mundial não são uniformes e dependem de vários fatores.

Nos países desenvolvidos a incidência¹ anual de epilepsia encontra-se entre 40 e 70 pessoas a cada 100.000 habitantes, e é maior em crianças pequenas e em idosos (SANDER, 2003; DUNCAN et al., 2006; BOER et al., 2008), bem como na população mais pobre (HEANEY et al., 2002). Já nos países de baixa e média renda, esse número é maior, geralmente acima de 120 pessoas a cada 100.000 habitantes. Dentre os fatores que contribuem para essas taxas mais elevadas, estão as baixas condições de saneamento, os sistemas de saúde inefficientes e o maior risco de infecções cerebrais (SANDER, 2003; BOER et al., 2008).

Em relação à prevalência¹ da doença, a grande maioria dos estudos têm relatado taxas entre 4 e 10 a cada 1.000 habitantes, sendo que nos países em desenvolvimento esses números também podem ser maiores (SANDER, 2003; DUNCAN et al., 2006; BOER et al., 2008). No Brasil, embora os estudos epidemiológicos sejam escassos, estima-se que a epilepsia atinja até 2% da população, correspondendo a aproximadamente 1,8 milhões de pessoas em diferentes idades e classes sociais (GALLUCCI NETO; MARCHETTI, 2005).

A epilepsia também tem consequências econômicas significativas, sobretudo em termos de necessidade de cuidados com a saúde e perda de produtividade no trabalho (ALLERS et al., 2015). De acordo com os dados publicados pela Organização Mundial da

¹ Em estudos epidemiológicos, incidência e prevalência são dois termos bastante utilizados, sendo que a prevalência se refere ao número de casos em uma população em um determinado momento e a incidência é usada para se referir ao número de casos novos que apareceram em uma população (THURMAN et al., 2011).

Saúde (OMS) em maio de 2015, a epilepsia contribui com mais de 20 milhões de DALY², correspondentes a 0,75% da carga global de doença (*global burden of disease*) (WHO, 2015). No relatório sobre a GBD de 2010, a epilepsia está classificada como a 36^a causa de DALY global (MURRAY et al., 2012).

Vale destacar que o DALY da epilepsia é comparável ao DALY do câncer de mama nas mulheres e do câncer de pulmão em homens (MURRAY et al., 2012). Além disso, a doença está associada a uma taxa de mortalidade três vezes superior à da população geral (BOER et al., 2008). No Brasil, no período de 1980 a 2003, foram registrados 32.655 óbitos decorrentes de epilepsia (FERREIRA; SILVA, 2009).

Ademais, as pessoas com epilepsia são muitas vezes sujeitas a estigmatização e discriminação por causa de equívocos e atitudes negativas acerca da doença. A simples presença do diagnóstico de epilepsia não implica em incapacidade para o trabalho, no entanto, um artigo publicado na década de 60, o qual abordava a razão dos empregadores recusarem trabalhadores com epilepsia, concluiu que o maior problema na empregabilidade dos pacientes epilépticos decorria da falta de conhecimento sobre a natureza da epilepsia, associado ao “medo” (HICKS; HICKS, 1991; JACOBY et al., 2005). Já em 2001, outro artigo mostrou que esta realidade, apesar de todo o tempo transcorrido, não sofreu alteração, o que reforça a relevância das implicações sociais relacionadas à doença (EPILEPSY, 2001; JACOBY et al., 2005).

2.1.2 Conceitos e definições

A epilepsia³ é uma doença do cérebro caracterizada pela predisposição duradoura em gerar crises epilépticas recorrentes, e pelas consequências neurobiológicas, cognitivas, psicológicas e sociais desta condição (FISHER et al., 2005; FISHER et al., 2014). Por sua

² Nos estudos sobre a GBD (*global burden of disease*), o indicador utilizado é o DALY (Disability-Adjusted Life Years), o qual representa o somatório dos anos de vida perdidos por mortalidade precoce e dos anos vividos em condições de incapacidade ou deficiência, devido a doenças e lesões. Em suma, 1 DALY equivale a 1 ano de vida saudável perdido (MURRAY et al., 2012).

³ Como a epilepsia não é uma entidade nosológica única, mas advém de várias condições diferentes que ocasionam disfunção cerebral, alguns preferem o uso do termo no plural “epilepsias”. Contudo, a Comissão de Terminologia da ILAE preconiza seu uso no singular, embora reconheça esta diversidade (FISCHER et al., 2005).

vez, a crise epiléptica é uma ocorrência transitória de sinais e/ou sintomas devido à atividade neuronal síncrona ou excessiva anormal no cérebro. Esses sinais e/ou sintomas incluem fenômenos anormais súbitos e transitórios, tais como alterações da consciência ou eventos motores, sensitivos/sensoriais, autonômicos ou psíquicos involuntários (FISHER et al., 2005). Assim, a crise é um evento e a epilepsia é a doença, que envolve crises recorrentes não provocadas (FISHER, 2015).

Quando as crises epilépticas não apresentam curso autolimitado são denominadas crises contínuas, e configuram o quadro de *status epilepticus* (SE). O SE é definido como uma crise duradoura, que não mostra sinais clínicos de interrupção após o tempo habitual das crises daquele tipo na maioria dos pacientes, ou ainda como a ocorrência de crises recorrentes sem que a função do sistema nervoso central retorne ao período interictal (YACUBIAN, 2002). Essa condição pode ser resultante da falha dos mecanismos responsáveis pelo término da crise ou dos mecanismos de início que levam à crises anormalmente prolongadas. Como consequência, o SE pode desencadear dano e/ou morte neuronal, e alterações nas redes neuronais, dependendo do tipo e duração das crises (TRINKA et al., 2015).

Na definição conceitual de epilepsia proposta pela *International League Against Epilepsy* (ILAE) em conjunto com o *International Bureau for Epilepsy* (IBE) em 2005, a epilepsia era tida como uma disfunção cerebral, não como doença, e requeria a ocorrência de pelo menos uma crise epiléptica para ser estabelecida (FISHER et al., 2005). Contudo, com o objetivo de desenvolver uma definição operacional de epilepsia para aplicação na prática clínica, essa definição foi revisada pela ILAE em 2014 (FISHER et al., 2014; FISHER, 2015). E desde então, a epilepsia passou a ser classificada como uma doença do cérebro, um termo que, segundo os autores, transmite melhor a gravidade da mesma, caracterizada por uma das seguintes condições:

1- Pelo menos duas crises não provocadas (ou duas crises reflexas) ocorrendo em um intervalo superior a 24 horas;

Entende-se por crises não provocadas as crises isoladas ou agrupadas dentro de um período de 24 horas, que ocorrem a partir de um mês de vida, na ausência de um fator clínico precipitante (ex.: traumatismo craniano ou encefalite) (HAUSER; BEGHI, 2008).

2- Uma crise não provocada (ou uma crise reflexa) e chance de uma nova crise estimada em pelo menos 60%;

Uma crise é denominada reflexa quando sua ocorrência está relacionada a um estímulo externo e/ou a uma atividade do indivíduo, como um lampejo luminoso ou um movimento (BLUME et al., 2001).

3- Diagnóstico de uma síndrome epiléptica.

Uma síndrome epiléptica é definida como um distúrbio epiléptico caracterizado pela presença de sinais e sintomas que usualmente aparecem em conjunto. Os sinais e sintomas podem ser clínicos (como tipos de crises e modo de aparecimento destas, achados neurológicos e neuropsicológicos) ou achados de exames complementares, como eletroencefalograma (EEG) e estudos de neuroimagem (BERG et al., 2010).

Ressalta-se que a definição de 2014, propõe o termo *epilepsy resolved* (“epilepsia resolvida”). De acordo com a proposta, a epilepsia é considerada “resolvida” nos indivíduos que tiveram uma epilepsia relacionada a uma determinada faixa etária e que agora ultrapassaram essa idade, ou naqueles que tiveram a última crise há mais de 10 anos e estão há pelo menos 5 anos sem usar fármacos anticonvulsivantes (FISHER et al., 2014).

O termo “resolvida” foi escolhido para ser distinto de “cura” ou “remissão”. Estar “resolvida” não garante que a epilepsia não retornará, mas significa que as chances desse retorno são pequenas. Além disso, seria inadequado definir a epilepsia como “curada”, dado que uma pessoa que teve diagnóstico de epilepsia sempre terá maior risco de ter crises epilépticas do que a população geral (FISHER et al., 2014; FISHER, 2015).

2.1.3 Terminologias e classificações

Ao longo do tempo, o conceito e a classificação da epilepsia e das crises epilépticas têm sido discutidos e redefinidos de acordo com as necessidades de adequação às novas descobertas. Por mais de 35 anos, a epilepsia foi classificada de acordo com sua etiologia nos termos idiopática, sintomática ou criptogênica (ILAE, 1981). Além disso, os termos crises parciais, crises generalizadas e crises não classificáveis, propostas pela Comissão sobre Classificação e Terminologia da Liga Internacional Contra a Epilepsia, em 1981, foram utilizados para descrever os tipos de crises epilépticas (ILAE, 1981).

De modo simplificado, de acordo com essa classificação, as crises parciais são aquelas que se originam de um grupo de neurônios em uma parte de um hemisfério cerebral. Estas podem ser subdivididas em crises parciais simples (sem perda da consciência) ou parciais

complexas (com perda parcial ou total da consciência), ambas podendo evoluir para crises secundariamente generalizadas (ILAE, 1981).

Já as crises epilépticas generalizadas são aquelas em que desde o início ocorre o envolvimento de ambos os hemisférios cerebrais. As crises generalizadas também podem ser subdivididas, sendo classificadas em convulsivas (aqueles em que o sintoma motor é predominante, podendo ou não haver alteração da consciência) e não convulsivas (aqueles em que não há fenômeno motor muito evidente, predominando a alteração da consciência) (ILAE, 1981). Por fim, as consideradas crises não classificáveis são aquelas que não se enquadram nos dois subtipos anteriores mencionados.

As classificações da ILAE, de 1981, são baseadas em conceitos que, em sua maior parte, são anteriores à era moderna da neuroimagem, tecnologia genômica e conceitos de biologia molecular (BERG et al., 2010). Os autores originais previam que mudanças na classificação seriam necessárias assim que informações fossem adquiridas e novas tecnologias de diagnóstico fossem desenvolvidas. Assim, em 2010, a Comissão responsável pela classificação e terminologia das crises e epilepsias da ILAE publicou uma nova revisão de conceitos, terminologia e abordagem das epilepsias. Entre as alterações realizadas, as denominações que classificavam a epilepsia como idiopática, sintomática e criptogênica foram substituídas pelos termos (e seus conceitos associados) genética, estrutural/metabólica e causa desconhecida (BERG et al., 2010).

Todavia, diversas críticas surgiram na literatura ante a proposta de classificação de 2010. E ainda em 2013, foi lançado um novo relatório da Comissão da ILAE sobre classificação e terminologia das epilepsias (SCHEFFER et al., 2013). Nesse documento, alguns termos foram revisados ou mais bem definidos e a epilepsia passou a ser classificada em: genética (a epilepsia que é diretamente resultante de um defeito genético conhecido ou presumido), estrutural (epilepsia em que uma lesão estrutural é visível na neuroimagem e concordante com os achados eletroclínicos, sugerindo uma relação direta entre a lesão e a epilepsia), metabólica (defeito metabólico com sintomas sistêmicos que levam também ao desenvolvimento de epilepsia), imunológica (epilepsia em que há evidência de um processo autoimune ocasionando inflamação do sistema nervoso central), infecciosa (epilepsia desencadeada por um processo infeccioso, como neurocisticercose, toxoplasmose, HIV) e desconhecida (a causa da epilepsia não pode ser determinada) (SCHEFFER et al., 2013).

Em todas as revisões terminológicas realizadas até o presente pelas Comissões da ILAE, presumia-se que a classificação deveria ser constantemente revisada para refletir, de

forma clara, todos os avanços obtidos na pesquisa básica e clínica em epilepsia, permitindo, assim, sua incorporação na prática clínica. Desse modo, em paralelo ao avanço das pesquisas na área da epileptologia, a Comissão da ILAE de Classificação e Terminologia 2013-2017, recentemente revisou a classificação e está desenvolvendo uma nova proposta para a classificação das crises epilépticas. Segundo os autores, a nova proposta tem como objetivo tornar mais fácil e preciso o diagnóstico e a classificação das crises, e espera-se que essa nova versão seja mais completa (FISCHER et al., 2016, disponível em: <http://www.ilae.org/Visitors/Centre/documents/ClassificationSeizureILAE-2016.pdf>).

De acordo com a nova proposta, a reclassificação das crises baseia-se em três características principais: o local de origem das crises, o nível de “consciência” (*awareness*) durante uma crise, e, por fim, em outras características da crise (como os sintomas e os movimentos). E as mesmas passaram a ser classificadas de acordo com o seu início em: focal, generalizada, início desconhecido e não classificável (disponível em: <http://www.ilae.org/Visitors/Centre/documents/ClassificationSeizureILAE-2016.pdf>). No entanto, é importante ressaltar que esta reclassificação ainda não foi oficialmente lançada pela ILAE, por este motivo indica-se aqui o link para acesso ao documento prévio.

2.1.4 Implicações do gênero sobre a epilepsia

A epilepsia é uma doença cerebral, e está associada a mudanças estruturais e funcionais no cérebro. A localização específica, a extensão e a prevalência dessas alterações variam de acordo com o tipo e a duração da epilepsia (SAVIC; ENGEL, 2014). Estudos de imagem mostram que homens e mulheres saudáveis diferem na organização estrutural e funcional de várias redes cerebrais que são conhecidas por processar as crises epilépticas. Algumas dessas diferenças entre os sexos existem desde o nascimento até a senescência (LUDERS et al., 2005; GIEDD et al., 2006), e é plausível que possam influenciar a expressão e o desenvolvimento de pelo menos certas síndromes epilépticas nos seres humanos (SAVIC; ENGEL, 2014).

De fato, estudos epidemiológicos sugerem que o gênero pode afetar a susceptibilidade à epilepsia e o seu prognóstico. Os dados relatam que a incidência global da epilepsia é ligeiramente maior nos homens do que nas mulheres, tanto nos países em desenvolvimento como nos industrializados (PERUCCA et al., 2014). Já a probabilidade de remissão das crises não difere significativamente entre homens e mulheres (COCKERELL et al., 1997), porém o sexo masculino está associado a um risco maior de morte prematura

(FORSGREN et al., 2005), incluindo morte súbita e inesperada na epilepsia (SUDEP) (HESDORFFER et al., 2011).

Ademais, sabe-se que algumas etiologias da epilepsia adquirida, como a lesão cerebral traumática TBI (*traumatic brain injury*) são mais comuns nos homens. O TBI é uma das principais causas de epilepsia adquirida nos adultos, representando cerca de 30% das etiologias identificadas em pacientes com idade entre os 16-34 anos (HAUSER et al., 1993), sendo que o risco de desenvolvimento de crises está diretamente relacionado à gravidade do trauma (ANNEGERS et al., 1998; LOWENSTEIN, 2009).

Além do mais, estudos sobre a relação entre sexo e epilepsia pós-traumática revelam que as crises decorrentes de lesões na cabeça são até seis vezes mais comuns em homens do que em mulheres. Isto ocorre porque os homens têm uma predisposição maior para comportamentos que envolvem risco físico e, portanto, são mais susceptíveis a sofrer lesões que levam ao desenvolvimento da epilepsia (HAUSER et al., 1993; PERUCCA et al., 2014).

Vale evidenciar que estudos de imagem em seres humanos indicam que o tamanho do cérebro (SPRING et al., 2007), a razão entre a substância branca/cinza (ALLEN et al., 2003), a espessura cortical (SOWELL et al., 2007) e a microestrutura do tecido (KANAAN et al., 2012) diferem entre homens e mulheres. Além disso, a conectividade do cérebro, um potencial candidato para o desenvolvimento de redes epileptogênicas, também mostra diferenças entre os sexos. Nesse sentido, Ingalkhalikar e grupo (2014), mostrou que os homens apresentam mais conexões cerebrais intrahemisféricas do que as mulheres, já as mulheres apresentam um número maior de conexões interhemisféricas do que homens (INGALKHALIKAR et al., 2014).

Estes dados supracitados são consistentes com as diferenças sexuais reveladas por imagens de ressonância magnética funcional durante a ativação cerebral (RUBIA et al., 2013) e durante o estado de repouso (WANG et al., 2012). Além disso, a ressonância funcional revelou que os homens e mulheres ativam diferentes circuitos neurais para codificar os estímulos na memória, o que explica o porquê das mulheres terem melhor memória relacionada a eventos emocionais (CANLI et al., 2002).

Estudos pré-clínicos também tem relatado diferenças sexuais em vários componentes da reorganização circuitária após insulto cerebral epileptogênico. Nesse sentido, Pereno e Beltramino (2009) mostraram que os ratos machos são mais suscetíveis que as fêmeas à neurodegeneração induzida por cainato (PERENO; BELTRAMINO, 2009). E Igarashi e grupo (2001) relataram que a redução no volume cortical e a severidade da perda

neuronal no tálamo após TBI foram mais graves em camundongos machos do que em camundongos fêmeas (IGARASHI et al., 2001). O mesmo foi confirmado por Hall e colaboradores (2005), que demonstraram que tanto a magnitude como a taxa de neurodegeneração pós-TBI foram maiores nos machos do que nas fêmeas (HALL et al., 2005).

Assim, juntos os dados clínicos e experimentais indicam que o gênero pode, de fato, afetar a progressão do processo epileptogênico (PITKÄNEN et al., 2014). Além disso, as diferenças sexuais que podem influenciar na epilepsia não estão relacionadas apenas com os aspectos estruturais do sistema nervoso central. Por exemplo, padrões diferenciados de metabolismo de drogas estão bem documentados, e estudos mostram que uma droga pode ser efetiva em um sexo, mas não em outro (SCHARFMAN et al., 2009; MARINO et al., 2012; IBARRA et al., 2013), o que reforça a importância dos estudos pré-clínicos que buscam novas terapias antiepileptogênicas serem desenvolvidos em ambos os性os.

Contudo, é evidente que as fêmeas raramente são estudadas e comparadas aos machos. Como por exemplo, sabe-se que as doenças neuroinflamatórias são mais prevalentes nas mulheres do que nos homens, e há indicações de que o sexo também afeta o tipo e a gravidade de uma resposta inflamatória no sistema nervoso central após uma lesão cerebral epileptogênica (MANWANI et al., 2013); há na literatura nove estudos de tratamentos antiepileptogênicos que visam a resposta imune/inflamatória, cinco desses estudos foram conduzidos em ratos machos e quatro em ratos fêmeas, no entanto, nenhum dos estudos comparou o efeito desses tratamentos entre machos e fêmeas (PITKÄNEN et al., 2014).

A inclusão inadequada das fêmeas nos estudos biomédicos levou ao desenvolvimento pelo NIH (*National Institutes of Health*) em 2014, de uma política sobre a inclusão de ambos os sexos na pesquisa pré-clínica (CLAYTON; COLLINS, 2014). Espera-se que a mesma seja seguida, para que haja uma melhor compreensão das diferenças relacionadas ao sexo no processo epileptogênico após um insulto cerebral (PITKÄNEN et al., 2014; SCHARFMAN; MACLUSKY, 2014).

2.1.5 Inflamação e epilepsia

As crises epilépticas podem desencadear uma série de alterações bioquímicas no cérebro, afetando a liberação de neurotransmissores, as sinalizações intracelulares e a expressão gênica de proteínas. Embora os mecanismos fisiopatológicos envolvidos no

processo epileptogênico ainda não estejam bem elucidados, a neuroinflamação tem sido correlacionada com o desenvolvimento de maior susceptibilidade as crises epilépticas, bem como, com os danos neuronais decorrentes das mesmas (VEZZANI e GRANATA, 2005; VEZZANI, 2014; VEZZANI e VIVIANI, 2015).

Nesse sentido, a literatura relata que fatores pró-inflamatórios (como citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão celular entre outros) são rapidamente induzidos no cérebro de roedores durante as crises epiléticas, sugerindo que os mecanismos imunes podem ser desencadeados no SNC por convulsões (VEZZANI e GRANATA, 2005; VEZZANI, 2014). Em camundongos e ratos adultos, a produção de interleucina (IL)-1 β ocorre nos primeiros 60 minutos após a indução de crise nas áreas cerebrais onde a atividade epiléptica origina e se espalha. O aumento da produção desta citocina tanto por astrócitos quanto pela micrógia tem sido pré-associado à perda neuronal decorrente de crises epilépticas (VEZZANI e GRANATA, 2005; VEZZANI e VIVIANI, 2015). Observa-se também um aumento da liberação de fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e IL-6 em fatias de hipocampo de ratos submetidos a crises epilépticas (VEZZANI et al., 2002). Além disso, estudos demonstraram que a inibição da produção de IL-1 β , moléculas de adesão ou de prostaglandina E2, diminuem o número de crises e podem retardar a epileptogênese (VEZZANI e GRANATA, 2005; RAVIZZA et al., 2008).

Ademais, Kan e colaboradores (2012) observaram o aumento da expressão de mais de vinte parâmetros inflamatórios em cérebro de pacientes com epilepsia do lobo temporal, sugerindo que ocorre a coativação de múltiplos mediadores inflamatórios nessa condição patológica (KAN et al., 2012). Em conjunto, Tan e colaboradores (2015) demonstraram em pacientes com epilepsia do lobo temporal, um aumento da expressão hipocampal de NLRP1, uma proteína essencial para a regulação da imunidade em condições fisiológicas que interage com caspases, levando a morte celular programada (TAN et al., 2015).

Em vista da importância desse tema, os estudos clínicos e em animais acerca da relação entre a inflamação e a epilepsia tem se acentuado nas últimas décadas. No entanto, embora diversos estudos tenham evidenciado o papel do aumento das citocinas e outros parâmetros inflamatórios sobre os efeitos causados pelas crises epilépticas de diferentes origens. Até o momento, nenhuma molécula com efeito anti-inflamatório mostrou-se capaz de parar o processo epileptogênico, e assim, evitar a ocorrência da epilepsia.

2.2 EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL

2.2.1 Aspectos gerais

A epilepsia do lobo temporal (TLE - *Temporal Lobe Epilepsy*) é a forma mais frequente de epilepsia na população adulta, responsável por 40% de todos os casos de epilepsia nessa população (GASTAUT et al., 1975; ENGEL, 2001; LÖSCHER et al., 2013). De acordo com a origem e a semiologia das crises, a TLE pode ser subdividida em mesial (ou medial) e neocortical (ou lateral). Na TLE neocortical a zona epileptogênica está localizada em estruturas do neocôrte temporal, enquanto que na TLE mesial as crises originam-se nas estruturas temporais mesiais, como o hipocampo (ANDRADE-VALENÇA et al., 2006).

A importância clínica da TLE mesial decorre da sua alta prevalência, visto que a mesma corresponde a aproximadamente 60% dos casos de TLE, e também por conta da elevada proporção de pacientes refratários⁴ ao tratamento medicamentoso (ENGEL, 2001; WIESER, 2004; KWAN et al., 2010). O tratamento farmacológico para a TLE é baseado na utilização de fármacos anticonvulsivantes, seja em monoterapia ou politerapia, a depender do controle das crises e da tolerância individual a estas drogas. No entanto, apenas 11% dos pacientes apresentam controle total de crises com o uso desses fármacos (WIESER, 2004), e essa refratariedade ao tratamento clínico, pode levar à indicação cirúrgica.

Embora as causas de TLE sejam amplamente variadas (por exemplo: tumor cerebral, traumatismo craniano, *status epilepticus*), a esclerose hipocampal é um achado patológico comum, encontrada em 50-70% dos pacientes com TLE mesial refratária ao tratamento clínico (WIESER, 2004). A esclerose do hipocampo envolve um padrão característico de perda neuronal seletiva nas regiões CA1 e CA3 e no hilo dentado da formação hipocampal, enquanto que as camadas celulares da CA2 e do giro dentado são relativamente poupadadas. A neurodegeneração na TLE também é encontrada em estruturas extrahipocampais, tais como o córtex entorrinal, e a amígdala, isto é, em estruturas límbicas anatomicamente ligadas ao lobo mesiotemporal (YILMAZER-HANKE et al., 2000).

Ressalta-se que a esclerose hipocampal é parte de um conjunto de alterações que ocorrem durante a epileptogênese. Além do dano neuronal, gliose e brotamento de fibras

⁴ Epilepsia resistente a fármacos anticonvulsivantes é definida como a falha de dois fármacos antiepilepticos escolhidos apropriadamente e tolerados, usados em monoterapia ou em combinação, em deixar o paciente persistentemente livre de crises (KWAN et al., 2010).

musgosas (do inglês *mossy fiber sprouting*, que corresponde ao crescimento aberrante de axônios das células granulares que projetam-se para as células piramidais da CA3), também são achados histológicos comuns na TLE e têm sido implicados na epileptogênese (BUCKMASTER, 2012).

Cabe aqui ressaltar que a epileptogênese refere-se ao processo pelo qual um insulto cerebral (tais como: traumatismo craniano, tumor cerebral, *status epilepticus*) induz alterações moleculares e funcionais no cérebro, levando ao aparecimento de crises recorrentes espontâneas (SRSs - *spontaneous recurrent seizures*), que caracterizam a epilepsia (HERMAN, 2002).

De acordo com Sloviter (1994), a única condição patológica comum presente em todos os pacientes com TLE é a perda de neurônios no hilo do giro dentado, denominada esclerose do endfolium (SLOVITER, 1994). E por essa razão, ele presume que os neurônios do hilo dentado sejam responsáveis pela excitabilidade das células granulares, e sugere que a perda neuronal no hilo seja o denominador patológico comum envolvido no desenvolvimento de um foco epiléptico no hipocampo (SLOVITER, 1994). No entanto, a importância da morte neuronal como o precipitante da epileptogênese permanece em discussão.

2.2.2 Comorbidades médicas na TLE

Além das crises epilépticas, os pacientes com TLE sofrem com comorbidades⁵ cognitivas e comportamentais. Estima-se que cerca de 50% dos adultos com epilepsia ativa apresentam ao menos um transtorno médico comórbido (KEEZER et al., 2015), os quais podem ser consequências das alterações morfológicas e funcionais no lobo temporal (MARCANGELO; OVSIEW, 2007).

Os distúrbios psiquiátricos estão entre as comorbidades presentes nos pacientes epilépticos. A prevalência da presença de qualquer desses distúrbios varia de 19% a 48% entre pacientes epilépticos, com diferenças acentuadas entre os tipos de epilepsia considerados (GAITATZIS et al., 2012; KANNER, 2016). Por exemplo, o risco de desenvolvimento de distúrbios psiquiátricos é maior em pacientes com TLE (60%), do que entre pacientes com epilepsia generalizada primária (37%) (EDEH; TOONE, 1987).

⁵ Comorbidade é definida como a presença de uma (ou mais) doença/desordem adicional que ocorre concomitantemente com uma doença/desordem primária. E não necessariamente a ocorrência de uma doença/desordem necessita da presença da outra (KEEZER et al., 2015).

A depressão é o transtorno psiquiátrico comórbido mais frequente na epilepsia, sendo considerada a principal causa da baixa qualidade de vida relacionada à saúde (QVLS), e a responsável por dobrar os custos totais da assistência médica com a doença (TELLEZ-ZENTENO et al., 2007; KEEZER et al., 2015). A literatura também relata que indivíduos não epilépticos que de alguma forma são afetados pela doença, como por exemplo os pais de crianças epilépticas, apresentam níveis elevados de depressão, semelhantes aos pacientes com epilepsia (HOPPE; ELGER, 2011; KEEZER et al., 2015).

As crises epilépticas e as descargas neurais hipersincrônicas subclínicas estão entre as possíveis causas do humor depressivo, assim como os fármacos anticonvulsivantes, os quais também parecem facilitar o desenvolvimento da depressão. Estes estão relacionados com o aumento da taxa de suicídio nos pacientes com epilepsia (MILLER et al., 2008; HOPPE; ELGER, 2011).

Além do mais, a TLE tem sido associada a disfunções cognitivas (como concentração, capacidade de pensar claramente), particularmente a distúrbios na memória de curta e de longa duração (HERMANN et al., 2006). Dentre os mecanismos envolvidos no comprometimento da memória, estão as alterações morfológicas e funcionais consequentes das crises refratárias em estruturas do lobo temporal mesial (hipocampo e estruturas adjacentes) necessárias para o armazenamento temporário da memória, e em áreas corticais, responsáveis pelo armazenamento permanente da memória de longo prazo (ZEMAN, 2012). Juntamente com as crises e a atrofia hipocampal, o uso de fármacos anticonvulsivantes também parece colaborar para um grau maior do comprometimento da memória nos pacientes epilépticos (ALESSIO et al., 2004; BAXENDALE et al., 2006).

Dados de estudos epidemiológicos sugerem a existência de uma relação bidirecional entre vários distúrbios psiquiátricos e a epilepsia, incluindo transtornos de humor e ansiedade, transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) e psicose (HESDORFFER et al., 2012; KANNER, 2016). Esta relação bidirecional implica que não só os pacientes com epilepsia tendem a desenvolver transtornos psiquiátricos, mas também que pacientes com transtornos psiquiátricos primários apresentam maior risco de desenvolver epilepsia. Isso não significa que a epilepsia cause desordens psiquiátricas ou vice-versa, mas sim que tal relação poderia ser explicada pela existência de mecanismos patogênicos comuns presentes tanto na epilepsia como nos transtornos psiquiátricos (KANNER, 2016).

Estudos também sugerem que os distúrbios na função psicológica, na cognição ou no comportamento podem preceder o aparecimento das crises e podem representar a

manifestação inicial da epilepsia (HESDORFFER et al., 2012; KANNER, 2016). Isto leva à ideia de que podem existir marcadores neurocognitivos ou neurocomportamentais do início da epilepsia que têm uma relação temporal com o início das crises epilépticas. Sendo assim, a caracterização destes marcadores teria um valor prognóstico significativo e, sem dúvida, poderia levar ao desenvolvimento de tratamentos preventivos para distúrbios cognitivos ou comportamentais e, possivelmente, ao próprio aparecimento das crises (WILSON; BAXENDALE, 2016).

De acordo com Wilson e Baxendale (2016), é concebível que, em alguns pacientes, os distúrbios cognitivos ou comportamentais possam se apresentar como sintomas primários da epilepsia, seguidos das crises decorrentes da mesma rede cerebral “doente”. Enquanto que em outros pacientes, o cenário inverso ocorre, com crises apresentando-se como o primeiro sintoma da doença (WILSON; BAXENDALE, 2016).

2.2.3 Modelo experimental de TLE

O desenvolvimento de novas terapias farmacológicas ou cirúrgicas para tratar a epilepsia, além da criação de uma terapêutica capaz de prevenir o desenvolvimento da mesma, são de grande relevância para a melhora na condição de vida dos pacientes epilépticos. Nas últimas décadas, modelos animais de epileptogênese têm aumentado muito a compreensão dos processos que levam à epilepsia e, assim, de potenciais alvos para terapia antiepileptogênica (LÖSCHER; BRANDT, 2010). No entanto, nem todos os modelos são adequados para testar fármacos com potencial antiepiléptico ou modificadores da doença (STABLES et al., 2003). As razões para tal constatação incluem um longo período de latência⁶ e baixa incidência de crises espontâneas, o que complica os estudos com fármacos.

Com base em tais considerações, em 2002, o *National Institutes of Health/National Institute of Neurological Disorders and Stroke* (NIH/NINDS) realizou um *workshop*, que recomendou apenas dois grupos de modelos como ferramentas potencialmente úteis para a descoberta de tratamentos antiepileptogênicos: o *kindling* e o modelo de TLE pós-SE (STABLES et al., 2003). Embora o *kindling* tenha sido crucial para a compreensão do processo epileptogênico e ainda seja o modelo animal de TLE mais amplamente utilizado, sobretudo durante o desenvolvimento pré-clínico de fármacos anticonvulsivantes

⁶ Período latente é definido como o intervalo de tempo entre o insulto cerebral e a ocorrência da primeira crise espontânea.

(MORIMOTO et al., 2004), a sua utilização na pesquisa de fármacos antiepileptogênicos ou modificadores da doença tem diminuído, particularmente devido ao desenvolvimento de vários modelos de TLE pós-SE. Estes últimos modelos citados parecem ser mais adequados do que o *kindling* para a pesquisa de drogas antiepilepticas, porque o período latente entre o SE e a ocorrência da primeira crise espontânea permite testar fármacos como um tratamento profilático contra a epilepsia (PITKÄNEN; HALONEN, 1998; LÖSCHER; BRANDT, 2010).

Assim, nos últimos anos, os modelos de TLE pós-SE têm sido amplamente utilizados na busca por fármacos antiepilepticos. Protocolos variados de indução do SE, variações no tempo de duração do mesmo, bem como diferentes tempos de início e duração do tratamento medicamentoso após o SE vem sendo empregados (testados), permitindo, assim, a análise de quais fatores experimentais são importantes para o tratamento antiepileptogênico ou modificadores da doença nesses modelos (LÖSCHER; BRANDT, 2010).

Nos modelos de TLE pós-SE em roedores, diferentes convulsivantes químicos e padrões de estimulação elétrica intracerebral são utilizados para induzir o *status epilepticus*, o qual é seguido, após um “período latente” de dias a semanas, por crises recorrentes espontâneas (CAVALHEIRO et al., 1996; STABLES et al., 2003; MORIMOTO et al., 2004; CURIA et al., 2008). Entre os convulsivantes químicos, o cainato e a pilocarpina têm sido os mais caracterizados em relação à fenomenologia das crises, as características eletroencefalográficas, os resultados cognitivos e a neuropatologia. Em ambos os modelos, os roedores desenvolvem crises recorrentes espontâneas, lesões hipocampais e extrahipocampais, e alterações comportamentais e cognitivas semelhantes às características clínicas da TLE (CAVALHEIRO et al., 1996; MORIMOTO et al., 2004; CURIA et al., 2008).

O modelo proposto por Turski na década de 80 consiste na administração sistêmica de altas doses de pilocarpina (300 – 380 mg/Kg), e é muito utilizado até hoje (TURSKI et al., 1983; TURSKI et al., 1984). Além disso, também foram desenvolvidos protocolos de dosagem *ramp-up* para a pilocarpina (GRÖTICKE et al., 2007), que permitem uma dosagem mais individualizada do que as injeções em *bolus*, aumentando a percentagem de animais que desenvolvem SE e diminuindo a mortalidade. Em ambos os modelos com administração sistêmica de pilocarpina, o SE é interrompido, após pelo menos 60 minutos de duração, por fármacos anticonvulsivantes (ex.: diazepam) ou anestésicos gerais (ex.: pentobarbital), para reduzir a alta mortalidade associada ao modelo. Ademais, uma alternativa para a administração sistêmica da pilocarpina é a injeção focal unilateral na amígdala ou no

hipocampo, que evita o dano cerebral generalizado associado com a administração sistêmica (CAVALHEIRO et al., 2006; DUDEK et al., 2006).

O mecanismo proposto para a propagação das crises induzidas por pilocarpina é que ocorre inicialmente a ativação das vias colinérgicas muscarínicas cujos eferentes ativam vias glutamatérgicas. O que reforça a hipótese desse mecanismo é o fato de que é possível bloquear crises induzidas por pilocarpina por meio do pré-tratamento com antagonistas colinérgicos (ex.: atropina). No entanto, o tratamento com esses mesmos antagonistas após a instalação do SE não bloqueia as crises (TURSKI et al., 1983; TURSKI et al., 1984). Portanto, a iniciação das crises é feita por agonista colinérgico, mas a manutenção é glutamatérgica.

Dados que reforçam essa hipótese mostram que regiões lesadas pelo SE induzido por pilocarpina não são necessariamente aquelas onde existe grande presença de receptores colinérgicos. Sendo assim, a excitotoxicidade induzida pela excessiva liberação de glutamato seria responsável pelas lesões observadas (WASTERLAIN; SHIRASAKA, 1994).

2.3 ESTATINAS

2.3.1 Breve histórico

Na década de 50, quando os estudos epidemiológicos sobre a relação entre os níveis elevados de colesterol plasmático e as doenças coronárias foram iniciados, foi verificada a existência de uma relação direta entre ataques cardíacos e colesterol. A partir disso, o interesse clínico no colesterol levou ao desenvolvimento de intensas pesquisas para determinar a via pela qual o mesmo era sintetizado no corpo, bem como o seu mecanismo de regulação (ENDO, 2010).

Os achados sugeriram que a inibição da 3-hidroxi-3-metilglutaril Coenzima A (HMG-CoA) redutase poderia ser uma maneira efetiva de diminuir o colesterol plasmático em humanos. Assim, entre os anos 1950 e 1960, diferentes laboratórios iniciaram pesquisas por moléculas capazes de bloquear um dos 30 passos da via de síntese do colesterol a partir da acetil-coenzima A. Durante esse período, diversas moléculas homólogas aos intermediários da via foram sintetizadas, porém nenhuma apresentava eficácia clínica. Já em 1968, Akira Endo no laboratório de pesquisas da Sankyo, especulava que fungos poderiam produzir substâncias capazes de inibir a HMG-CoA redutase. Assim, em julho de 1973, a partir da espécie *Penicillium citrinum*, Endo identificou a compactina (também chamada de mevastatina), que em baixas concentrações inibia competitivamente a HMG-CoA redutase. No entanto, a compactina apresentava toxicidade em cães, e seu o desenvolvimento clínico foi interrompido. Já em 1979, a partir do *Aspergillus terreus*, os pesquisadores da Merck isolaram um composto chamado de mevinolina ou lovastatina a qual em setembro de 1987, foi aprovada pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para se tornar a primeira estatina disponível comercialmente (ENDO, 2010).

Desde que a lovastatina começou a ser comercializada, seis estatinas, incluindo duas semi-sintéticas (sinvastatina e pravastatina) e quatro sintéticas (fluvastatina, atorvastatina, rosuvastatina e pitavastatina), foram introduzidas no mercado (ENDO, 2010). O derivado sintético, cerivastatina, começou a ser comercializado em 1997. No entanto, devido à incidência de casos de rabdomiólise, que provocaram a morte de mais de uma centena de pessoas, esse fármaco foi retirado do mercado em 2001 (ENDO, 2010).

Atualmente as estatinas estão entre as classes de fármacos mais prescritos no mundo. Estima-se que mais de 30 milhões de pessoas fazem uso de alguma estatina (ENDO, 2010), sendo a atorvastatina a molécula mais prescrita (ADAMS et al., 2015).

No ano de 2003, a atorvastatina, comercializada com o nome fantasia de Lipitor® produzida pela Pfizer, alcançou o recorde de vendas de toda a história da indústria farmacêutica. Em 2008, o laboratório responsável pela sua comercialização obteve um lucro de 12,4 bilhões de dólares (PFIZER, 2008).

2.3.2 Mecanismo de ação e aspectos farmacocinéticos

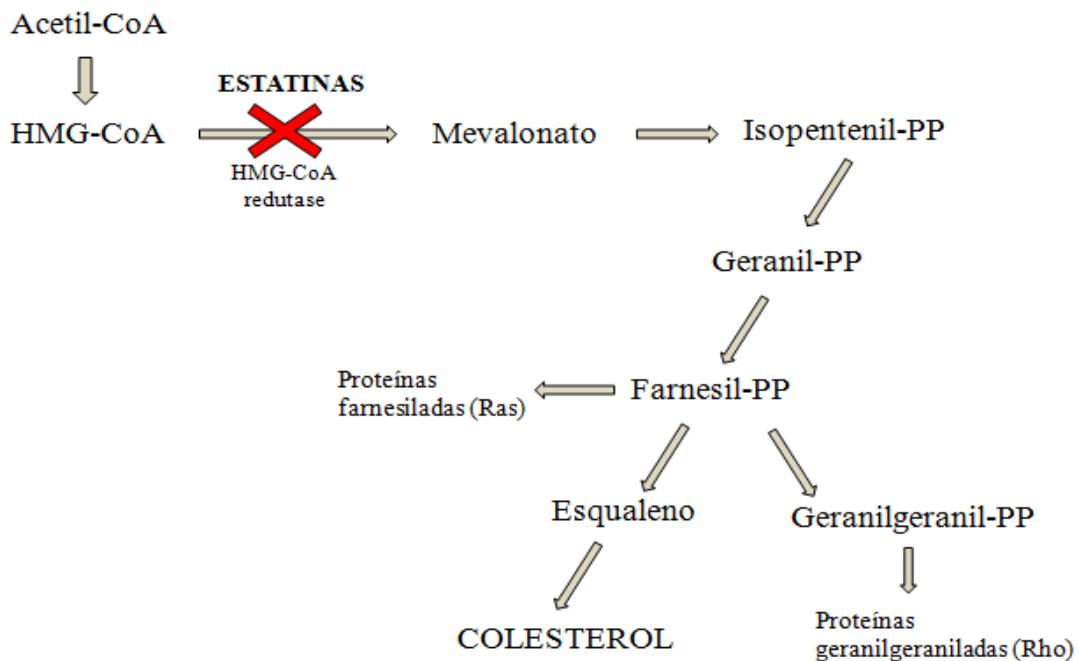
As estatinas são os fármacos mais eficazes e bem tolerados para o tratamento das dislipidemias. E também são amplamente utilizados na prevenção primária e secundária da doença arterial coronariana (SPENCER et al., 2004).

O mecanismo de ação das estatinas ocorre através da inibição, de modo competitivo e reversível, da enzima HMG-CoA redutase, a qual é o marca-passos da via de biossíntese do colesterol no fígado, responsável por catalisar a redução do HMG-CoA a mevalonato (ENDO, 2010; EGOM; HAFEEZ, 2016) (figura 1).

A diminuição do conteúdo intracelular de colesterol provocada pelas estatinas induz o aumento na atividade transcricional dos SREBFs (do inglês *Sterol responsive element binding factor*), causado pela atividade catalítica do SCAP (do inglês *SREBF cleavage activating protein*), uma proteína sensível ao conteúdo intracelular do colesterol (SATO, 2010). Esse aumento na atividade dos SREBFs leva a uma maior expressão dos receptores de LDL na superfície do hepatócito, aumentando desta forma a remoção do colesterol LDL (LDL-C) da circulação plasmática (SATO, 2010).

Apesar do efeito predominante das estatinas se dar sobre os níveis de LDL-C, elas também reduzem triglicerídeos (TG) e aumentam modestamente o colesterol HDL (HDL-C), atuando assim de uma forma benéfica em todo o perfil lipídico (EXPERT PANEL ON et al., 2001). Estudos em humanos mostraram que a magnitude da inibição da biossíntese do colesterol difere substancialmente entre as estatinas (MCTAGGART et al., 2001). Isso porque as diferenças estruturais entre elas afetam suas propriedades farmacológicas, tais como a afinidade com o sítio ativo da enzima HMG-CoA redutase, a absorção, a biodisponibilidade, o metabolismo e o mecanismo de excreção, e o tempo de meia vida ($T_{1/2}$) (EGOM; HAFEEZ, 2016).

Figura 1- Inibição da síntese de colesterol pelas estatinas



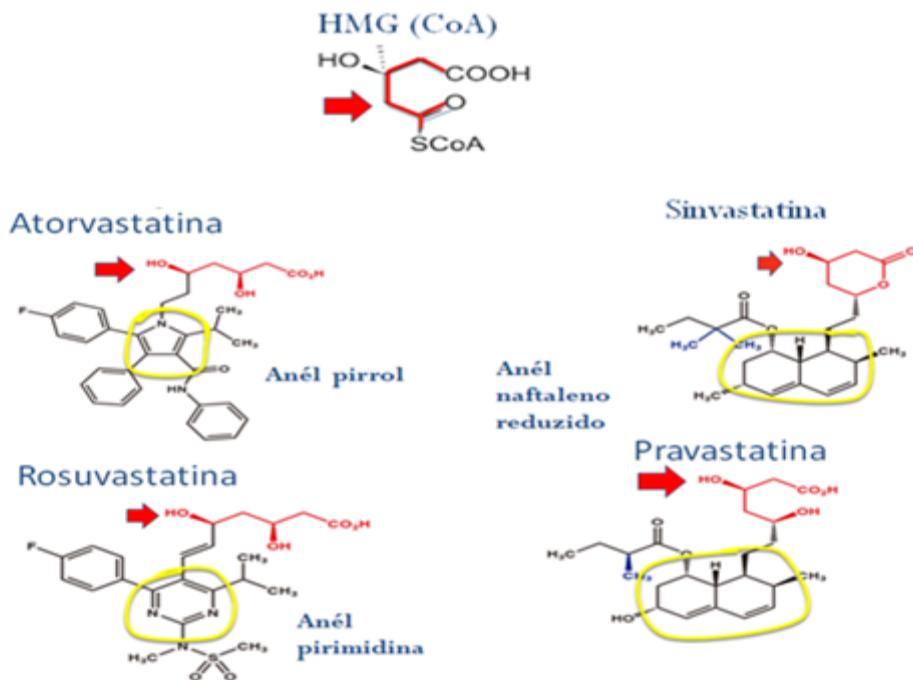
Fonte: Adaptado de REISS e WIRKOWSKI (2009).

Legenda: As estatinas inibem a conversão de 3-hidróxi-3-metilglutaril-Coenzima A (HMG-CoA) a mevalonato, a etapa limitante na biossíntese de colesterol. Inibindo a síntese de mevalonato, as estatinas previnem a síntese de derivados isoprenóides, os quais estão envolvidos na modificação pós-traducional de proteínas (REISS; WIRKOWSKI (2009).

Quimicamente, a estatinas têm na sua estrutura três zonas distintas: a primeira é uma zona análoga ao HMG-CoA; a segunda é um anel hidrofóbico que está ligado por uma ligação covalente ao substrato análogo, e é responsável pela ligação do substrato à enzima, gerando o complexo enzima-substrato (no caso enzima-estatina); e por último é uma zona que vai conferir à molécula as suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas, como a sua solubilidade (SCHACHTER, 2005) (figura 2).

As estatinas podem ser hidrofílicas e lipofílicas. No primeiro caso estão a rosuvastatina, que possui um grupo metano sulfonamida, e a pravastatina, que possui um grupo polar hidroxila. Já as demais, lovastatina, simvastatina, atorvastatina e fluvastatina são essencialmente lipofílicas (SCHACHTER, 2005; EGOM; HAFFEZZ, 2016).

Figura 2 – Estrutura das estatinas



Fonte: Adaptado de EGOM e HAFEEZ (2016).

Legenda: Estrutura química do HMG-CoA e de algumas estatinas. Em amarelo está a região dos anéis covalentemente ligada ao grupo farmacóforo (em vermelho) (EGOM; HAFEEZ, 2016).

De todas as estatinas, a rosuvastatina é a que apresenta uma maior afinidade com a HMG-CoA redutase, uma vez que apresenta mais locais de ligação entre si e a enzima, o que resulta numa formação mais eficiente do complexo enzima-substrato. Esta maior afinidade com a HMG-CoA redutase resulta numa maior potência desta estatina em relação às outras no que diz respeito à inibição da enzima (SCHACHTER, 2005).

Conforme citado anteriormente, o mecanismo de ação das estatinas ocorre pela inibição da HMG-CoA redutase no fígado. O transporte para o tecido hepático parece influenciado pelos OATPs (*Organic Anion Transporting Polypeptides*) (FONSECA, 2005; HIRANO et al., 2006). Os OATPs são transportadores de captação sódio independentes capazes de transportar uma grande gama de ânions orgânicos anfipáticos, expressos em diversos tecidos (como fígado, rins, intestino, cérebro e placenta). A proteína OATPC ou OATP1B1 é predominantemente expressa na membrana basolateral dos hepatócitos, onde está envolvida na captação de substâncias endógenas e xenobióticos pelos hepatócitos, sendo capazes de transportar diversos fármacos, incluindo os inibidores de HMG-CoA redutase (pravastatina, pitavastatina, rosuvastatina, atorvastatina, fluvastatina e sinvastatina)

(SORTICA, 2009). Interações farmacológicas que reduzam a disponibilidade do OATP-C ou polimorfismos genéticos que diminuam sua expressão podem assim, reduzir a efetividade das estatinas (FONSECA, 2005; HIRANO et al., 2006; SORTICA, 2009).

De modo similar, a eliminação das estatinas também pode ser influenciada por outro sistema transportador, a glicoproteína-P (P-gp, também conhecida como MDR1), que age como uma bomba de efluxo ATP-dependente que transporta fármacos e xenobióticos para a parte externa das células de diferentes tecidos do organismo (SCHACHTER, 2005). O transporte de substâncias através da P-gp representa um dos vários mecanismos importantes pelos quais é controlada a distribuição de inúmeros fármacos. As substâncias e os polimorfismos genéticos, que induzem ou que inibem a atividade de transporte da P-gp, podem ter um profundo efeito na farmacocinética e na disponibilidade de fármacos transportados pela P-gp, tal como as estatinas, possivelmente comprometendo sua biodisponibilidade (SCHACHTER, 2005; EGOM; HAFEEZ, 2016).

Os inibidores da HMG-CoA redutase são, na sua maioria, administrados em preparações ácidas biologicamente ativas sob a forma de β -hidroxiácido. A lovastatina e a simvastatina são exceções, pois são administradas na forma de pró-fármacos inativos sob a forma de anéis de lactona, sendo hidrolisadas a nível hepático para a forma de hidroxiácido aberto (SCHACHTER, 2005; EGOM; HAFEEZ, 2016).

Em relação ao metabolismo, esse também não é semelhante em todas as estatinas. A atorvastatina, a simvastatina e a lovastatina são metabolizadas por enzimas da família do citocromo P450, principalmente pela enzima CYP3A4; a fluvastatina é metabolizada principalmente pela enzima CYP2C9; porém, a pravastatina não é metabolizada pela família do citocromo P450, e a rosuvastatina e a pitavastatina são muito pouco metabolizados por essa família enzimática, sendo que se considera que também não são metabolizados por essa via (SCHACHTER, 2005; NEUVONEN et al., 2006).

O fato de serem ou não metabolizadas pela família do citocromo P450 é relevante no sentido de perceber uma maior ou menor incidência de efeitos adversos. Estatinas que são metabolizadas pela referida família enzimática têm maior probabilidade de exercer interação com outros fármacos ou alimentos que inibam essa essas enzimas, o que vai resultar no aumento da concentração plasmática da estatina e assim, podendo ocasionar o aparecimento de efeitos adversos (SCHACHTER, 2005; EGOM; HAFEEZ, 2016).

Diante do exposto, de uma maneira geral, as estatinas são seguras e bem toleradas. Entre os efeitos adversos já relatados devido ao uso das estatinas estão miopatia,

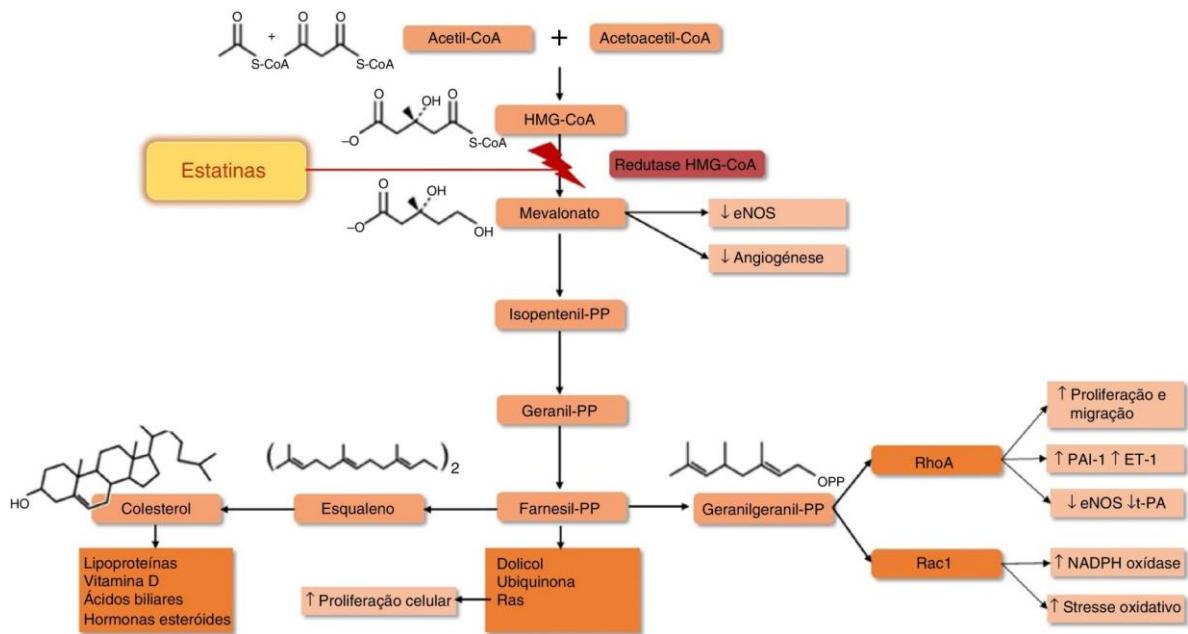
hepatotoxicidade, sintomas gastrointestinais, entre outros. A incidência e a gravidade desses efeitos adversos são geralmente dose-dependentes, e costumam cessar com a retirada do fármaco (SCHACHTER, 2005; ROWAN et al., 2012).

2.3.3 Efeitos pleiotrópicos e neuroproteção

As estatinas são bem conhecidas por seus efeitos nos níveis lipídicos. Contudo, um grande número de estudos clínicos e experimentais realizados nos últimos anos confirma que estes compostos exercem vários efeitos potencialmente benéficos em diferentes condições patológicas, por mecanismos não necessariamente relacionados com o metabolismo do colesterol, e sim, secundários à inibição da síntese de intermediários isoprenóides da via do mevalonato, tais como o farnesilpirofosfato (FPP) e geranilgeranylpirofosfato (GGPP) ilustrados na figura 2 (ZEICHNER et al., 2012). São os chamados efeitos pleiotrópicos, tais como ação antioxidante, anti-inflamatória, imunomoduladoras, proteção anti-trombótica e vascular (estabilização da placa de ateroma, melhora da função endotelial) (ZEICHNER et al., 2012).

Os efeitos pleiotrópicos dos inibidores da HMG-CoA redutase são benéficos inclusive em diferentes desordens do sistema nervoso central (SNC) (REISS; WIRKOWSKI, 2009; VAN DER MOST et al., 2009). Nesse sentido, estudos clínicos mostram uma redução significativa na taxa de ocorrência do acidente vascular cerebral (AVC) entre os pacientes que utilizam estatinas (HEART PROTECTION STUDY, 2002). Em conjunto, é relatado que o uso desses fármacos durante a hospitalização pode melhorar o resultado clínico após o primeiro AVC, e recomenda-se o seu uso na prevenção secundária para reduzir o risco de um novo evento isquêmico (MAKIHARA et al., 2013).

Figura 3 - Via do mevalonato e dos efeitos pleiotrópicos das estatinas



Fonte: Costa et al. (2015).

Legenda: As estatinas inibem a conversão do HMG-CoA à mevalonato por inibir competitivamente a HMG-CoA redutase. A biossíntese do colesterol e a síntese dos intermediários isoprenóides são inibidas. A atividade das pequenas GTPases é dependente da isoprenilação pelo intermediários isoprenóides, os quais são inibidos pelas estatinas. Os subsequentes efeitos pleiotrópicos das estatinas estão listados na caixa. PP- pirofosfato: HMG-CoA- a 3-hidróxi-3-metilglutaril-Coenzima A (COSTA et al., 2015).

Os dados experimentais sugerem que as estatinas possuem mecanismos de ação que podem modificar a lesão cerebral antes, durante e após a isquemia cerebral, tais como, efeito anti-inflamatório, antioxidante e sobre a produção de óxido nítrico (NO) (VAUGHAN; DELANTY, 1999). Nesse sentido, no estudo realizado em um modelo experimental de isquemia cerebral, o tratamento com estatinas reduziu a área infartada e melhorou o quadro neurológico dos animais, e essa melhora foi relacionada ao aumento na atividade da eNOS (LAUFS et al., 2000). Além disso, foi demonstrado que a lovastatina reduz o aumento da expressão da iNOS mediada por citocinas, e a produção de NO em astrócitos e macrófagos de ratos (PAHAN et al., 1997). Como a atividade em excesso da iNOS é considerada deletéria ao SNC, sua inibição pelas estatinas parece reduzir os processos inflamatórios que acompanham a isquemia aguda (PAHAN et al., 1997). Em conjunto, essas observações apontam para um papel duplo das estatinas na isquemia, estimulando a eNOS e inibindo a iNOS, atuando de modo sinérgico no sentido da neuroproteção.

Conforme ilustrado na figura 3, ao impedir a conversão do HMG-CoA a mevalonato, as estatinas também inibem a formação dos compostos intermediários da via, tais como os isoprenóides GGPP e o FPP. Os intermediários isoprenóides possuem um papel essencial na modificação pós-translacional de várias proteínas, entre elas a proteína G heteromérica e as pequenas proteínas de ligação ao GTP, que pertencem a família das GTPases Ras, Rho, Rap e Rab. A isoprenilação é um evento crítico no trânsito intracelular e na função das pequenas proteínas de ligação ao GTP. A modificação com FPP é necessária para a localização correta das proteínas da família Ras, enquanto que o GGPP é requerido para as proteínas da família Rho, Rab e Rap. Contudo, ambas, farnesilação e geranilgeranilação, são necessárias tanto para a localização intracelular como para a função adequadas de algumas Rho GTPases. Por inibir a isoprenilação de Ras e de Rho, as estatinas causam o acúmulo das formas inativas dessas proteínas no citoplasma, inibindo assim essas moléculas de sinalização. As pequenas proteínas de ligação ao GTP, como a Rho e a Rac, influenciam a expressão da eNOS e, consequentemente, a disponibilidade do NO. A Rho regula negativamente a expressão da eNOS, e a Rac contribui para a ativação da NADPH oxidase e, consequentemente, para a produção de superóxido, o qual inativa o NO. Assim, ao bloquear a atividade da Rho e da Rac GTPase através da inibição da geranilgeranilação, as estatinas induzem a regulação positiva (*upregulation*) da eNOS (ZEICHNER et al., 2012).

Essa regulação positiva da eNOS pelas estatinas tem sido indicada como o mecanismo responsável pelos efeitos neuroprotetores desses fármacos (REISS; WIRKOWSKI, 2009; MALFITANO et al., 2014).

Junto ao efeito benéfico no AVC, diversos estudos mostram que o uso prolongado de estatinas reduz o risco de internação nos pacientes com demência, e que a redução do colesterol por esses fármacos pode ter potencial benefício terapêutico na doença de Alzheimer (CORRAO et al., 2013). Nesse sentido, foi observado que a simvastatina é capaz de reduzir os níveis plasmáticos de apoE, e a lovastatina parece diminuir a produção de componentes das placas senis da doença. Além disso, estudos observacionais demonstram uma redução de 60-73% na prevalência do mal de Alzheimer em pacientes tratados com estatinas, em comparação aos pacientes que utilizam outros medicamentos para o tratamento de doenças cardiovasculares (WOLOZIN et al., 2000). Do mesmo modo, foi visto que os pacientes em tratamento com estatinas apresentam uma redução de 71% na probabilidade de receber o diagnóstico de Alzheimer (CORRAO et al., 2013; MALFITANO et al., 2014).

Assim como no AVC e na doença de Alzheimer, evidências sugerem que as estatinas também possuem potencial efeito terapêutico na prevenção e no tratamento da Doença de Parkinson. Além de reduzir a prevalência de discinesia e demência nos pacientes com a doença (TISON et al., 2013), a continuação da terapia com estatina mostrou estar associada à diminuição na incidência do Parkinson quando comparado aos usuários de estatinas que descontinuaram o tratamento (LEE et al., 2013). Esse efeito benéfico dos inibidores da HMG-CoA redutase na doença de Parkinson parece estar associado às suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, dado que estudos recentes demonstram que a simvastatina é capaz de reverter a depleção de dopamina estriatal por diminuir a liberação de mediadores inflamatórios da microglia, de inibir a produção de radicais livres nitrosilados, e de promover a neuroproteção (SELLEY, 2005).

Além do efeito benéfico no AVC e nas doenças de Alzheimer e de Parkinson, estudos em modelos animais mostram que as estatinas têm propriedades imunomoduladoras que podem ser benéficas no tratamento de distúrbios inflamatórios e neuroimunológicos, tais como a Esclerose Múltipla (NEUHAUS et al., 2004). O efeito imunomodulador dos inibidores da HMG-CoA redutase provém, sobretudo, da sua capacidade de inibir a expressão do gene e a transcrição do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe II. Além disso, as estatinas inibem a atividade das células *natural killers* (NK) humanas, reduzem a adesão de leucócitos ao endotélio e inibem a liberação de citocinas pró-inflamatórias por astrócitos, microglia e macrófagos *in vitro* (ZHANG et al., 2013; MALFITANO et al., 2014). Em conjunto, na encefalomielite autoimune experimental (EAE), um modelo de esclerose múltipla humana, a administração de lovastatina foi capaz de inibir a expressão da iNOS, do TNF- α , e do IFN- γ , de prevenir a infiltração de células mononucleares no cérebro, e de melhorar os sinais clínicos da doença (STANISLAUS et al., 1999). Além da imunomodulação e do efeito anti-inflamatório, vários grupos relatam que as estatinas retardam ou revertem o aparecimento da EAE em roedores por inibir a produção e a atividade das metaloproteinases de matriz (MMPs), inclusive da MM9 que também está envolvida nas doenças de Alzheimer e Parkinson (REISS; WIRKOWSKI, 2009; VAN DER MOST et al., 2009).

Dado que os agentes imunomoduladores disponíveis atualmente (interferon- β , acetato de glatiramer e a mitoxantrona) apresentam eficácia parcial e efeitos adversos consideráveis, esses achados sugerem que as propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras das estatinas podem ser utilizados para o tratamento de desordens inflamatórias e neuroimunológicas, tal como a esclerose múltipla (MALFITANO et al., 2014).

Em adição à neuroproteção conferida às desordens neurológicas citadas acima, os inibidores da HMG-CoA redutase também parecem constituir uma potencial opção terapêutica para o traumatismo craniano. Estudos experimentais em modelos de TBI, mostram que as estatinas aumentam a neurogênese e inibem a morte neuronal, além de atenuarem a ativação microglial e astrogial e o edema cerebral. Ademais, simvastatina, lovastatina e atorvastatina mostram-se eficazes para restaurar os déficits cognitivos causados pelo TBI (PENG et al., 2014).

Em conjunto, há um interesse crescente na relação da terapia com estatinas e as numerosas desordens do desenvolvimento neurológico, como a síndrome de Rett, síndrome do X frágil (FXS), neurofibromatose e a esclerose tuberosa, pois as pesquisas vem indicando que os efeitos dos inibidores da HMG-CoA redutase sobre estas doenças são promissores (LING; TEJADA-SIMON, 2016). Na neurofibromatose tipo 1 (NF1), o tratamento com estatinas mostrou ser capaz de reverter os déficits cognitivos tanto em um modelo experimental (LI et al., 2005), como em crianças que diagnosticadas com essa doença (ACOSTA et al., 2011). Em conjunto, no estudo experimental utilizando um modelo da síndrome de Rett, a fluvastatina diminuiu os sintomas motores relacionados à doença, enquanto que no modelo de FXS, além de melhorar os déficits cognitivos, o tratamento com a lovastatina normalizou o excesso de síntese protéica no hipocampo e reduziu a susceptibilidade para crises audiogênicas nos animais (OSTERWEIL et al., 2013). Esses resultados conduziram à um estudo clínico, para avaliar o efeito do tratamento com lovastatina em pacientes com FXS, onde foi concluído que esse fármaco provoca uma melhora significante no comportamento desses pacientes (ÇAKU et al., 2014). Como o estresse oxidativo e o aumento da peroxidação lipídica são características das desordens do desenvolvimento neurológico, as propriedades antioxidantes dos inibidores da HMG-CoA redutase podem estar relacionadas ao seu efeito benéfico nessas desordens (LING; TEJADA-SIMON, 2016).

Desse modo, considerando os relatos clínicos e experimentais citados acima, torna-se evidente que a maioria dos pacientes com distúrbios do sistema nervoso central provavelmente se beneficiam em certa medida da terapia com os inibidores da HMG-CoA redutase. O que permite inferir, que as estatinas têm o potencial para atuar como uma nova opção terapêutica em diversas doenças neurológicas.

2.3.4 Estatinas e epilepsia

De acordo com Loscher e Brandt (2010), qualquer tratamento farmacológico profilático após um insulto cerebral tem como objetivo principal prevenir a ocorrência de crises recorrentes espontâneas, ou seja, um efeito realmente antiepileptogênico. No entanto, um objetivo alternativo seria a modificação da doença, um termo empregado para transmitir o conceito de que, embora um tratamento não possa impedir a ocorrência de uma doença, pode, no entanto, modificar o curso natural da mesma. Nesse sentido, a modificação da doença após um insulto cerebral epileptogênico pode afetar o desenvolvimento das crises espontâneas, na medida em que as crises, se não evitadas, tornam-se menos freqüentes, menos severas e menos resistentes ao tratamento com anticonvulsivantes, melhorando assim a qualidade de vida dos pacientes. Além disso, o efeito modificador da doença também inclui qualquer efeito benéfico sobre o dano neuronal desenvolvido após o insulto cerebral e sobre os distúrbios cognitivos e comportamentais associados com tal insulto (LÖSCHER; BRANDT, 2010).

Segundo a literatura, o período latente após um insulto cerebral, como o *status epilepticus* e o TBI, pode oferecer uma janela de oportunidades em que um tratamento apropriado poderia parar ou modificar o processo epileptogênico induzido por esse insulto (LÖSCHER; BRANDT, 2010; LÖSCHER, 2012). Com base nesse conceito, estudos clínicos foram realizados para avaliar se a administração profilática de um fármaco anticonvulsivante previne o desenvolvimento da epilepsia após um TBI. Em tais ensaios, a administração de anticonvulsivantes convencionais, como fenitoína, fenobarbital, carbamazepina e valproato após o TBI, não foi capaz de prevenir a epileptogênese (TEMKIN, 2001). No entanto, de acordo com Weaver (2003), os anticonvulsivantes foram desenvolvidos para a supressão sintomática das crises epilépticas e não para a prevenção da epilepsia. Assim, seria provável que os fármacos antiepileptogênicos, se existirem, possuem mecanismos de ação distintos dos anticonvulsivantes tradicionais, e isso ocorreria porque os mecanismos moleculares envolvidos na epileptogênese provavelmente diferem daqueles envolvidos na ictogênese (WEAVER, 2003).

Corroborando com a ideia de Weaver (2003), a literatura relata ao menos 30 estudos experimentais que examinaram se os anticonvulsivantes utilizados na clínica exercem efeitos antiepileptogênicos ou efeitos modificadores da doença quando administrados após o insulto cerebral inicial induzido por diferentes modelos de SE (LÖSCHER; BRANDT, 2010; LÖSCHER, 2012). Como estas drogas diferem amplamente no seu mecanismo de ação

(ROGAWSKI; LOSCHER, 2004), havia, portanto, uma grande chance de identificar mecanismos chave para prevenir ou modificar a epilepsia após o insulto cerebral. No entanto, dos treze anticonvulsivantes testados, apenas três fármacos (carisbamato, topiramato e valproato), apresentaram verdadeiro efeito antiepileptogênico, ao reduzir a incidência da epilepsia nos animais submetidos ao SE (LÖSCHER; BRANDT, 2010).

Desse modo, considerando a probabilidade das drogas antiepileptogênicas, possuírem mecanismos de ação distintos dos anticonvulsivantes tradicionais. Uma estratégia racional para a descoberta de fármacos antiepileptogênicos seria o teste de compostos experimentais que interferem com um ou vários dos mecanismos subjacentes à epileptogênese (LÖSCHER; BRANDT, 2010). Nesse sentido, os achados clínicos e experimentais inferem que os processos neuroinflamatórios, induzidos por diferentes tipos de insultos cerebrais (como o SE), possuem um papel crucial para o desenvolvimento da epileptogênese (VEZZANI; GRANATA, 2005; VEZZANI et al., 2013). Acredita-se que o aumento de mediadores pró-inflamatórios esteja envolvido no comprometimento da função barreira hematoencefálica, na neurodegeneração e na hiperexcitabilidade neuronal desenvolvida após o insulto (VEZZANI; GRANATA, 2005; VEZZANI et al., 2013). Dessa forma, moléculas que tenham efeitos anti-inflamatórios seriam uma estratégia interessante para prevenir ou reduzir as consequências do dano epileptogênico (LÖSCHER; BRANDT, 2010; SCICCHITANO et al., 2015).

Como a busca por novos fármacos exige um longo tempo de estudo, grandes recursos financeiros e ainda um elevado risco de perda dos investimentos. O reposicionamento de fármacos (*drug repositioning*), que consiste na triagem de fármacos que foram desenvolvidos para um determinado propósito na clínica médica, serem utilizados para tratar outras patologias; vem ganhando destaque e se tornando prioridade nos programas de *Drug Discovery*, tanto na indústria como no setor acadêmico, por ser uma das abordagens mais rápidas e eficazes para a introdução de novas terapias (EKINS et al., 2011). Desse modo, torna-se plausível que, fármacos utilizados clinicamente para outros tratamentos, e que, também têm a indicação potencial para a inibição da neuroinflamação, merecem ser investigados para uma possível atividade antiepileptogênica. Entre esses fármacos estão as estatinas (SCICCHITANO et al., 2015).

De fato, as estatinas, que são geralmente prescritas para a redução do colesterol, também possuem propriedades anti-inflamatórias. Elas reduzem a expressão de citocinas, como IL-1 β e IFN- γ , diminuem a liberação de quimiocinas, e consequentemente a infiltração

de monócitos e linfócitos no cérebro; e também protegem o endotélio e a barreira hematoencefálica (REISS; WIRKOWSKI, 2009; LING; TEJADA-SIMON, 2016). E esse potencial anti-inflamatório parece ser eficaz na prevenção da neuroinflamação e da morte neuronal em uma variedade de doenças neurológicas, conforme relatado por estudos em modelos animais de isquemia cerebral, lesão cerebral traumática, esclerose múltipla e epilepsia (REISS; WIRKOWSKI, 2009; MALFITANO et al., 2014; SCICCHITANO et al., 2015). Contudo, por comparação, um número menor de estudos tem investigado se a atividade convulsiva e a epileptogênese são moduladas pelas estatinas (SCICCHITANO et al., 2015).

Nesse sentido, os dados relatados na literatura até o momento inferem que os inibidores da HMG-CoA redutase apresentam ação anticonvulsivante em modelos experimentais de epilepsia e convulsão, sendo a atorvastatina (ATV) a estatina mais estudada nos ensaios pré-clínicos (BANACH et al., 2014; SCICCHITANO et al., 2015).

Lee e grupo (2008) mostraram que o pré-tratamento com ATV durante 7 dias (10 mg/kg/dia, via oral), em ratos machos Sprague-Dawley, reduziu significativamente a severidade do SE induzido por cainato (via intraperitoneal), bem como a morte neuronal nas regiões CA1 e CA3 hipocampais, a infiltração de macrófagos e a expressão de genes pró-inflamatórios, sugerindo efeito neuroprotetor e confirmando o efeito anti-inflamatório do fármaco (LEE et al., 2008). O tratamento com ATV (10 mg/kg/dia, durante 7 dias, via oral), em camundongos machos Swiss, também mostrou ser capaz de reduzir a incidência das crises tônico-clônicas induzidas por ácido quinolínico (via cerebroventricular), e a morte neuronal no hipocampo dos animais. Além disso, a estatina também inibiu a redução da captação de glutamato nas fatias hipocampais dos animais injetados com o convulsivante (PIERMARTIRI et al., 2009).

Uzüm e grupo (2010) mostraram que o pré-tratamento com ATV durante 4 semanas (5 mg/kg/dia, via intraperitoneal), em ratos machos Wistar, previu o desenvolvimento do *kindling* por PTZ (pentilenotetrazol; via intraperitoneal) e melhorou os déficits na memória nos animais submetidos ao mesmo (UZÜM et al., 2010). Do mesmo modo, foi visto que o tratamento com ATV durante 7 dias (10 mg/kg/dia, via oral), em ratos machos Wistar, aumentou a latência para as crises tônico-clônicas induzidas pelo PTZ (via intraperitoneal), enquanto a retirada do tratamento, diminuiu significativamente essa latência. Como as concentrações de colesterol no plasma e no tecido cerebral dos animais tratados com a estatina não diferiram dos animais controles, foi sugerido que esse efeito anticonvulsivante

não está relacionado à inibição da síntese do colesterol (FUNCK et al., 2011). Em adição, no modelo de convulsão utilizando injeção intravenosa de PTZ, o tratamento com ATV durante 7 dias (nas doses de 0,1, 0,5 e 1 mg/kg/dia, via oral), aumentou significativamente o limiar convulsivo em camundongos machos NMRI. E esse efeito foi inibido quando inibidores da NOS (L-NAME e aminoguanidina) foram co-administrados com a estatina (MOEZI et al., 2012), sugerindo que os efeitos das estatinas no cérebro não são mediados pela inibição da HMG-CoA reductase.

A administração crônica de ATV (10 mg/kg/dia, via oral), 7 dias antes e 7 dias após a indução do SE induzido por estimulação elétrica, não afetou nem a duração do SE, nem impediu o desenvolvimento da epilepsia em ratos machos Sprague-Dawley. Além disso, o tratamento com a estatina não previneu o dano na barreira hematoencefálica, a neuroinflamação e a morte celular no hilo do giro denteadoo hipocampal (VAN VLIET et al., 2011). Em contraste, nas crises audiogênicas em camundongos DBA/2 (um modelo genético de epilepsia), uma única injeção (intraperitoneal) de ATV nas doses de 80-100 mg/kg, apresentou ação anticonvulsivante contra crises tônicas, mas não contra crises clônicas nos camundongos DBA/2 de ambos os sexos. Ambas as fases das crises foram inibidas pela co-administração de ATV na dose de 25 mg/kg (dose não eficaz contra as crises audiogênicas) com os anticonvulsivantes valproato, carbamazepina, diazepam, topiramato e lamotrigina (administrados por via intraperitoneal) (RUSSO et al., 2013).

De modo geral, verifica-se que a atorvastatina é particularmente eficaz após tratamento crônico, apresentando efeito anticonvulsivante nas crises induzidas por cainato e PTZ, e nas crises audiogênicas em camundongos DBA/2. Já outras estatinas (simvastatina, fluvastatina, pravastatina, lovastatina) parecem ser mais eficazes após tratamento agudo; Em síntese, a lovastatina exerce ação anticonvulsivante em crises induzidas por cainato, PTZ, eletrochoque e nas crises audiogênicas, mas não em crises de ausência atípicas. Já a simvastatina tem propriedades protetoras no modelo do cainato e contra as crises audiogênicas em camundongos DBA/2, enquanto é ineficaz em crises induzidas por PTZ; Por outro lado, a fluvastatina tem efeito anticonvulsivante apenas nas crises audiogênicas e a pravastatina não mostra eficácia em crises induzidas por cainato ou em crises audiogênicas (BANACH et al., 2014; SCICCHITANO et al., 2015).

Apesar das evidências pré-clínicas de que a atorvastatina (e também as outras estatinas) possui atividade anticonvulsivante, até o momento não há relatos na literatura sobre o efeito desse fármaco durante o período epileptogênico no modelo de TLE pós-SE induzido

pela pilocarpina (o modelo de maior semelhança com a TLE humana). Além disso, apenas o estudo de Russo e grupo (2013), testou o efeito do tratamento com atorvastatina sobre o desenvolvimento das crises epilépticas em animais de ambos os sexos, enquanto os demais estudos utilizaram apenas roedores machos (RUSSO et al., 2013).

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do tratamento com atorvastatina sobre o desenvolvimento das alterações cognitivas e comportamentais e na susceptibilidade às crises epilépticas, durante o processo epileptogênico em camundongos C57BL/6 machos e fêmeas submetidos ao SE induzido pela pilocarpina.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1- Verificar a latência para o primeiro episódio mioclônico, primeira crise tônico-clônica e sua duração, induzidas por uma dose subconvulsivante de PTZ (30 mg/kg, i.p.), em camundongos C57BL/6 machos e fêmeas, 7 dias antes, bem como, 7 e 14 dias depois da indução do status epilepticus pela pilocarpina;

2- Verificar o efeito do tratamento com atorvastatina (10 e 100 mg/kg, v.o.) sobre a morte neuronal no hilo do giro denteadoo hipocampo utilizando coloração de Giemsa, em camundongos C57BL/6 machos e fêmeas, 14 dias após a indução do status epilepticus pela pilocarpina;

3- Verificar o efeito do tratamento com atorvastatina (10 e 100 mg/kg, v.o.) sobre o comportamento tipo-ansiedade e a atividade locomotora espontânea no teste do campo aberto, em camundongos C57BL/6 machos e fêmeas, entre o 7º e 14º dia após a indução do status epilepticus pela pilocarpina;

4- Verificar o efeito do tratamento com atorvastatina (10 e 100 mg/kg, v.o.) sobre a memória de curto e longo prazo no teste do reconhecimento de objeto, em camundongos C57BL/6 machos e fêmeas, entre o 7º e 14º dia após a indução do status epilepticus pela pilocarpina;

5- Verificar o efeito do tratamento com atorvastatina (10 e 100 mg/kg, v.o.) sobre a coordenação motora fina e aprendizado no teste do rotarod, em camundongos C57BL/6 machos e fêmeas, entre o 7º e 14º dia após a indução do status epilepticus pela pilocarpina;

- 6- Verificar o efeito do tratamento com atorvastatina (10 e 100 mg/kg, v.o.) sobre o comportamento tipo-depressão no teste de preferência por sacarose e no teste do nado forçado, em camundongos C57BL/6 machos e fêmeas, entre o 7º e 14º dia após a indução do status epilepticus pela pilocarpina;
- 7- Avaliar os níveis de citocinas IL-1 β , TNF- α , IL-6, INF- γ e IL-10 em córtex e hipocampo de camundongos C57BL/6 machos e fêmeas, tratados com atorvastatina (10 e 100 mg/kg, v.o.), 14 dias após a indução do status epilepticus pela pilocarpina.

4 METODOLOGIA

4.1 ANIMAIS

Camundongos C57BL/6 fêmeas e machos (pesando entre 25-35g; 30-60 dias de idade) foram utilizados no presente trabalho. Os animais eram provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) sem qualquer tratamento ou estresse prévio, e foram mantidos no biotério setorial do prédio 21 da UFSM em ciclo claro-escuro de 12 horas (ciclo claro entre 7:00 e 19:00 h), temperatura de $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com alimento e água *ad libitum*. Este projeto encontra-se aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta Instituição nos protocolos 098/2012 e 6165230415.

4.2 REAGENTES

Metilescopolamina, pilocarpina e pentilenotetrazol (PTZ) foram obtidos da Sigma (St. Louis, MO, EUA). O benzodiazepínico diazepam foi obtido do Laboratório Farmacêutico *Santisa* (Bauru,SP). E a atorvastatina era proveniente dos comprimidos de Lipitor® 80mg, da Pfizer. Todos os reagentes citados acima foram diluídos, de acordo com as doses utilizadas, em solução salina (NaCl 0,9%).

4.3 DESENHO EXPERIMENTAL

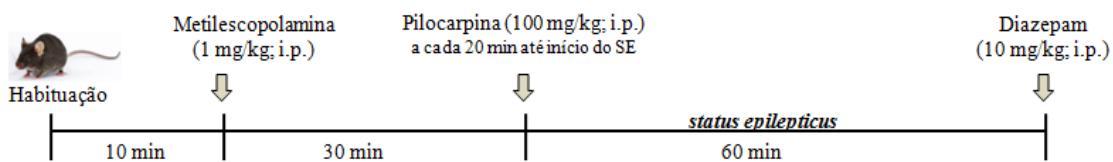
4.3.1 Indução do status epilepticus

Inicialmente os animais foram injetados com metilescopolamina (1 mg/kg; i.p.), com o objetivo de reduzir os efeitos colaterais periféricos. Após 30 minutos, foi administrada uma dose de 100 mg/kg de pilocarpina (i.p.), a qual foi repetida a cada 20 minutos até o início do SE, o qual foi caracterizado pelo aparecimento de crises contínuas classificadas no estágio 3-5 da escala de Racine (Racine, 1972). O SE foi encerrado após 60 minutos com diazepam (10 mg/kg; i.p.) Os animais que não desenvolveram o SE com até seis injeções de pilocarpina, foram retirados do experimento.

Os animais controles receberam a injeção de metilescopolamina e de diazepam, e no lugar da pilocarpina foram injetados com salina (NaCl 0,9%). Nos três dias seguintes à

indução do SE, os animais foram injetados com solução de Ringer com lactato, e tiveram acesso livre a frutas frescas como bananas e maçãs.

Figura 1 - Esquema de indução do SE pela pilocarpina



Fonte: Elaboração própria.

4.3.2 Tratamento com atorvastatina

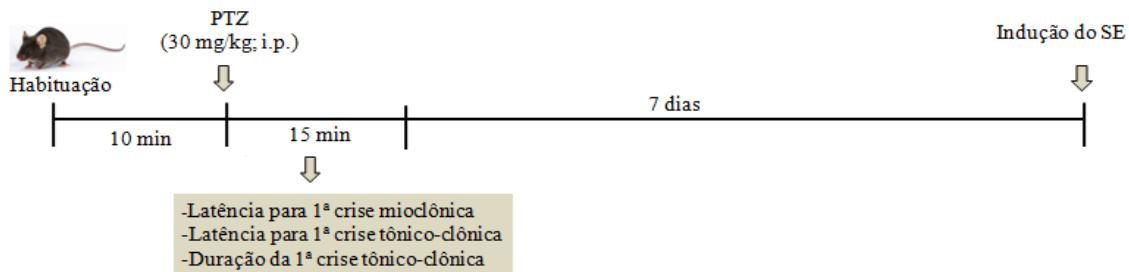
Os animais controles e os pós-SE receberam doses diárias de veículo (NaCl 0,9%) ou atorvastatina (10 ou 100 mg/kg) por gavagem intragástrica durante 14 dias consecutivos, sendo que a primeira dose de atorvastatina foi administrada 3 horas após a injeção de diazepam. No 7º e no 14º dia pós-SE, o tratamento com atorvastatina foi realizado após o fim do teste com o PTZ, para que não houvesse qualquer interferência direta do tratamento com atorvastatina sobre o teste. O mesmo foi feito nos dias em que os animais foram submetidos aos testes de comportamento, isto é, a administração de atorvastatina foi realizada apenas após o final de cada teste.

4.3.3 Susceptibilidade as crises induzidas por PTZ

Experimento 1: Sete dias antes da indução do SE, os animais foram colocados em caixas de acrílico e habituados por 10 minutos. Em seguida, receberam uma injeção de PTZ⁷ (30 mg/Kg, i.p).

⁷ Devido sua ação estimulante no SNC, o PTZ tem sido utilizado como um agente indutor de crises epilépticas (LOSCHER, 2009). O PTZ atua como antagonista do receptor GABA_A (ácido γ-aminobutírico), o qual está acoplado a um canal permeável a cloreto, e cuja ativação provoca hiperpolarização localizada na membrana neuronal, tornando o neurônio refratário a estímulos despolarizantes (CREMER *et al.*, 2009).

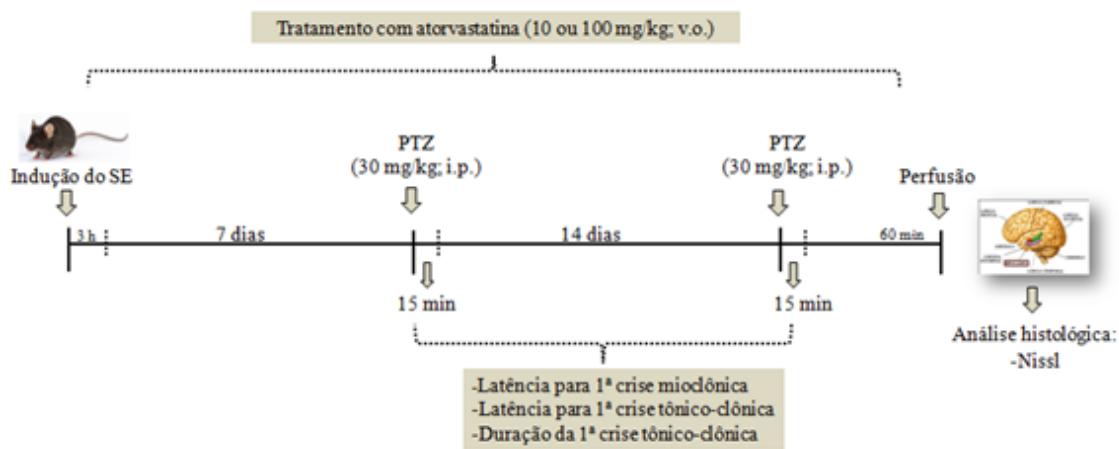
Figura 2 - Esquema do experimento 1



Fonte: Elaboração própria.

Experimentos 2 e 3: Nos dias 7 e 14 após a indução do SE, os animais foram colocados em caixas de acrílico e habituados por 10 minutos. Em seguida, receberam uma injeção de PTZ (30 mg/Kg, i.p.).

Figura 3 - Esquema dos experimentos 2 e 3, e análise histológica



Fonte: Elaboração própria.

Após a injeção do PTZ, o comportamento dos animais foi observado durante 15 minutos quanto aos seguintes parâmetros: latência para o primeiro episódio mioclônico, e latência para a primeira crise generalizada tônico-clônica e duração da mesma.

4.3.4 Análise histológica

No 14º dia pós-SE (dia do experimento 3), 60 minutos após a última dose de atorvastatina, os animais foram anestesiados com tiopental (125 mg/kg; i.p.) e perfundidos transcardialmente com 100 mL de solução heparinizada de NaCl 0,9% (0,2 ml de heparina / 500 ml de salina), seguido por 200 mL de paraformaldeído 4% (PFA 4%) em tampão fosfato 0,1M (pH 7,4). Após a perfusão, os cérebros foram removidos e imersos por pelo menos 2 dias em solução de PFA 4%. Na sequência, cortes histológicos coronais com 50 µm de espessura foram obtidos empregando-se o vibratomo, e os slices foram destinados a coloração de Nissl.

4.3.4.1 Coloração de Nissl

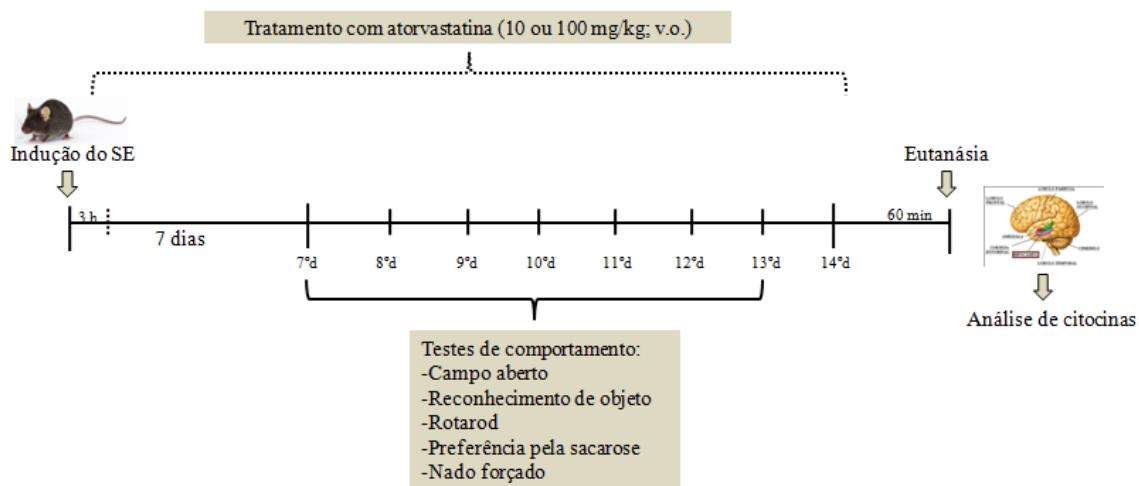
A coloração de Nissl foi utilizada para a avaliação do grau de perda neuronal no hilo do giro dentado hipocampal. E foi realizada em duplicata para cada animal (dois slices por animal). Os cortes foram colocados sobre lâminas gelatinizadas, e então imersos em uma solução de Giemsa por 30 segundos. Após a etapa de coloração, os cortes foram lavadas 3 vezes, durante 2 minutos cada, em água destilada. Na sequência, foram desidratados em soluções de etanol (70%, 90% e 100%), clareados em xiloglutaraldeído e montadas com Cytoseal 60 (Thermo Scientific) (OLIVEIRA et al., 2015). O número de células dentro do hilo foi avaliado utilizando-se microscópio Leica DFC290 (Leica, Alemanha), sob objetiva de 10X, nos dois slices e a média das contagens das duplicatas foi utilizada como o resultado para cada animal.

4.3.5 Testes de comportamento

Entre o 7º e o 13º dia pós-SE, os animais tratados com veículo ou atorvastatina (10 ou 100 mg/kg; v.o.), foram submetidos a uma bateria de testes comportamentais constituída dos seguintes testes: campo aberto, reconhecimento de objeto, rotarod, preferência pela sacarose e nado forçado.

Os testes foram realizados na sequência descrita anteriormente, do menos para o mais estressante. E um teste só foi iniciado após o término do teste anterior, ou seja, foi realizado um teste por vez.

Figura 4 - Esquema bateria de testes de comportamento e análise de citocinas



Fonte: Elaboração própria.

4.3.5.1 Teste do campo aberto

O campo aberto possui 56 cm de diâmetro e é separado em 10 áreas, 5 centrais e 5 periféricas. Cada animal foi posto individualmente no centro do aparato e observado por 10 minutos para o registro da atividade locomotora (número de cruzamentos com as quatro patas) e atividade exploratória (expresso pelo número de rearings, isto é, ficar sobre as patas traseiras). Também foram registrados o tempo gasto na periferia e no centro da arena, bem como, o tempo gasto para cada animal iniciar a exploração no aparato (OLIVEIRA et al., 2016).

4.3.5.2 Teste de reconhecimento de objeto

O teste de reconhecimento do objeto foi constituído de três sessões com duração de 10 minutos cada. Na primeira sessão, denominada treino, duas garrafas idênticas (plásticas cilíndricas transparentes), foram colocadas de maneira equidistante no centro da arena do campo aberto e o tempo que o animal explorou os objetos foi registrado. Quatro horas mais tarde (memória de curto prazo), uma das garrafas foi substituída por uma maçã de plástico, e o tempo de exploração de cada um dos objetos pelo camundongo foi registrado. Vinte e quatro horas após o treino (memória de longo prazo) a maçã foi substituída por um copo de

plástico triangular, o animal foi novamente colocado na arena e o tempo acumulado pelo camundongo explorando cada um dos objetos foi registrado (OLIVEIRA et al., 2016).

4.3.5.3 Teste do rotarod

O rotarod utilizado apresenta 3,7 cm de diâmetro e velocidade constante de 8 rpm. O teste foi constituído de duas sessões de treino e uma de teste. As sessões de treino equivaleram-se de 10 triagens, cada triagem tinha duração máxima de 1 minuto, e quando o animal apresentava queda do rotarod antes disso, a triagem era considerada concluída. Um tempo de descanso de 60 segundos entre cada triagem foi dado aos animais. Na sessão teste, foram realizadas duas triagens de 5 minutos cada uma, com intervalo de 180 segundos entre cada triagem. A latência para a primeira queda do rotarod em cada sessão teste, e o número total de quedas foi registrado (OLIVEIRA et al., 2015).

4.3.5.4 Teste da preferência pela sacarose

Os camundongos foram postos individualmente em caixas, com o livre acesso a duas garrafas (100 mL cada), uma contendo água e outra contendo solução de sacarose 4%. Após quarenta e oito horas, o consumo de água e de sacarose foram medidos pela diferença entre os volumes iniciais e finais das soluções, e então foi calculado o índice de preferência pela sacarose (OLIVEIRA et al., 2015).

4.3.5.5 Teste do nado forçado

O teste do nado forçado foi realizado em um cilindro com água a $\pm 24^{\circ}\text{C}$, com uma profundidade de 20 cm e 10 cm de diâmetro. O teste consistiu em colocar o camundongo nesse cilindro e registrar o seu tempo de imobilidade durante o tempo total do teste (5 minutos). A imobilidade foi registrada quando o animal permaneceu flutuando ou realizando apenas os movimentos necessários para manter sua cabeça acima da água (OLIVEIRA et al., 2015).

4.3.5 Análise de citocinas

Vinte e quatro horas após o término da bateria de testes comportamentais descrita acima (14º dia pós-SE), os animais foram eutanasiados 60 minutos após a última administração de atorvastatina. O córtex cerebral e o hipocampo dos animais foram homogeneizados em tampão apropriado (10 mM PBS contendo 1 mM de ácidoetilenodiaminotetracético (EDTA), 0,1 mM de fluoretode fenilmetilsulfônico (PMSF) e albumina de soro bovino (BSA 0,5%, pH 7,4). As amostras foram centrifugadas a 11 rpm durante 10 min a 4°C, e o sobrenadante foi utilizado para medições níveis de IL-1 β , IL-6, TNF- α , INF- γ e IL-10. A quantificação das citocinas foi realizada utilizando kits de imunoensaio (ELISA) para roedores, disponível comercialmente (R&D Systems®, Minneapolis, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados estão expressos como picogramas de citocina por miligrama de proteína.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados das latências, dos testes de comportamento, da contagem de células no hilo e das citocinas, foram analisados utilizando ANOVA de duas vias seguido pelo pós teste de Bonferroni para comparações múltiplas, e são expressos como média + SEM. As diferenças entre machos e fêmeas, independente do SE, foram analisados utilizando o teste exato de Fischer. Probabilidade de $p < 0,05$ foi considerada significativa.

5 ARTIGO 1

O artigo a seguir, intitulado *Evaluation of potential gender-related differences in behavioral and cognitive alterations following pilocarpine-induced status epilepticus in C57BL/6 mice*; foi o primeiro artigo desenvolvido durante o meu doutorado, com o objetivo de fazer uma caracterização comportamental de camundongos C57BL/6 machos e fêmeas 60 dias após terem sido submetidos ao SE induzido por pilocarpina.

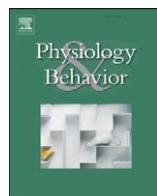
Foi a partir desse artigo, o qual demonstra que machos e fêmeas desenvolvem as principais alterações cognitivas e comportamentais observadas nos pacientes com TLE, porém, com algumas sutis diferenças entre os gêneros, que resolvemos desenvolver os estudos em animais de ambos os sexos.

Este artigo está inserido na íntegra nesta tese, sob o número de licença 4084801142023 obtido junto a editora Elsevier.



Contents lists available at ScienceDirect

Physiology & Behavior

journal homepage: www.elsevier.com/locate/phb

Evaluation of potential gender-related differences in behavioral and cognitive alterations following pilocarpine-induced *status epilepticus* in C57BL/6 mice



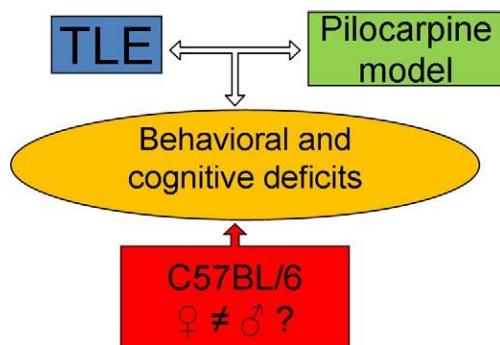
Clarissa Vasconcelos de Oliveira, Jéssica Grigoletto, Vinícius Rafael Funck, Leandro Rodrigo Ribeiro, Luiz Fernando Freire Royes, Michele Rechia Fighera, Ana Flávia Furian, Mauro Schneider Oliveira*

Graduate Program in Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil

HIGHLIGHTS

- Pilocarpine-induced SE elicits long-term behavioral disturbances in C57BL/6 mice.
- Epileptic mice, regardless of gender, display increased anxiety-like behavior.
- Long-term object recognition memory is impaired in epileptic mice of both genders.
- Only male mice show altered performance in the forced swim test.
- Hilar cell loss is of similar magnitude in epileptic mice of both genders.

GRAPHICAL ABSTRACT



article info

Article history:

Received 2 December 2014

Received in revised form 26 February 2015

Accepted 2 March 2015

Available online 4 March 2015

Keywords:

Temporal lobe epilepsy
Status epilepticus
Behavioral abnormalities
Gender

abstract

Together with pharmacoresistant seizures, the quality of life of temporal lobe epilepsy (TLE) patients is negatively impacted by behavioral comorbidities including but not limited to depression, anxiety and cognitive deficits. The pilocarpine model of TLE has been widely used to study characteristics of human TLE, including behavioral comorbidities. Since the outcomes of pilocarpine-induced TLE might vary depending on several experimental factors, we sought to investigate potential gender-related differences regarding selected behavioral alterations in C57BL6 mice. We found that epileptic mice, independent of gender, displayed increased anxiety-like behavior in the open-field test. In the object recognition test, epileptic mice, regardless of gender, showed a decreased recognition index at 24 (but not at 4) hours after training. On the other hand, no significant differences were found regarding mice learning and memory performance in the Barnes maze paradigm. Motor coordination and balance as assessed by the beam walk and rotarod tests were not impaired in epileptic mice of both genders. However, female mice, independent of epilepsy, performed the beam walk and rotarod tasks better than their male counterparts. We also found that only male epileptic mice displayed disturbed behavior in the forced swim test, but the mice of both genders displayed anhedonia-like behavior in the taste preference test. Lastly, we found that the extent of hilar cell loss is similar in both genders. In summary, both genders can be successfully employed to study behavioral comorbidities of TLE; however, taking the potential gender differences into account may help choose the more

* Corresponding author at: Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Av. Roraima, nº 1000, Prédio 21, sala 5207, CEP 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil.

E-mail address: ms.oliveira@uol.com.br (M.S. Oliveira).

appropriate gender for a given task, which may be of value for the minimization of the number of animals used during the experiments.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Epilepsy is a common neurological disease that affects approximately 0.6% of the entire population [1]. Temporal lobe epilepsy (TLE) is the most prominent of the acquired epilepsies, it is considered the most common type of partial complex seizure in adulthood [2]. TLE is commonly preceded by an initial brain injury, such as an episode of prolonged seizures or status epilepticus (SE), complicated childhood febrile seizures, hypoxia or traumatic brain injury, which leads to chronic epilepsy with spontaneous recurrent seizures (SRS) [1]. In addition to SRS, most epilepsy patients display behavioral comorbidities, including but not limited to depression, anxiety and psychosis, and impaired cognitive performance [3].

Most of the characteristics of TLE can be reproduced in chronic animal models, such as the pilocarpine model [4]. Pilocarpine-induced SE elicits the appearance of SRS, and also abnormal behaviors that are similar to behavioral abnormalities in patients with TLE. Therefore, the pilocarpine model has been very useful to the study of the relationship between epilepsy and its behavioral comorbidities [4].

Outcomes of pilocarpine-induced SE might vary depending on species and strain, mainly with respect to seizure sensitivity and seizure-induced effects [5]. In fact, several studies have shown differences in seizure susceptibility and seizure-induced effects between different mouse strains [6], and even between mice of the same strain that have been bred separately [7,8].

C57BL/6 mice are one of the oldest and most widely used inbred strains in biomedical research, and are commonly used as a genetic background to create transgenic and knockout mice [9]. Using a behavioral test battery for studying behavioral and cognitive alterations in the pilocarpine model of TLE in C57BL/6 mice, Müller and colleagues in 2009 found that epileptic mice exhibit behavioral and cognitive alterations reflecting the several disturbances that are associated with epilepsy in humans [8]. Given the importance of pilocarpine model of TLE in C57BL/6 mice and in light of the need for prevent, limit, and reverse the comorbidities associated with epilepsy and its treatment [4], further characterization of the behavioral alterations elicited by pilocarpine-induced SE is important. In this context, to the best of our knowledge, the influence of the gender in the behavioral alterations following pilocarpine-induced SE in C57BL/6 mice has not been studied yet. Therefore, the present study aimed to investigate the occurrence of gender-related differences regarding selected behavioral alterations in C57BL/6 mice after pilocarpine-induced SE, in order to shed some light on the impact of gender in this model of TLE.

2. Materials and methods

2.1. Animals and reagents

Male and female C57BL/6 mice (20–30 g; 30–60 day-old at the time of SE induction) were used. Animals were maintained under controlled light and environment (12:12 h light–dark cycle, 24 ± 1 °C, 55% relative humidity) with free access to water and food (SupraTM, Santa Maria, RS, Brazil). All experimental protocols were designed in the aim to keep the number of animals used to a minimum, as well as their suffering. These were conducted in accordance with national and international legislations (guidelines of Brazilian Council of Animal Experimentation — CONCEA — and of U.S. Public Health Service's Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals — PHS Policy), and with the approval of the Ethics Committee for Animal Research of the Federal University of Santa Maria (process 098/2012).

Methylscopolamine, pilocarpine and diazepam were purchased from Sigma (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri) and were dissolved in 0.9% NaCl to 0.1 mg/mL, 32 mg/mL and 2 mg/mL, respectively.

2.2. Induction of SE by pilocarpine

SE was defined by continuous stage 3 to 5 seizures [10] during at least 30 min without regaining consciousness (unresponsiveness to any environmental stimuli) together with loss of postural control. This definition is consistent with that being commonly used in the rat pilo-carpine model [11].

To induce the SE in mouse, pilocarpine was injected intraperitoneally (i.p.). In order to avoid peripheral cholinergic effects, methylscopolamine (1 mg/kg; i.p.) was administered 30 min before the application of pilocarpine. For induction of seizures, an initial injection of 320 mg/kg of pilocarpine was administrated (i.p.). If during the first hour the animal was not in SE, a second dose of 225 mg/kg of pilocarpine was injected, and if 40 min after the second dose the mice was not in SE another injection of pilocarpine (225 mg/kg) was applied, thus, the maximum number of repeated pilocarpine injections was restricted to three.

All the mice that developed SE received diazepam (10 mg/mL) after 60 min in SE, to stop seizure activity. To facilitate recovery after SE, all the mice were injected with 0.5 mL of Ringer solution (NaCl 130 mmol/L, KCl 4 mmol/L, CaCl₂ 1.5 mmol/L, glucose 20 mmol/L) in the afternoon following SE as well as at least twice daily during the next three days. No systematic observations were done to detect spontaneous seizures in all the mice, but we noted clear convulsive behavior in most mice during handling, weighing or other manipulations. In addition, several studies have shown that all the C57BL/6 mice experiencing SE become epileptic [7–9].

2.3. Behavioral testing

The general procedures for behavioral tests in pilocarpine-epileptic mice were carried out according to Gröticke et al. [12]. Accordingly, behavioral tests started 2 months after SE (i.e. in the chronic phase of pilocarpine-induced epilepsy). In the first set of experiments, the animals were evaluated in the following paradigms: open-field, object recognition, beam walk, taste preference and forced swim tests. The sequence of behavioral tests was organized from the least to the most aversive, with an inter-test interval of at least 1 day [12]. In the second set of experiments a separated group of animals was subjected to the Barnes maze test, and a third independent group of animals was used for the rotarod test and for histological analysis. All behavioral tests were carried out under artificial light and controlled conditions of temperature (22 ± 1 °C). Any animal presenting a clearly visible seizure (stage ≥3 in the Racine's scale) at least 1 h before the test was not tested in that same day. If an animal presented a seizure during the test, it was not included in the data analysis pertinent to that parameter/test. By using this approach, one SE animal of each gender was excluded from all analyses.

The experiments were arranged in a way that eliminated every disturbance or affection by the presence of other mice or the experimenter of the respective mouse that was subjected to a behavioral experiment, except when the mice needed to be handled and observed by an experimenter.

2.4. Open field

The animals were placed in the central area of a round open field (56 cm in diameter), which had its floor divided into 10 equal areas.

Five areas of the apparatus had their borders limited by the walls of the arena and were considered as peripheral areas. The remaining five areas that had no contact with the walls of the apparatus were considered as central areas. The latency to leave the central area and start the open-field exploration was measured as an index of anxiety-like behavior, as well as the time spent in central areas. The number of crossed areas (crossing) as well as the number of rearing responses (animal stands on its hind legs) was recorded for 5 min [13]. Altogether, these parameters served to evaluate spontaneous locomotor activity and anxiety-like behavior.

2.5. Object recognition

Object recognition test was performed according to Bevins and Besheer [14]. The test consisted of three sessions, namely, training (first session), short-term memory evaluation (second session; 4 h after training), and long term memory evaluation (third session; 24 h after training). During the training session, two identical objects (trans-parent cylindrical plastic bottles) were equidistantly placed in the center of the same open-field arena described above, and the time spent in the exploration of each object was recorded during 5 min. Four hours after the training one of the bottles was replaced with a new object (a plastic red apple), and the time spent in the exploration of each object was measured over 5 min. At last, 24 h after training the plastic red apple was replaced for another new object (triangular plastic cup), and the time spent in the exploration of each object was recorded during 5 min. Data collected 4 or 24 h after training were used as measures of short- and long-term memories, respectively. The object recognition index was calculated with the following formula: Recognition index = (time spent in new object) / (time spent in the new object + time spent in the already known object). Smaller values of the recognition index are indicative of novel object memory impairment. The analyses excluded test (4 and 24 h) data from any subject that failed to explore the objects in any of the test sessions.

2.6. Beam walk

Beam Walk test was performed according to Irinchev et al. [15] in order to assess fine motor coordination and motor learning and memory in epileptic mice. The task consisted of two training sessions and one testing session, in which two trials were given for each animal by day. In each trial, the time to cross a thin (1.5 cm × 75 cm) wooden bar elevated 90 cm from the floor was recorded. A longer time to cross the beam is indicative of an impairment in balance and/or motor coordination.

2.7. Rotarod test

Fine motor coordination and learning was assessed by using the rotarod test as described by Wahlsten et al. [16], with some modifications as follows. In order to keep proximity with the beam walk test, we designed a protocol similar with the rotarod test. The task consisted of two training tests and one testing sessions, carried out in 3 different days. At each training session, the mice were trained on the rotarod (3.7 cm in diameter, 8 rpm constant speed) throughout a session of 10 trials; each trial starts with the mouse being placed in the apparatus and ends when the mouse falls off the rod or after reaching the cut-off time of 60 s. A resting time of 60 s was allowed between each trial. In the testing session two trials of 300 s each were performed with a resting time of 180 s between the trials. The latency to the first fall was recorded.

2.8. Taste preference test

The consumption of a sweetened solution is a taste preference experiment designed to examine a behavioral correlate of anhedonia (i.e. inability to experience pleasure) [17]. In this test mice were

placed in individual cages. Each cage gave access to two bottles, one with water (100 mL) and the other with a 4% aqueous sucrose solution (100 mL). Water and sucrose consumptions over 24 h were measured and sucrose preference was evaluated. Lower sucrose preference is indicative of anhedonia and therefore of depressive-like behavior.

2.9. Barnes maze

Barnes maze was performed according to Oliveira et al. [18]. The maze consisted of a 120 cm diameter circular wooden table, 3.5 cm-thick and elevated 90 cm above the floor. Twenty holes, 6 cm diameter, were equidistantly located around the perimeter and centered 5 cm from it. The apparatus was located in a 4 m × 4 m test room. A black wooden escape tunnel (10 cm × 10 cm × 30 cm) was placed beneath one hole, selected randomly for each mice but remained constant throughout the training sessions for a given mice. The remaining 19 holes led only to a false escape box (10 cm × 3.5 cm × 10 cm which, from the platform, appeared indistinguishable from an escape box but was too small to be entered; false boxes removed visual cues that might be observed through an open hole. Above the platform (height 45 cm) there is a white halogen lamp (300 W), which gave a bright illumination of the maze as the aversive stimuli. The mice were trained to find the escape hole; each subject was placed in the escape box for 1 min, then into a cylindrical opaque chamber (start box) in the center of the maze. With light on, the start box was removed and the mouse was allowed to explore freely and finding the escape box where it was allowed to remain for 60 s. A maximum latency of 180 s to find it was allowed. Each mouse was given three consecutive trials per day (180 s inter-trial interval), over four consecutive days. In each trial, we recorded the time to reach the escape tunnel. The test was used to evaluate the spatial learning and memory of mice so that a higher time to find the escape box is indicative of cognitive deficit as well as indicative of increased anxiety-like behavior. The animals that failed to perform the task because of lack of exploratory activity (3 male controls, 1 female control, 1 male SE and 3 female SE) were considered performance-incompetent and were excluded from the analysis [19].

2.10. Forced swim test

The forced swim test was performed according to Sunal et al. [20], in order to evaluate the depressive-like behavior in epileptic mice. The mice were placed in individual, clear polyvinyl chloride (PVC) cylinders (30 cm tall × 10 cm diameter) containing 23–25 °C water (20 cm-deep to prevent the mouse's tail from touching the cylinder bottom). Water was changed between subjects. The immobility time during the 5 min of test was recorded. Immobility was assigned when no additional activity was observed other than that required to keep the mouse's head above water. Increased immobility time is an index of depressive-like behavior.

2.11. Histological procedures

The mice were deeply anesthetized with Tiopental (125 mg/kg; i.p.) and perfused transcardially with 50 mL of NaCl 0.9% containing heparin (5 IU/mL) followed by 200 mL of 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4). The brains were removed, and the serial coronal sections of 40 µm (between -1.5 and -2.1 from bregma) were cut on a vibratome (model KD400, Zhejiang Jinhua Kedi Instrumental Equipment Co., Zhejiang, China). The sections were washed in a phosphate buffer subjected to Giemsa staining processing [21]. The staining was performed in triplicate for each mouse (i.e. three sections per animal), and a single slide contained the sections for all four experimental groups. The sections were mounted on gelatinized glass slides and stained for 30 s in commercially available

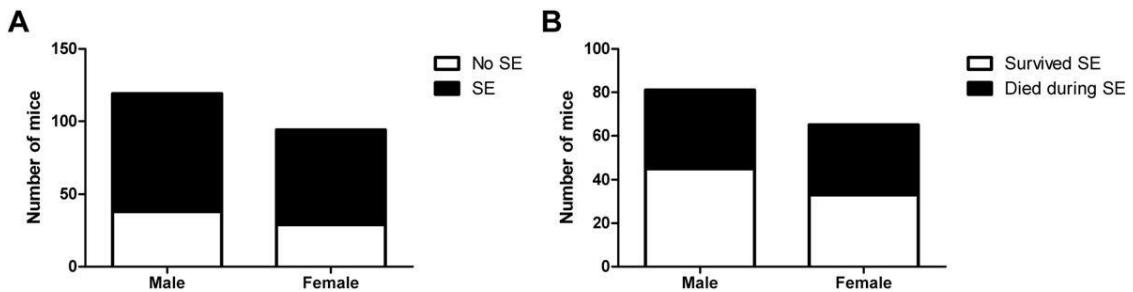


Fig. 1. Gender-related differences in the sensitivity to pilocarpine-induced SE. (A) Number of mice sensitive or resistant to entering SE and (B) number of mice surviving or dying during SE.

Giemsa solution (New Prov, Pinhais, PR, Brazil), washed three times for 2 min in distilled water, dehydrated in three graded ethanol solutions (70, 90 and 100%), cleared for 2 min in xylene and mounted with Cytoseal 60 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Evaluation of Giemsa-stained slides was conducted with 10 \times magnification under a light microscope (Leica DFC290, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), and the pictures of slices were taken with Leica Application Suite v3.8. The number of cells within the dentate hilus was assessed on both hemispheres of each section and counts were averaged to result in a single value for each mouse.

2.12. Statistical analyses

Data were analyzed by two-way analysis of variance (ANOVA) and expressed as mean + standard error of the mean. Data from the rotarod test were analyzed by the Scheirer-Ray-Hare extension of the Kruskal-Wallis test (non-parametric equivalent of two-way ANOVA) and expressed as median and interquartile range. The Fisher's exact test was used for frequency analyses. Post hoc comparisons were performed using the Bonferroni's test, when appropriate. A probability of P $<$ 0.05 was considered significant.

3. Results

3.1. Induction of seizures and SE by pilocarpine

Considering the susceptibility to SE, we found no significant differences between the male and female mice (Fig. 1A). Accordingly, SE was successfully induced in 68% (81/119) of the male mice and in 69% (65/94) of the female mice. The SE survival rate was not significantly different between genders (Fig. 1B). In fact, 44% (36/81) of the male mice and 49% (32/65) of the female mice died during SE (Fisher's exact test, P N 0.05). These numbers are compatible with a large previous study on the factors affecting the outcomes of pilocarpine treatment in a mouse model of temporal lobe epilepsy [5].

3.2. Open-field

Epileptic mice, independent of gender, spent less time in the center of an open-field arena [$F(1,29) = 16.57$; P b 0.0004 — Fig. 2A], and presented increased latency to start the spontaneous exploration in this apparatus [$F(1,32) = 10.64$; P b 0.003 — Fig. 2B] compared to age-matched controls. On the other hand, no differences were found regarding the number of crossings [$F(1,32) = 0.2203$; P N 0.05] — Fig. 2C]. Statistical

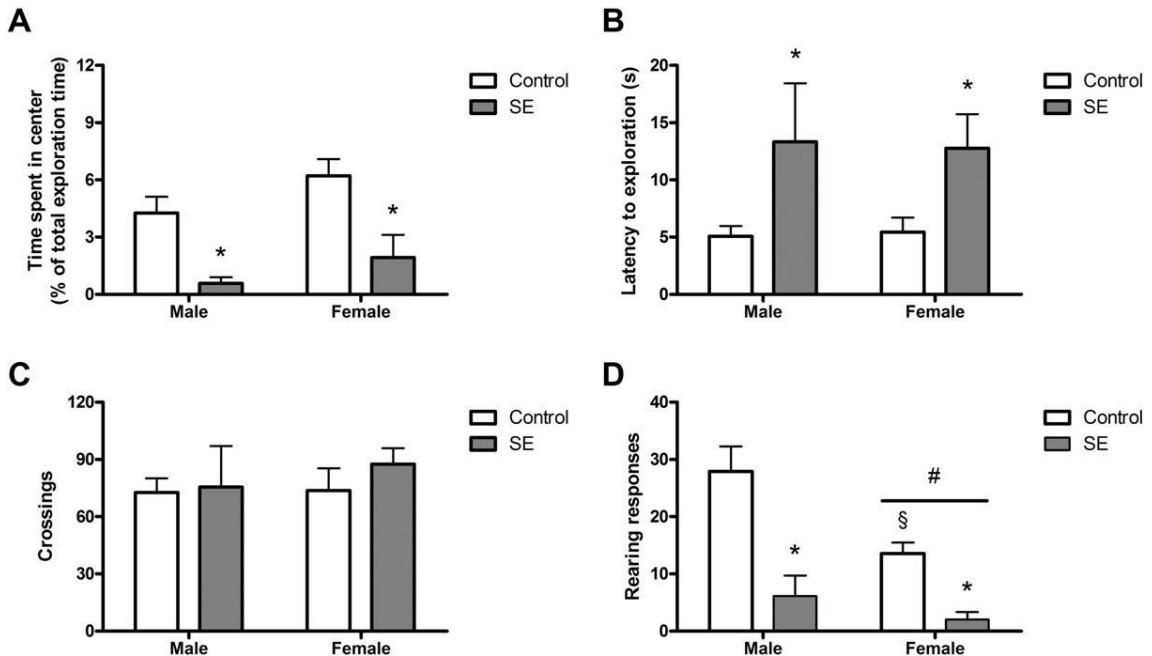


Fig. 2. Effect of pilocarpine-induced SE and gender on mice behavior in the open-field test. (A) Time spent in the center of the arena, (B) latency to start exploration, (C) number of crossings and (D) number of rearing responses. *Indicates a significant difference between epileptic and their respective controls from the same gender. #Indicates a significant difference between male and female mice, regardless of epilepsy. \$Indicates a significant difference between male and female controls. Data are mean + standard error of the mean for n = 6–13 per group (male control n = 13, female control n = 7 for time in the center of the arena and n = 9 for the other parameters, male SE n = 6, female SE n = 7 for time in the center of the arena and n = 8 for the other parameters).

analyses also revealed that epileptic mice, regardless of gender, displayed less rearing responses than control animals [$F(1,32) = 20.37$; $P < 0.0001$ — Fig. 2D]. Control and epileptic female mice presented less rearing responses than their male counterparts [$F(1,32) = 6.306$; $P < 0.02$ — Fig. 2D].

3.3. Object recognition

We found that the male mice spent less time in object exploration during the training phase than their female counterparts [$F(1,45) = 5.531$; $P < 0.05$ — Fig. 3A]. On the other hand, no significant differences regarding gender or epilepsy were found when the recognition index was measured 4 h after training (i.e. short-term memory) [$F(1,39) = 1.903$; $P > 0.05$ — Fig. 3B]. Conversely, epileptic mice, independent of gender, showed a decreased recognition index 24 h after training (i.e. long-term memory) [$F(1,38) = 11.64$; $P < 0.002$ — Fig. 3C].

3.4. Beam walk and rotarod tests

In this test we found that the female mice, regardless of epilepsy, presented a shorter latency to cross the beam [$F(1,44) = 5.252$; $P < 0.05$ — Fig. 4A] when compared to their male counterparts. Interestingly, a conceptually similar result was found in the rotarod test. Statistical analysis revealed that latency to fall of the rod was significantly lower in males [$H(1,27) = 4.279$; $P < 0.05$ — Fig. 4B]. No statistically significant differences were found between control and epileptic mice in these tests.

3.5. Barnes maze

Statistical analyses revealed that the control and epileptic mice of both genders satisfactorily learned to find the escape box in the Barnes maze apparatus, as revealed by a significant main effect for session number [$F(3,69) = 39.14$; $P < 0.0001$ — Fig. 5]. Interestingly, the epileptic mice, independent of gender, required more time to find the escape box in the first block of trials (i.e. session #1) [$F(1,23) = 7.654$; $P < 0.02$]. No significant differences were found between the epileptic and age-matched controls regarding the latency to find the escape box in the other sessions (#2, 3 and 4).

3.6. Forced swimming and taste preference tests

In the forced swim test we found that the epileptic male, but not the female mice presented shorter immobility time than their control counterparts [$F(1,36) = 4.626$; $P < 0.05$ — Fig. 6A]. On the other hand, we found that the epileptic mice of both genders displayed decreased sucrose preference than their respective controls [$F(1,31) = 4.764$; $P < 0.05$ — Fig. 6B]. No significant differences were found regarding total fluid (water plus sucrose) consumption [$F(1,31) = 0.2596$; $P > 0.05$ — data not shown].

3.7. Histopathology

Statistical analyses revealed that the epileptic mice of both genders presented a statistically significant cell loss in the hilus of dentate gyrus [$F(1,14) = 9.619$; $P < 0.008$ — Fig. 7] when compared to their age-matched controls. Magnitude of cell loss was similar between the male and female epileptic mice (41.11% and 28.01% respectively).

4. Discussion

Cognitive and behavioral deficits represent a serious neuropsychological problem in people suffering from TLE [3,22]. In fact, in addition to epileptic seizures, the quality of life of epilepsy patients is critically affected by several neurological comorbidities occurring in the interictal or ictal/postictal states, including depression, anxiety and cognitive

deficits [23]. For instance, the quantification of depression appears to be a better predictor of quality of life than the frequency of seizures, and depressed patients perceive more severity of their epilepsy [24]. Moreover, epidemiological evidence indicates that some antiepileptic drugs also improve the epilepsy patient's mood [24], and that the prevalence of comorbidities is higher among patients with poorly controlled seizures [25]. Importantly, the etiology of epilepsy comorbidities has been attributed to several factors, including the frequency and severity of seizures, presence of primary neuropathology (e.g. hippocampal sclerosis), occurrence of electroencephalographic abnormalities, iatrogenic effects of antiepileptic medications and also the stigma associated with the disorder [22].

In this context, the identification of predictors and underlying mechanisms that contribute to the comorbidities of epilepsy is of fundamental

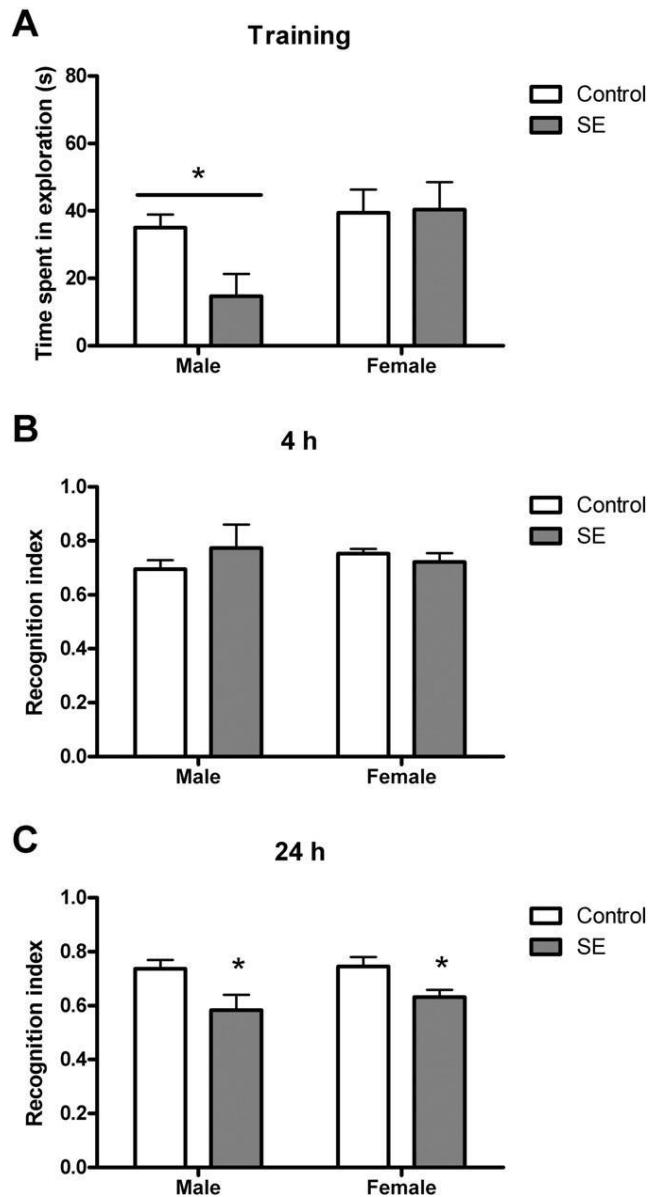


Fig. 3. Effect of pilocarpine-induced SE and gender on mice behavior in the object recognition test. (A) Time spent in object exploration during training and object recognition index at (B) 4 or (C) 24 h after training (short and long memory, respectively). *Indicates a significant difference between epileptic and their respective controls from the same gender. Data are mean + standard error of the mean for $n = 5$ –16 per group (A: male control $n = 16$, female control $n = 13$, male SE $n = 9$, female SE $n = 11$; B and C: male control $n = 16$, female control $n = 12$, male SE $n = 5$, female SE $n = 10$).

importance [3,22]. Accordingly, animal models of epilepsy are useful to enhance our understanding of causal mechanisms underlying the association between epilepsy and behavioral abnormalities [8,12]. In addition, several factors may underlie differences in vulnerability to disease and response to pharmacological treatment, and it has been proposed that an important source of such variability depends on gender [26]. In fact, gender-related differences in the prevalence, etiology and responses to treatments of neuropsychiatric disorders are indeed well recognized [26]. Therefore, in the present study we investigate the occurrence of potential gender-related differences regarding behavioral alterations in C57BL6 mice after pilocarpine-induced SE.

The open-field test is based on the natural rodent exploratory instincts in a novel place, and has been widely used to monitor locomotion, exploration, anxiety, and risk assessment in response to a novel environment [13]. In the present study we found that the epileptic mice, regardless of gender, displayed several differences during the open-field test, when compared to the non-epileptic controls. First, the epileptic mice spent less time in the center of the arena. Such increased thigmotaxis of the epileptic C57BL/6 mice in the open field has been reported previously and may either indicate increased anxiety or stereotypic, impulsive behavior [8]. In fact, it has been demonstrated that several reference anxiogenic drugs increased thigmotaxis, whereas anxiolytic drugs reduced it [27]. In addition to increased thigmotaxis, the pilocarpine-epileptic male and female mice presented an increased latency to start the spontaneous exploration of the open field arena, further indicating increased anxiety-like behavior since a lower propensity for exploration correlates with a higher level of anxiety [26]. Moreover, the number of rearing responses was recorded, and we found that the epileptic mice, independent of gender, presented less rearings than their non-epileptic age-matched controls, another indicative of increased anxiety. Interestingly, the female mice, regardless of epilepsy, presented less rearing responses than the male mice. While such difference may indicate that C57BL/6 female mice in general display more anxiety-like behavior than their male counterparts, taking such difference into account may help select the best gender to a given experiment. Although no single behavior in the open-field appears to reflect only anxiety or emotional reactivity [28], it is possible that the male C57BL/6 mice may be the best choice when the intervention in epilepsy is predicted to decrease rearing behavior, whereas the female C57BL/6 mice may be more appropriate when an increase in the number of rearings is hypothesized.

The impairment of a variety of memory types has been extensively described in clinical and experimental TLE, including declarative and spatial memories [3,22]. In this context, in the present study we found that the epileptic mice present deficits in recognition memory. This type of declarative memory can be assessed in the novel object recognition test, which is based on the natural tendency of rodents to investigate a novel object instead of a familiar one [14]. Accordingly, such method has been widely used to study mutant mice, aging deficits,

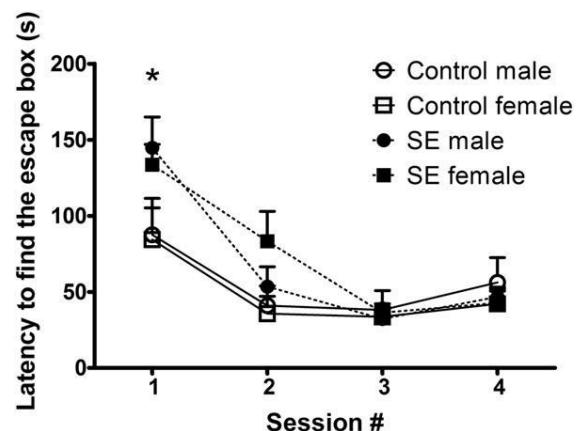


Fig. 5. Effect of pilocarpine-induced SE and gender on the latency to find the escape box in the Barnes maze. *Indicates a significant difference between epileptic and their respective controls from the same gender. Data are mean + standard error of the mean for $n = 6\text{--}9$ per group (male control $n = 6$, female control $n = 6$, male SE $n = 6$, female SE $n = 9$).

early developmental influences, nootropic manipulations, teratological drug exposure and novelty seeking [14]. Here we found that the male mice spent less time in object exploration in the training phase (i.e. when presented to two identical objects). However, this fact seems not to critically influence the performance in the test, since there are no differences between the male and female mice regarding the recognition index. Interestingly, the epileptic mice, regardless of gender, displayed a lower recognition index than their respective controls 24 h after the training session, indicating that the pilocarpine-induced SE impaired long term but not short term memory, since the recognition index was similar between the control and epileptic animals when evaluated 4 h after the training.

In addition to object recognition memory, in the present study we evaluated the mice spatial learning and memory by the Barnes maze paradigm, a validated test often used for the assessment of rodents [29]. The Barnes maze exploits the natural inclination of small rodents to seek escape to a darkly lit, sheltered environment when placed in an open arena under a bright, aversive illumination. We showed that all the mice satisfactorily learned to find the escape box in the Barnes maze apparatus. Nevertheless, the epileptic mice, independent of gender, required more time to find the escape box in the first block of trials. These data may be explained by the fact that the epileptic mice displayed increased latency to start the spontaneous exploration of the maze, similarly as seen in the open field task. Indeed, these data further suggest increased anxiety-like behavior following the pilocarpine-induced SE in the C57BL/6 mice.

In order to evaluate the motor coordination and balance of the animals we performed the beam walk and the rotarod tests. In both tests

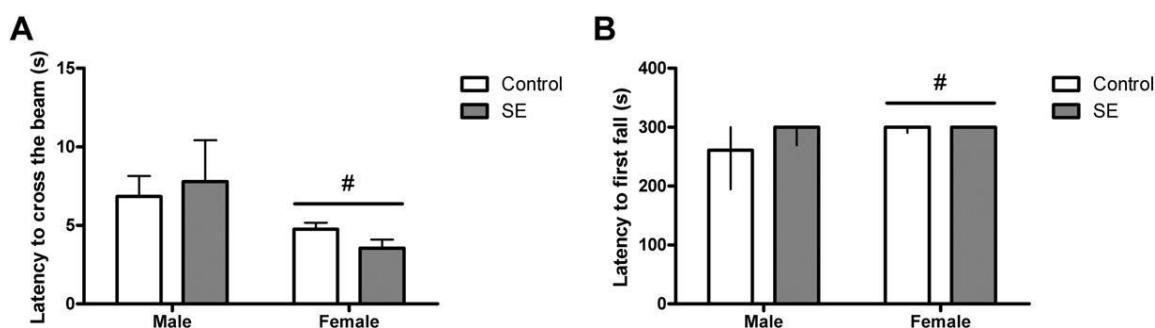


Fig. 4. Effect of pilocarpine-induced SE and gender on mice behavior in the beam walk test or in the rotarod test. (A) Latency to cross the beam and (B) latency to the first fall. *Indicates a significant difference between male and female mice, regardless of epilepsy. Data are mean + standard error of the mean for $n = 8\text{--}16$ per group (male control $n = 16$, female control $n = 12$, male SE $n = 8$, female SE $n = 10$) in the beam walk test. Data are median interquartile ranges for $n = 7\text{--}8$ per group (male control $n = 8$, female control $n = 6$, male SE $n = 10$, female SE $n = 7$) in the rotarod test.

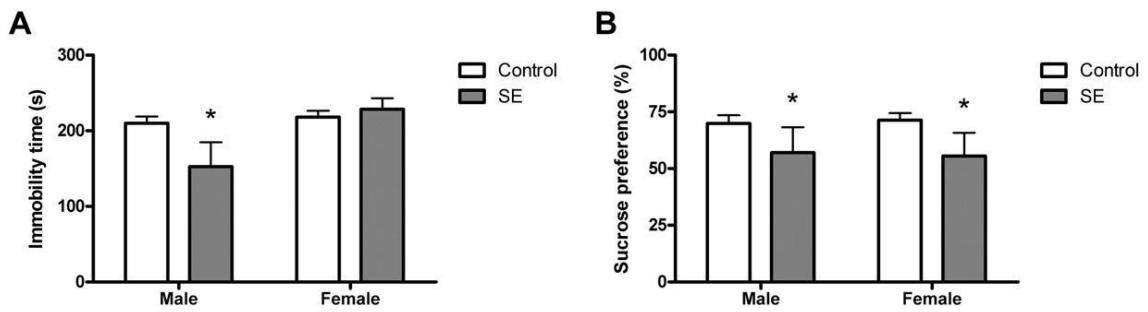


Fig. 6. Effect of pilocarpine-induced SE and gender on mice behavior in the forced swimming and taste preference tests. (A) Immobility time and (B) sucrose preference. *Indicates a significant difference between epileptic and their respective controls from the same gender. Data are mean + standard error of the mean for n = 6–13 per group (A: male control n = 13, female control n = 11, male SE n = 8, female SE n = 8; B: male control n = 13, female control n = 9, male SE n = 6, female SE n = 7).

we found a significant difference between the genders; female mice, independent of epilepsy, presented a shorter latency to cross the narrow beam and a higher latency to fall off the rotarod apparatus. Overall, it is possible that the male C57BL/6 mice may be the best choice when the intervention is predicted to improve the fine motor performance, while the opposite seems to justify the choice for the female mice in this test. In addition, the present data also indicate that the epileptic C57BL/6/J mice appear to not display deficits in fine motor coordination. To some extent, these findings appear in accordance with previous studies using quinolinic acid lesioned animals [30]. For instance, it has been demonstrated that intrahippocampal injection of quinolinic acid in the female C57BL/6/J mice produced large lesions affecting 40–50% of the hippocampus. Nevertheless, despite the severity of the lesion, the mice did not show any impairment in the rotarod test, and none of

the histopathological measures correlated with the latency to fall off the rod [30].

Another important condition commonly associated with epilepsy is depression, which represents one of the most disabling comorbidities of epilepsy and impacts profoundly negatively the quality of life of patients with epilepsy [17]. Anhedonia, defined as decreased ability to experience pleasure, is a core symptom of human depression [31]. Accordingly, it is an important diagnostic feature of a major depressive disorder, and predicts antidepressant efficacy [31]. Importantly, such depression-like behavior is also present in the pilocarpine-epileptic rats [17]. In the present study we found that the epileptic mice, regardless of gender, presented lower sucrose preference than their age-matched non-epileptic controls, further suggesting that pilocarpine-induced SE triggers depression-like behavior. In addition, we tested

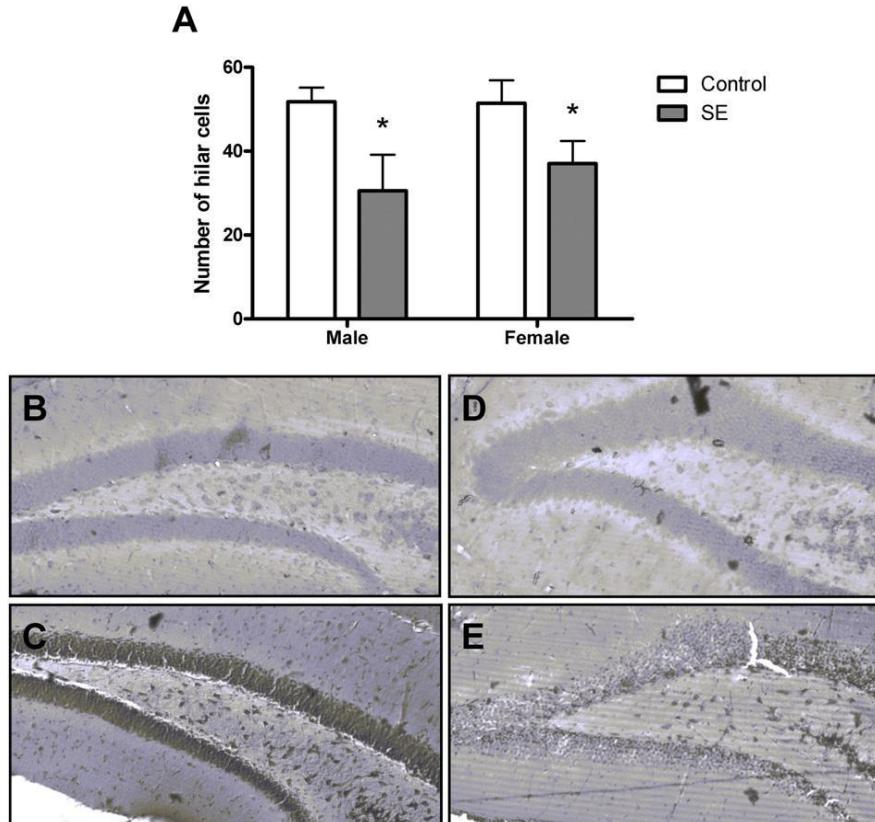


Fig. 7. Effect of pilocarpine-induced SE and gender on the number of hilar cells in the dentate gyrus of mice hippocampus (A). Representative photomicrographs are shown in B–E, as follows: (B) male control, (C) male SE, (D) female control and (E) female SE. *Indicates a significant difference between epileptic and their respective controls from the same gender. Data are mean + standard error of the mean for n = 4–5 per group (male control n = 5, female control n = 5, male SE n = 4, female SE n = 4).

mice performance in the forced swim paradigm, another test for the depression-like behavior which has been widely used for the preclinical screening of antidepressant action in patients [32]. We found that the epileptic male mice increased motor activity in which most of the ani-mals did not adopt an immobile posture, but rather were active over a half period of this test. However, as originally proposed by Müller et al. [8], the markedly reduced immobility of the epileptic male mice in such test may not be an indicative of decreased depressive-like behavior, but rather an abnormal behavior resulting from a problem in understanding the context (i.e. epileptic male mice appears not to understand that they cannot escape and therefore continue to effort) [8].

As a consequence of the pilocarpine-induced SE, histopathological changes have been observed in different hippocampal as well as extra-hippocampal areas [12,33,34]. For instance, extensive loss of neurons, astrocytosis, inflammation and subsequent synaptic reorganization, such as aberrant mossy fiber sprouting, have been described in this model [7,11,12,34,35]. In the present study we found that the typical loss of neurons within the hilus of dentate gyrus occurs at a similar magnitude in the epileptic male and female mice. The present data is in accordance with a recent study by Bankstahl et al. [9], who evaluated different substrains of the C57BL/6 mice of both genders regarding development of epilepsy-associated hippocampal injury. Neuronal count in the CA1, CA3 and in the hilus of dentate gyrus did not differ between the male and female epileptic mice as well as between the C57BL/6 substrains [9]. Based on accumulating literature on the pilocarpine model we believe that most behavioral impairments arise from the morphological and functional changes in the hippocampus. Nevertheless, neuronal loss has been shown to occur in extrahippocampal areas such as the cerebral cortex, striatum, amygdala and thalamus [7,36], indicating that several brain areas are affected following SE. Although a causal relationship between neuronal loss and behavioral comorbidities of epilepsy remains elusive, most of the above cited areas are likely involved in the regulation of mice behavior. Therefore, SE-elicited changes in any of these areas may also contribute to the presently reported behavioral impairments.

At last, it is also important to note the potential limitations of the current study. Since no systematic observations were done to detect spontaneous seizures, a quantitative analysis of seizure frequency and severity between genders was not possible, and therefore we cannot rule out that differences in seizure frequency or severity may help explain the differences in some tests. Indeed, it is not possible to determine whether the gender affected the severity epileptic phenotype in terms of seizure frequency and severity, and also whether seizure frequency or severity affected outcomes of behavioral tests. This would be particularly important for tests lasting for a long time and partly with no investigator present, such as the 24-hour phase of the object recognition test or the taste preference test and tests requiring several days of training, such as the Barnes maze test. Therefore, monitoring of spontaneous seizures should be part of the routine of future studies.

5. Conclusions

By using a test battery for behavioral and cognitive alterations in the pilocarpine-induced temporal lobe epilepsy in the C57BL/6 mice, we found that mice of both genders display several of the behavioral and cognitive disturbances that are associated with epilepsy in humans. Importantly, we present evidence that some of the behavioral alterations following the pilocarpine-induced SE are more evident in a given gender. In this context, taking the potential differences into account may help choose the more appropriate gender for a given task, which also may be of value for the minimization of the number of animals used during the experiments.

Acknowledgments

The work was supported by grants ARD 11/1630-1 from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul FAPERGS) and PRONEM 11/2082-4 from FAPERGS and 305956/2012-4 from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and by fellowships from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) (to C.V.O., V.R.F. and L.R.R.), CNPq (to M.R.F., L.F.F.R., A.F.F. and M.S.O.) and FAPERGS (to J.G.). The authors thank Dr. Carlos Fernando Mello for kindly providing laboratory facilities.

References

- [1] S. Rowley, M. Patel, Mitochondrial involvement and oxidative stress in temporal lobe epilepsy, *Free Radic. Biol. Med.* 62 (2013) 121–131.
- [2] H.G. Wieser, ILAE Commission Report. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis, *Epilepsia* 45 (2004) 695–714.
- [3] G.G. Murphy, Spatial learning and memory — what's TLE got to do with it? *Epilepsy Curr.* 13 (2013) 26–29.
- [4] G. Curia, D. Longo, G. Biagini, R.S. Jones, M. Avoli, The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy, *J. Neurosci. Methods* 172 (2008) 143–157.
- [5] P.S. Buckmaster, M.M. Haney, Factors affecting outcomes of pilocarpine treatment in a mouse model of temporal lobe epilepsy, *Epilepsia Res.* 102 (2012) 153–159.
- [6] C.J. Müller, I. Groticke, J. Hoffmann, K. Schughart, W. Loscher, Differences in sensitivity to the convulsant pilocarpine in substrains and sublines of C57BL/6 mice, *Genes Brain Behav.* 8 (2009) 481–492.
- [7] K. Borges, M. Gearing, D.L. McDermott, A.B. Smith, A.G. Almonte, B.H. Wainer, et al., Neuronal and glial pathological changes during epileptogenesis in the mouse pilo-carpine model, *Exp. Neurol.* 182 (2003) 21–34.
- [8] C.J. Müller, I. Groticke, M. Bankstahl, W. Loscher, Behavioral and cognitive alterations, spontaneous seizures, and neuropathology developing after a pilocarpine-induced status epilepticus in C57BL/6 mice, *Exp. Neurol.* 219 (2009) 284–297.
- [9] M. Bankstahl, C.J. Müller, E. Wilk, K. Schughart, W. Loscher, Generation and characterization of pilocarpine-sensitive C57BL/6 mice as a model of temporal lobe epilepsy, *Behav. Brain Res.* 230 (2012) 182–191.
- [10] R.J. Racine, Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure, *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 32 (1972) 281–294.
- [11] M. Mazzuferi, G. Kumar, C. Rospo, R.M. Kaminski, Rapid epileptogenesis in the mouse pilocarpine model: video-EEG, pharmacokinetic and histopathological characterization, *Exp. Neurol.* 238 (2012) 156–167.
- [12] I. Groticke, K. Hoffmann, W. Loscher, Behavioral alterations in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in mice, *Exp. Neurol.* 207 (2007) 329–349.
- [13] M.A. Rubin, D.B. Berlese, J.A. Stiegemeier, M.A. Volkweis, D.M. Oliveira, T.L. dos Santos, et al., Intra-amygdala administration of polyamines modulates fear conditioning in rats, *J. Neurosci.* 24 (2004) 2328–2334.
- [14] R.A. Bevins, J. Besheer, Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory', *Nat. Protoc.* 1 (2006) 1306–1311.
- [15] A. Irinchev, O. Simova, K.A. Eberhardt, F. Morellini, M. Schachner, Impacts of lesion severity and tyrosine kinase receptor B deficiency on functional outcome of femoral nerve injury assessed by a novel single-frame motion analysis in mice, *Eur. J. Neurosci.* 22 (2005) 802–808.
- [16] D. Wahlsten, P. Metten, T.J. Phillips, S.L. Boehm 2nd, S. Burkhardt-Kasch, J. Dorow, et al., Different data from different labs: lessons from studies of gene-environment interaction, *J. Neurobiol.* 54 (2003) 283–311.
- [17] A. Mazarati, P. Siddarth, R.A. Baldwin, D. Shin, R. Caplan, R. Sankar, Depression after status epilepticus: behavioural and biochemical deficits and effects of fluoxetine, *Brain* 131 (2008) 2071–2083.
- [18] M.S. Oliveira, A.F. Furian, M.R. Fighera, N.G. Fiorenza, J. Ferreira, M.A. Rubin, et al., The involvement of the polyamines binding sites at the NMDA receptor in creatine-induced spatial learning enhancement, *Behav. Brain Res.* 187 (2008) 200–204.
- [19] M.A. Westerman, D. Cooper-Blacketer, A. Mariash, L. Kotilinek, T. Kawarabayashi, L.H. Younkin, et al., The relationship between Abeta and memory in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease, *J. Neurosci.* 22 (2002) 1858–1867.
- [20] R. Sunal, B. Gumusel, S.O. Kayalp, Effect of changes in swimming area on results of "behavioral despair test", *Pharmacol. Biochem. Behav.* 49 (1994) 891–896.
- [21] C. Iniguez, M.J. Gayoso, J. Carreres, A versatile and simple method for staining nervous tissue using Giemsa dye, *J. Neurosci. Methods* 13 (1985) 77–86.
- [22] B. Hermann, M. Seidenberg, J. Jones, The neurobehavioural comorbidities of epilepsy: can a natural history be developed? *Lancet Neurol.* 7 (2008) 151–160.
- [23] W.A. Swinkels, J. Kuyk, R. van Dyck, P. Spinthoven, Psychiatric comorbidity in epilepsy, *Epilepsy Behav.* 7 (2005) 37–50.
- [24] C.L. Harden, The co-morbidity of depression and epilepsy: epidemiology, etiology, and treatment, *Neurology* 59 (2002) S48–S55.
- [25] W.C. LaFrance Jr., A.M. Kanner, B. Hermann, Psychiatric comorbidities in epilepsy, *Int. Rev. Neurobiol.* 83 (2008) 347–383.
- [26] P. Palanza, Animal models of anxiety and depression: how are females different? *Neurosci. Biobehav. Rev.* 25 (2001) 219–233.
- [27] P. Simon, R. Dupuis, J. Costentin, Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmissions, *Behav. Brain Res.* 61 (1994) 59–64.

- [28] J.N. Crawley, J.K. Belknap, A. Collins, J.C. Crabbe, W. Frankel, N. Henderson, et al., Behavioral phenotypes of inbred mouse strains: implications and recommendations for molecular studies, *Psychopharmacology (Berl)* 132 (1997) 107–124.
- [29] C.A. Barnes, Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat, *J. Comp. Physiol. Psychol.* 93 (1979) 74–104.
- [30] H. Goddyn, S. Leo, T. Meert, R. D'Hooge, Differences in behavioural test battery performance between mice with hippocampal and cerebellar lesions, *Behav. Brain Res.* 173 (2006) 138–147.
- [31] P.A. Keedwell, C. Andrew, S.C. Williams, M.J. Brammer, M.L. Phillips, The neural correlates of anhedonia in major depressive disorder, *Biol. Psychiatry* 58 (2005) 843–853.
- [32] J.F. Cryan, C. Mombereau, A. Vassout, The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29 (2005) 571–625.
- [33] F.R. Tang, W.K. Loke, Cyto-, axo- and dendro-architectonic changes of neurons in the limbic system in the mouse pilocarpine model of temporal lobe epilepsy, *Epilepsy Res.* 89 (2010) 43–51.
- [34] W.A. Turski, E.A. Cavalheiro, Z.A. Bortolotto, L.M. Mello, M. Schwarz, L. Turski, Seizures produced by pilocarpine in mice: a behavioral, electroencephalographic and morphological analysis, *Brain Res.* 321 (1984) 237–253.
- [35] T. Ravizza, B. Gagliardi, F. Noe, K. Boer, E. Aronica, A. Vezzani, Innate and adaptive immunity during epileptogenesis and spontaneous seizures: evidence from experimental models and human temporal lobe epilepsy, *Neurobiol. Dis.* 29 (2008) 142–160.
- [36] Y. Avchalumov, T. Kirschstein, R. Kohling, Altered physiology and pharmacology in the corticostratial system in a model of temporal lobe epilepsy, *Epilepsia* 52 (2011) 151–157.

6 MANUSCRITO 1**Subtle improvement of seizure susceptibility by Atorvastatin treatment during epileptogenesis**

Clarissa Vasconcelos de Oliveira^a, Viviane Nogueira Zorzi^b, Michele Rechia Fighera^{a,b}, Luiz Fernando Freire Royes^{a,b}, Ana Flávia Furian^a, Mauro Schneider Oliveira^{a,*}

^a Graduate Program in Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^b Graduate Program in Biological Sciences: Biochemistry, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

*Corresponding author: Dr. Mauro Schneider Oliveira, Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Av. Roraima, nº 1000, Prédio 21, sala 5207 - CEP 97105-900, Santa Maria - RS, Brasil

E-mail: ms.oliveira@uol.com.br

Phone: 55 55 3220 9378

Abstract

Background: The process by which a brain insult elicits epilepsy is termed epileptogenesis and it is characterized by numerous molecular and functional alterations. Statins are first-line drugs for hypercholesterolemia and related diseases, and display neuroprotective properties in clinical and experimental studies. Considering the importance in developing therapeutic strategies to prevent or modify epileptogenesis, we aimed the present study to test the hypothesis that atorvastatin modifies seizure susceptibility of mice after status epilepticus (SE).

Methods: Male and female C57BL/6 mice were submitted to the pilocarpine-induced SE and then treated with atorvastatin (10 or 100mg/kg, once daily by gavage) for 14 days. At days 7 and 14 post SE we evaluated the susceptibility of mice to the convulsant effects of a low dose of PTZ (30 mg/kg). Cell loss in the hilus of dentate gyrus was evaluated by Giemsa staining.

Results: Latencies to myoclonic jerks and to tonic-clonic seizures decreased between baseline (before SE) and days 7 and 14 after SE, confirming the development of seizure susceptibility. Atorvastatin protected against PTZ-induced tonic-clonic seizures in both sexes at day 14 post-SE. Protective effects were similar in both female and male mice, except that a high dose of atorvastatin was required for females (protection at 100 mg/kg versus 10 mg/kg in males). Giemsa staining did not reveal neuroprotective effects of atorvastatin.

Conclusions: Atorvastatin treatment during epileptogenesis had slight beneficial effects on seizure susceptibility. These seem not related to neuroprotection. Further studies are needed to determine the disease-modifying potential of atorvastatin in epilepsy.

Keywords: epilepsy; *status epilepticus*; epileptogenesis; statin; neuronal death.

Introduction

Epilepsy is the second most frequent neurological disorder in the world after stroke [1]. Acquired epilepsy develops after an acute brain insult, including but not limited to traumatic brain injury (TBI), intracerebral hemorrhage, neuroinfection, and status epilepticus (SE) [2].

Acquired epilepsy involves a two-stage process. In the first stage, called epileptogenesis, an injury alters neuronal network properties leading to generation of subclinical epileptiform discharges [3]. In the second stage, named “epileptic maturation”, such discharges become progressively larger in duration and may spread to and recruit other neuronal populations, causing clinical epilepsy [3]. Therefore, the epileptogenesis stage may constitute a window of opportunity in which an appropriate therapeutic intervention may have disease-modifying effects [4]. This is especially important because currently there is no antiepileptogenic strategy to prevent the development of acquired epilepsy after exposition to a potentially epileptogenic brain insult [4]. In this context, one hallmark of epileptogenesis is the development of neuronal hyperexcitability [4], which is thought to be inversely proportional to the susceptibility to epileptic seizures [5]. Accordingly, several studies have measured seizure threshold as an index of effectiveness of new therapeutic strategies to prevent epileptogenesis [5].

Increasing evidence have suggested that statins, besides their levels cholesterol-lowering properties, exhibit neuroprotective effects in several neurological conditions, including acute seizures [6, 7]. For instance, pretreatment with atorvastatin, the most clinically prescribed statin, has been found to attenuate seizures induced by kainic acid [8], quinolinic acid [9] and pentylenetetrazol (PTZ) [10]. In addition, while atorvastatin has a weak efficacy in preventing audiogenic seizures in DBA/2 mice, it was able to potentiate the effects of some established anticonvulsant drugs [11]. On the other hand, the effect of atorvastatin on epileptogenesis remains elusive. In fact, atorvastatin treatment did not affect the development of epilepsy after electrically-induced SE [12]. Conversely, long-term treatment with atorvastatin showed antiepileptogenic effects in WAG/Rij rats, a genetic animal model of absence epilepsy [13]. To further investigate the potential antiepileptogenic effects of atorvastatin, we hypothesized that atorvastatin would attenuate post SE increased seizure susceptibility. In this context, in the present study we used the SE induced by pilocarpine as the initial insult to investigate the effects of early treatment with two doses of atorvastatin on seizure susceptibility and neuronal damage in male and female mice.

Materials and methods

Animals

A total of 74 male and 78 female C57BL/6 mice (25-35g; 30-60 day-old) were used. Animals were kept under standard environmental conditions (12:12 h light-dark cycle, room temperature 22 ± 1 °C) and with free access to food (Puro Lab 22 PB, Puro Trato) and filtered tap water. All experimental protocols conducted in accordance with national and international legislation, and with the approval of the Ethics Committee for Animal Research of our University (Process nº 6165230415 approved in 11/06/2015). Every possible effort was made to limit animal's suffering as well as to keep their number to a minimum.

Induction of SE by pilocarpine

SE was induced using ramping protocol as described previously [14]. To reduce peripheral adverse cholinergic effects mice were injected with methylscopolamine (1 mg/kg *ip*; Sigma-Aldrich). After 30 min mice start to receive pilocarpine hydrochloride (Sigma-Aldrich) injections (100 mg/kg, *ip*) every 20 min until the onset of SE, defined by continuous limbic convulsive activity. Pilocarpine injections were limited to 6 per animal. SE was terminated after 60 min with diazepam (10mg/kg, *ip*, Santisa). Age-matched controls were administered with methylscopolamine and diazepam, but received NaCl 0.9 % instead of pilocarpine. All mice received special care for three days following the SE or control procedure for welfare purposes. These included hand-feding with softened chow, offering of fresh fruits (apples and bananas) in their homecage, and injections of Ringer's solution containing 5% dextrose.

Complete data about animals used and SE induction performance are shown in Table 1.

Treatment with atorvastatin

Control and post-SE mice received daily doses of vehicle (NaCl 0.9%) or atorvastatin (10 or 100 mg/kg) by intragastric gavage (*ig*) once daily during 14 consecutive days, being that the first dose of atorvastatin was administered at 3 h after diazepam injection. Atorvastatin suspension was prepared by dissolving commercial tablets (Lipitor®; Pfizer) to 1 or 10 mg/mL in NaCl 0.9 % [8, 15]. Fresh atorvastatin solutions were prepared immediately before use and were administered at 10 ml/kg. The selection of atorvastatin dosing was based on previous studies [10] and on pilot studies.

Pentylenetetrazole (PTZ) seizure susceptibility

Alterations in seizure threshold occur during the latent period following SE [16], and recent evidence indicates that the susceptibility to the convulsant effects of PTZ may serve as a predictive biomarker of epilepsy [17]. Thus, in the present study we investigated the potential neuroprotective effects of atorvastatin on susceptibility to PTZ-induced seizures in the latent period (7 or 14 days) after pilocarpine-induced SE.

As a measure of seizure susceptibility, we assessed the latencies to the first myoclonic or to the first tonic-clonic seizure, as well as the duration of tonic-clonic seizures induced by a low dose of PTZ (30 mg/kg, *ip*) [18]. PTZ susceptibility test was performed at 3 time points in each mouse: 1 week before SE induction (baseline test) and 7 and 14 days post-SE (figure 1). To avoid any direct acute interference of atorvastatin on PTZ-induced seizures, the daily treatment with statin was done after the PTZ test. A timeline depicting the experimental design is presented in figure 1.

Histological analyses

To determine the effect of atorvastatin on histological parameters in the brain of animals submitted to SE, mice were deeply anesthetized with Tiopental (125 mg/kg; *ip*) and then perfused through the heart and ascending carotid using heparinized 0.9 % NaCl solution followed by 4% paraformaldehyde (PFA). This procedure occurred 60 min after the last administration of atorvastatin (or NaCl 0.9%) treatment. After perfusion the brains were removed and post fixed in PFA for at least 2 days, serial coronal sections of 50 µm (between – 1.5 and – 2.1 from bregma) were cut on a vibratome (model KD400, Zhejiang Jinhua Kedi Instrumental Equipment Co.). Sections were washed in 10 mM PBS (pH 7.4) and processed for Giemsa staining [19].

The staining was performed in duplicate for each mouse (i.e. two sections per animal). Sections were mounted on gelatinized glass slides and stained for 30 s in commercially available Giemsa stain (New Prov), washed three times for 2 min in distilled water, dehydrated in three graded ethanol solutions (70, 90 and 100%), cleared for 2 min in xylene and mounted with Cytoseal 60 (Thermo Scientific). Evaluation of Giemsa-stained slides was conducted with 20 × magnification under a light microscope (Olympus IX81 Inverted Microscope). The number of cells within the dentate hilus was assessed on the two sections and counts were averaged to result in a single value for each mouse. For cell counting purposes the hilus was delimited by the inner edge of the granular cell layer and by lines

connecting the tips of the two granule cell blades to the the pyramidal cell layer of CA3 subfield.

Statistical analyses

Onset latencies and duration of PTZ-induced seizures as well as hilar cell counts were analyzed by regular two-way ANOVA. Bonferroni post hoc test was used for multiple comparisons. Differences between females and males regarding SE induction were analyzed by Fisher's exact test. In all cases a probability of $P < 0.05$ was considered significant.

Results

The first PTZ seizure susceptibility test was carried out in all groups 7 days before SE induction, to evaluate the basal seizure threshold of animals. Only 3 out 43 female mice (6,97 %), and 1 out 38 male mice (2,63 %) showed myoclonic jerks (Figure 2A). When seizure susceptibility latency to myoclonic jerks was assessed 7 days after SE induction vehicle-treated SE, animals of both genders presented a decrease in latency to myoclonic jerks when compared with their respective age-matched controls (Figures 2B). At this time point treatment with atorvastatin (10 or 100 mg/kg) had no effect on seizure susceptibility, since the onset latency to myoclonic jerks was significantly different from the respective age-matched controls. In addition, seizure latency was not different between female versus male mice, suggesting that both sexes responded similarly to low dose of PTZ. Seizure susceptibility was investigated again 14 days after SE, and SE animals continued to display a decrease in latency to myoclonic jerks when compared with their respective age-matched controls (Figure 2C). Again, no effects of atorvastatin on the latency to myoclonic jerks induced by a low dose of PTZ were detected.

Regarding the latency to tonic-clonic seizures induced by a low dose of PTZ, only 2 out 43 female mice (4,65 %), and none of 38 male mice showed seizures of this kind in the baseline testing 7 days before SE (Figure 3A). On the other hand, 7 days after SE shorter seizure latencies were observed in SE animals of both genders, regardless of the atorvastatin treatment, when compared with their respective controls (Figure 3B). Latencies were not different between female and male mice at this time point. On the other hand, significant differences in latencies to tonic-clonic seizures were observed at day 14 post SE. Tonic-clonic seizure latency of female mice submitted to SE and treated with the high dose of atorvastatin

(100 mg/kg) was not different from the onset latency of its respective vehicle-treated control (Figure 3C). A similar effect was found in males, since the latency to tonic-clonic seizures of mice submitted to SE and treated with atorvastatin (10 or 100 mg/kg) was not different from their respective vehicle-treated controls (Figure 3C), further suggesting a protective effect of atorvastatin treatment.

In order to investigate whether atorvastatin displayed neuroprotective effects, we counted the number of hilar cells, since a decrease in the number of cells within this area is a typical finding in the pilocarpine-induced post SE model [20]. In the present study damage in the hilus of dentate gyrus was evident in mice with SE, where the number of hilar cells was reduced by about 50 % when compared with in mice submitted to control procedures (Figure 4). The loss of neurons within the hilus of dentate gyrus occurred at a similar magnitude in the post SE female versus male mice. No effects of atorvastatin treatment on hilar cell loss were detected.

Discussion

In the present study, oral administration of atorvastatin starting 3 hours after SE and continuing for 14 days showed slight positive effects on seizure susceptibility. Atorvastatin treatment increased the latency to PTZ-induced tonic-clonic seizures at day 14 post-SE in both females and males. Interestingly, effects of statin on PTZ seizure susceptibility in male mice were obtained with the dose of 10 and 100 mg/kg. In contrast, in female mice the higher dose of 100 mg/kg was needed to achieve effects on PTZ susceptibility test.

Experimental models of TLE in rodents, particularly those generated by continuous SE, have been used in the preclinical screening of potential antiepileptogenic drugs [21]. Prolonged SE leads to increased susceptibility to convulsants, as revealed by a decrease in seizure threshold [16, 17, 22]. In this context, the search for drugs capable of blunting the increased seizure susceptibility may constitute a strategy for discovery of epilepsy-modifying and/or antiepileptogenic drugs [21].

Statins are cholesterol-lowering drugs used for the treatment of hypercholesterolemia and related atherosclerotic diseases [13]. Besides the inhibition of the rate-limiting enzyme in cholesterol biosynthesis (HMG-CoA reductase), statins exert cholesterol-independent pleiotropic effects that include immunomodulatory, neuroprotective, and anti-inflammatory properties [23]. These positive effects of statins actions may also be useful in several

neurologic diseases, including epilepsy [6]. For instance, a nested case-control study in cardiovascular patients has suggested that individuals receiving statin medication had a decreased chance to need hospitalization for epilepsy [24]. Interestingly, this beneficial effect was not observed for other cardioprotective drugs, including beta blockers and angiotensin-converting enzyme inhibitors [24]. Moreover, increasing evidence from a variety of experimental studies supports the anticonvulsant effects of statins against chemically-induced convulsions [8, 10] and audiogenic seizures [11]. In addition, atorvastatin is also able to enhance the action of classical antiepileptic drugs [11]. However, to the best of our knowledge, no study has investigated the effects of atorvastatin on seizure susceptibility during latent period after pilocarpine-induced SE.

Sex-related differences in seizure susceptibility of laboratory animals have been reported in several studies, although the exact mechanisms underlying such differences are not clear [25, 26]. In 2014, the National Institutes of Health of the United States of America issued a policy about the inclusion of both genders in the preclinical research [25]. Regarding this point, it is remarkable that many studies have showed that the benefits of a given anticonvulsant for one sex are not automatically applicable to the other [27]. In the case of statins, it is believed that differences in metabolism between men and women may explain the fact that women have higher risk of adverse effects [28]. Hence, it has been suggested that preclinical studies of drugs to treat epilepsy should be tested in both sexes [26, 27]. In this context, in the present study we evaluated the effects of atorvastatin in two different dosages (10 or 100 mg/kg) and on mice from both sexes. The fact that seizure protection was detected at 10 mg/kg in males versus 100 mg/kg in females further supports the importance of drug testing in both sexes under identical conditions. Regarding this point, latencies to PTZ-induced seizures were not different between female and males, suggesting the sensitivity to PTZ of both sexes under our present experimental circumstances was similar. Another point to consider, as raised by several studies, is that depending on methodological factors (e.g. convulsant agent used, endpoints measured, species, strain, age) one sex can be more severely affected [29]. For instance, it has been reported that female mice present relative resistance to pilocarpine-SE, while males are more susceptible [30]. However, in the present study such pattern of female resistance was not observed (table 1), suggesting that requirement of a larger dose of atorvastatin in females was not related to sex-related discrepancies in the initial insult.

In the present study we also evaluated the effect of atorvastatin treatment on neuronal damage 14 days after SE induction. The loss of neurons in the hilus of dentate gyrus is a

typical finding in most rodent models of TLE. In the present study, no differences between SE mice, of both sexes, treated with statin or vehicle were found, indicating that cell loss was equivalent in both sexes and that atorvastatin did not protect hilar cells 14 days after SE. Regarding this point, it is interesting to note that protection of hilar cells in models of epilepsy has been rarely reported [4]. In addition, the lack of neuroprotective effects of atorvastatin on the number of hilar cells may indicate that its positive effects on seizure susceptibility were not related to neuronal protection during epileptogenesis. In this context, it is interesting to note that atorvastatin treatment had not effect on neuronal death or synaptic reorganization in an electrically-evoked post-SE model of epilepsy [12], further suggesting that molecular mechanisms underlying the presently reported effects of atorvastatin are not necessarily the same as for its neuroprotective properties.

Conclusion

In the present study atorvastatin treatment during epileptogenesis in the pilocarpine model showed a slight disease-modifying effect, since it partially protected against the increase in seizure susceptibility 14 days after SE. The protective effects were similar in both female and male mice, except for the fact that a high dose of atorvastatin was required for females. These data reinforce the importance of developing preclinical studies in animals of both sexes. Although limited, we believe the presently-reported beneficial effects appear interesting and cannot be undervalued, particularly because there is a consensus over the elevated difficulty to treat epileptogenesis-associated changes [31, 32].

Conflict of Interest statement

The authors declare no conflict of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

Funding sources

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

References

- [1] Schmidt D, Sillanpaa M. Evidence-based review on the natural history of the epilepsies. Curr Opin Neurol. 2012;25:159-63.

- [2] Banerjee PN, Filippi D, Allen Hauser W. The descriptive epidemiology of epilepsy-a review. *Epilepsy Res.* 2009;85:31-45.
- [3] Sloviter RS, Bumanglag AV. Defining "epileptogenesis" and identifying "antiepileptogenic targets" in animal models of acquired temporal lobe epilepsy is not as simple as it might seem. *Neuropharmacology.* 2013;69:3-15.
- [4] Loscher W, Brandt C. Prevention or modification of epileptogenesis after brain insults: experimental approaches and translational research. *Pharmacol Rev.* 2010;62:668-700.
- [5] Dudek FE. Commentary: a skeptical view of experimental gene therapy to block epileptogenesis. *Neurotherapeutics.* 2009;6:319-22.
- [6] Banach M, Czuczwar SJ, Borowicz KK. Statins - are they anticonvulsant? *Pharmacol Rep.* 2014;66:521-8.
- [7] Scicchitano F, Constanti A, Citraro R, De Sarro G, Russo E. Statins and epilepsy: preclinical studies, clinical trials and statin-anticonvulsant drug interactions. *Curr Drug Targets.* 2015;16:747-56.
- [8] Lee JK, Won JS, Singh AK, Singh I. Statin inhibits kainic acid-induced seizure and associated inflammation and hippocampal cell death. *Neurosci Lett.* 2008;440:260-4.
- [9] Piermartiri TC, Vandresen-Filho S, de Araujo Herculano B, Martins WC, Dal'agnolo D, Stroeh E, et al. Atorvastatin prevents hippocampal cell death due to quinolinic acid-induced seizures in mice by increasing Akt phosphorylation and glutamate uptake. *Neurotox Res.* 2009;16:106-15.
- [10] Funck VR, de Oliveira CV, Pereira LM, Rambo LM, Ribeiro LR, Royes LF, et al. Differential effects of atorvastatin treatment and withdrawal on pentylenetetrazol-induced seizures. *Epilepsia.* 2011;52:2094-104.
- [11] Russo E, Donato di Paola E, Gareri P, Siniscalchi A, Labate A, Gallelli L, et al. Pharmacodynamic potentiation of antiepileptic drugs' effects by some HMG-CoA reductase inhibitors against audiogenic seizures in DBA/2 mice. *Pharmacol Res.* 2013;70:1-12.
- [12] van Vliet EA, Holtman L, Aronica E, Schmitz LJ, Wadman WJ, Gorter JA. Atorvastatin treatment during epileptogenesis in a rat model for temporal lobe epilepsy. *Epilepsia.* 2011;52:1319-30.
- [13] Citraro R, Chimirri S, Aiello R, Gallelli L, Trimboli F, Britti D, et al. Protective effects of some statins on epileptogenesis and depressive-like behavior in WAG/Rij rats, a genetic animal model of absence epilepsy. *Epilepsia.* 2014;55:1284-91.

- [14] Groticke I, Hoffmann K, Loscher W. Behavioral alterations in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in mice. *Exp Neurol.* 2007;207:329-49.
- [15] Zaid AN, Assali M, Zalmout S, Basheer A. Compounding and stability evaluation of atorvastatin extemporaneous oral suspension using tablets or pure powder. *European Journal of Hospital Pharmacy.* 2016.
- [16] Rattka M, Brandt C, Bankstahl M, Broer S, Loscher W. Enhanced susceptibility to the GABA antagonist pentylenetetrazole during the latent period following a pilocarpine-induced status epilepticus in rats. *Neuropharmacology.* 2011;60:505-12.
- [17] Broer S, Loscher W. Novel combinations of phenotypic biomarkers predict development of epilepsy in the lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in rats. *Epilepsy Behav.* 2015;53:98-107.
- [18] Funck VR, Ribeiro LR, Pereira LM, de Oliveira CV, Grigoletto J, Della-Pace ID, et al. Contrasting effects of Na⁺, K⁺-ATPase activation on seizure activity in acute versus chronic models. *Neuroscience.* 2015;298:171-9.
- [19] Iniguez C, Gayoso MJ, Carreres J. A versatile and simple method for staining nervous tissue using Giemsa dye. *J Neurosci Methods.* 1985;13:77-86.
- [20] Bankstahl M, Muller CJ, Wilk E, Schughart K, Loscher W. Generation and characterization of pilocarpine-sensitive C57BL/6 mice as a model of temporal lobe epilepsy. *Behav Brain Res.* 2012;230:182-91.
- [21] Loscher W. Strategies for antiepileptogenesis: Antiepileptic drugs versus novel approaches evaluated in post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy. In: Noebels JL, Avoli M, Rogawski MA, Olsen RW, Delgado-Escueta AV, editors. *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies.* 4th ed. Bethesda (MD)2012.
- [22] Blanco MM, dos Santos JG, Jr., Perez-Mendes P, Kohek SR, Cavarsan CF, Hummel M, et al. Assessment of seizure susceptibility in pilocarpine epileptic and nonepileptic Wistar rats and of seizure reinduction with pentylenetetrazole and electroshock models. *Epilepsia.* 2009;50:824-31.
- [23] Yanuck D, Mihos CG, Santana O. Mechanisms and clinical evidence of the pleiotropic effects of the hydroxy-methyl-glutaryl-CoA reductase inhibitors in central nervous system disorders: a comprehensive review. *Int J Neurosci.* 2012;122:619-29.
- [24] Etminan M, Samii A, Brophy JM. Statin use and risk of epilepsy: a nested case-control study. *Neurology.* 2010;75:1496-500.

- [25] Clayton JA, Collins FS. Policy: NIH to balance sex in cell and animal studies. *Nature*. 2014;509:282-3.
- [26] Scharfman HE, MacLusky NJ. Sex differences in the neurobiology of epilepsy: a preclinical perspective. *Neurobiol Dis*. 2014;72 Pt B:180-92.
- [27] Luef G, Tauboll E. Gender issues in epilepsy--Difference in management of epilepsy. *Seizure*. 2015;28:1-2.
- [28] Karalis DG, Wild RA, Maki KC, Gaskins R, Jacobson TA, Sponseller CA, et al. Gender differences in side effects and attitudes regarding statin use in the Understanding Statin Use in America and Gaps in Patient Education (USAGE) study. *J Clin Lipidol*. 2016;10:833-41.
- [29] Scharfman HE, MacLusky NJ. The influence of gonadal hormones on neuronal excitability, seizures, and epilepsy in the female. *Epilepsia*. 2006;47:1423-40.
- [30] Buckmaster PS, Haney MM. Factors affecting outcomes of pilocarpine treatment in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res*. 2012;102:153-9.
- [31] Klee R, Tollner K, Rankovic V, Romermann K, Schidlitzki A, Bankstahl M, et al. Network pharmacology for antiepileptogenesis: Tolerability of multitargeted drug combinations in nonepileptic vs. post-status epilepticus mice. *Epilepsy Res*. 2015;118:34-48.
- [32] Loscher W, Klitgaard H, Twyman RE, Schmidt D. New avenues for anti-epileptic drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov*. 2013;12:757-76.

Figure legends

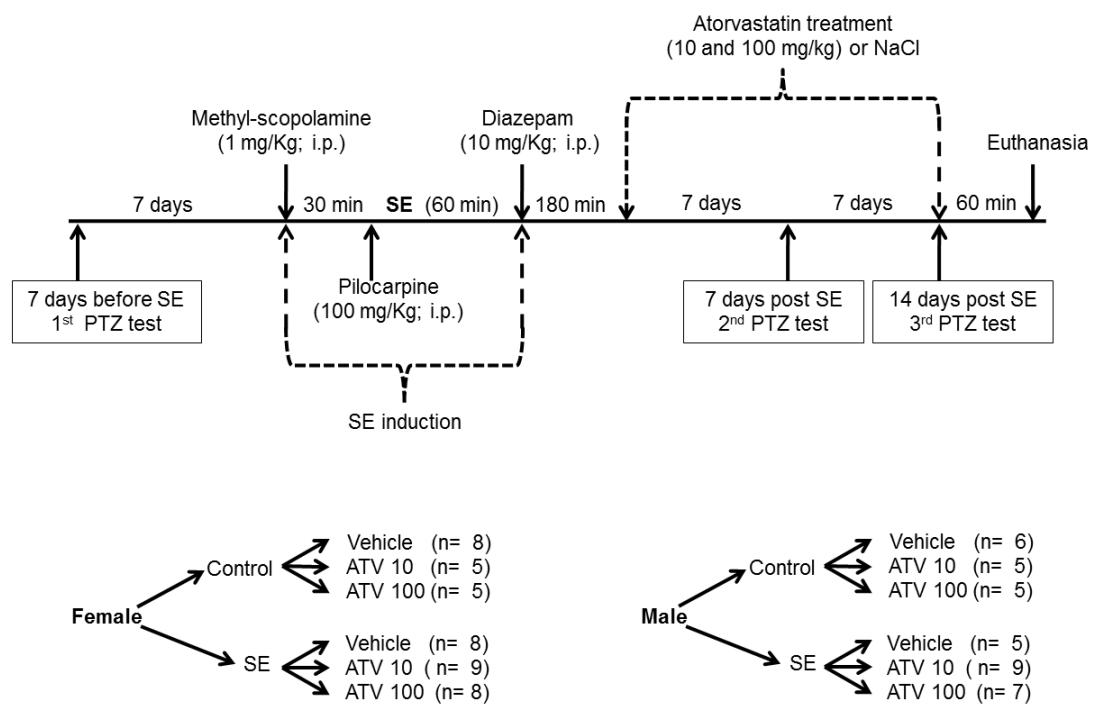
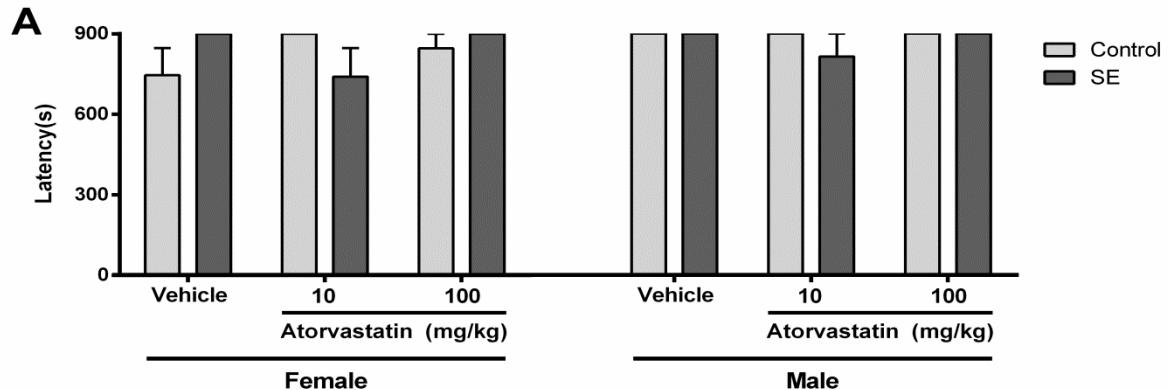


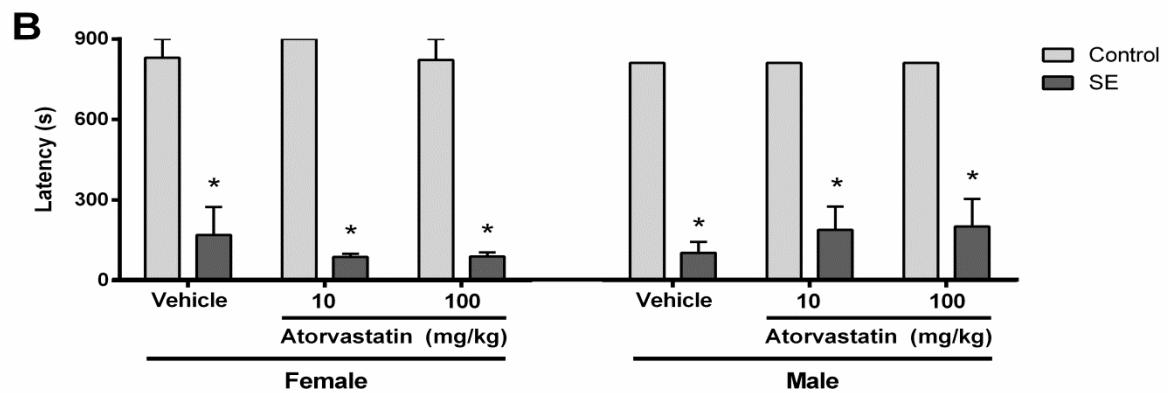
Figure 1: Schematic illustration of the experimental protocol used in this study. Numbers in parentheses indicate the number of animals in each experimental group.

Myoclonic jerks

Baseline (7 days before SE)



Seizure susceptibility test #1 (7 days after SE)



Seizure susceptibility test #2 (14 days after SE)

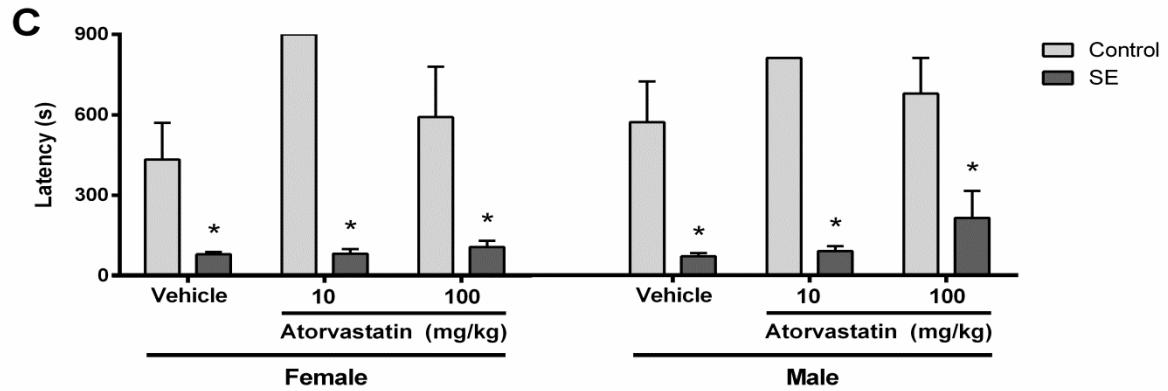
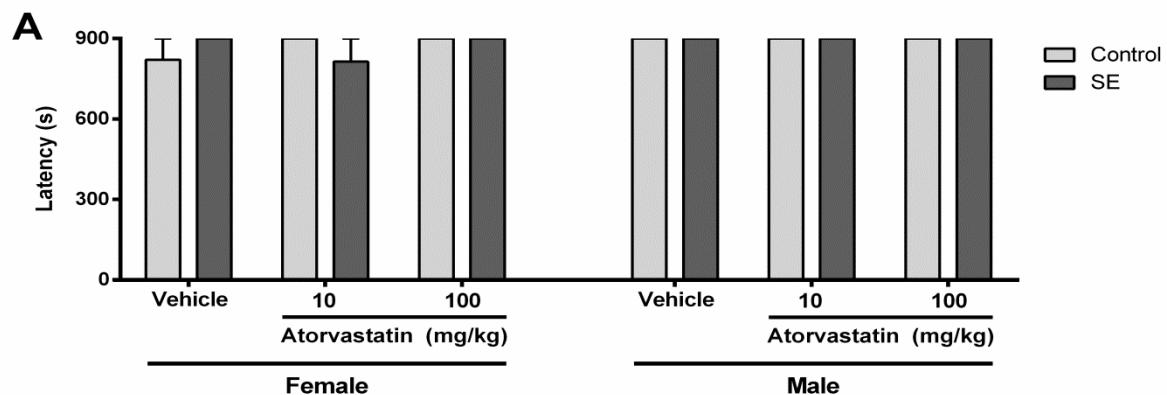


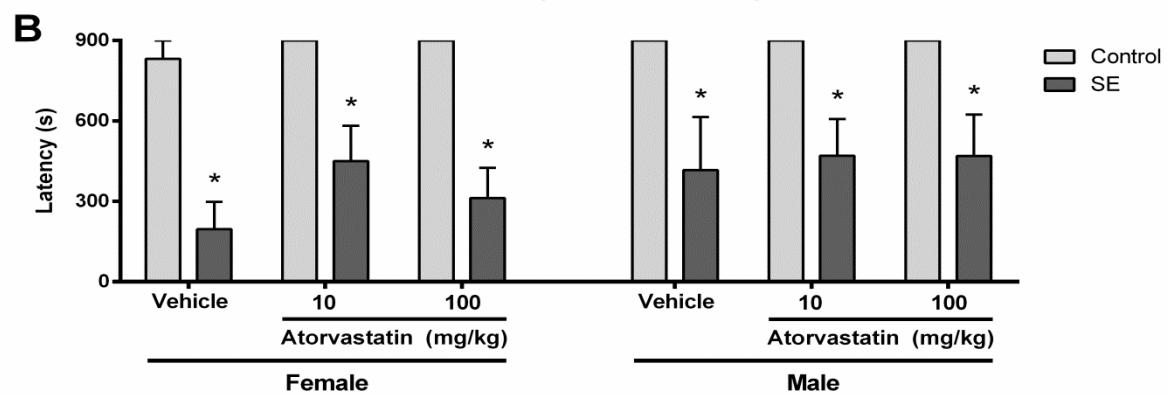
Figure 2: Effect of oral administration of increasing doses of atorvastatin (10 or 100 mg/kg; *ig*) on myoclonic jerks induced by low dose of PTZ (30 mg/kg; *ip*). Latency to myoclonic jerks (A) 7 days before, (B) 7 days after or (C) 14 days after the epileptogenic insult (pilocarpine-induced SE). Data are mean + SEM. The asterisk indicates a significant difference ($p<0.05$, two-way ANOVA) to the respective control group.

Tonic-clonic seizures

Baseline (7 days before SE)



Seizure susceptibility test #1 (7 days after SE)



Seizure susceptibility test #2 (14 days after SE)

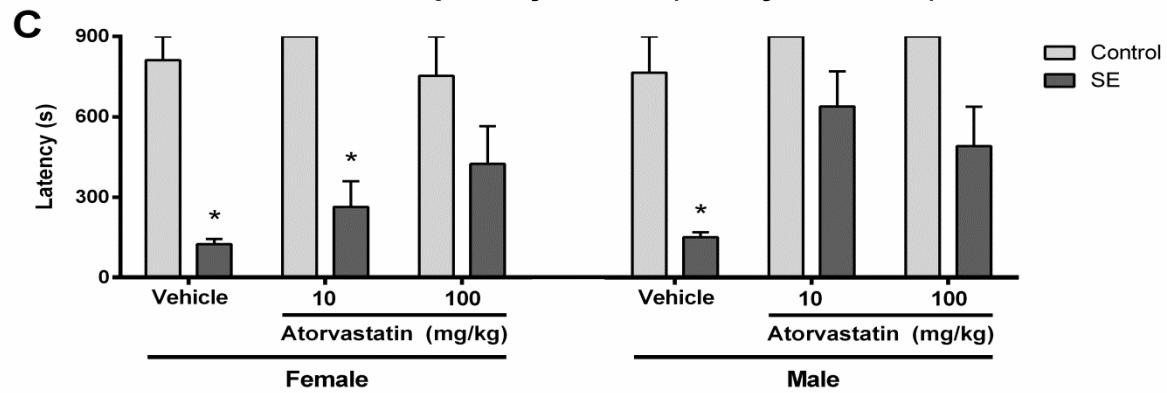


Figure 3: Effect of oral administration of increasing doses of atorvastatin (10 or 100 mg/kg; *ig*) on tonic-clonic seizures induced by low dose of PTZ (30 mg/kg; *ip*). Latency to tonic-clonic seizures (A) 7 days before, (B) 7 days after or (C) 14 days after the epileptogenic insult (pilocarpine-induced SE). Data are mean + SEM. The asterisk indicates a significant difference ($p<0.05$, two-way ANOVA) to the respective control group.

Giemsa staining

14 days after SE

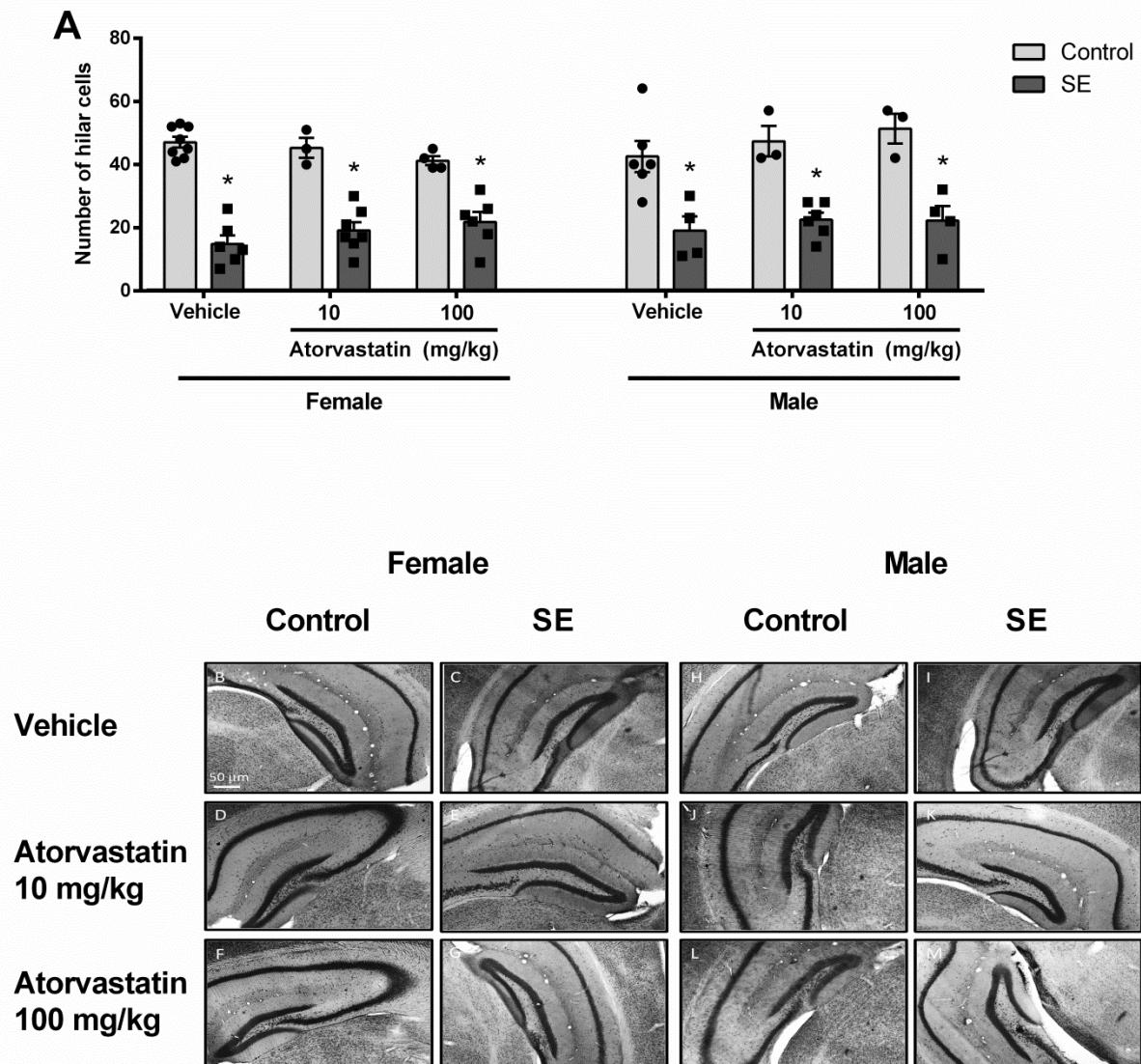


Figure 4: Effect of oral administration of increasing doses of atorvastatin (10 or 100 mg/kg; *ig*) on the number of hilar cells in the dentate gyrus (A). Data are mean + SEM. The asterisk indicates a significant difference ($p<0.05$, two-way ANOVA) to the respective control group. It is also shown representative images of the hippocampal formation of (B) vehicle-treated female control, (C) vehicle-treated female SE, (D) atorvastatin (10 mg/kg)-treated female control, (E) atorvastatin (10 mg/kg)-treated female SE, (F) atorvastatin (100 mg/kg)-treated female control, (G) atorvastatin (100 mg/kg)-treated female SE, (H) vehicle-treated male control, (I) vehicle-treated male SE, (J) atorvastatin (10 mg/kg)-treated male control, (K) atorvastatin (10 mg/kg)-treated male SE, (L) atorvastatin (100 mg/kg)-treated male control, (M) atorvastatin (100 mg/kg)-treated male SE. Calibration bar = 50 μ m.

Table 1: Data about animals used in the study

	Female	Male	P value ⁷
Number of animals used to SE induction ¹	60	58	NA
Mice with SE ²	30	36	0.20
Mice resistant to SE ³	11	12	0.82
Mortality during SE ⁴	19	10	0.088
Total mortality ⁵	24	24	1.00
Control animals ⁶	18	16	NA
Total	78	74	NA

¹: Number of animals submitted to pilocarpine injections

²: Number of animals that entered SE

³: Number of animals that did not enter in SE after 5 pilocarpine injections

⁴: Number of animals that died within the 60-min SE period

⁵: Number of animals that died in the 14-day follow-up

⁶: Number of animals submitted to NaCl 0.9% (pilocarpine vehicle) injections

⁷: Fisher's exact test

NA: not applicable

7 MANUSCRITO 2

Effect of Atorvastatin treatment on behavioral and cognitive alterations in mice submitted to SE induced by pilocarpine

Clarissa Vasconcelos de Oliveira^a, Jéssica Grigoletto^a, Julia Marion Canzian, Marta Maria Medeiros Frescura Duarte^c, Thiago Duarte^a, Ana Flávia Furian^{a,b}, Mauro Schneider Oliveira^{a,*}

^a Graduate Program in Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^b Graduate Program in Food and Science Technology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

^c Department of Health Sciences, Lutheran University of Brazil, Santa Maria, RS, Brazil.

*Corresponding author: Dr. Mauro Schneider Oliveira, Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Av. Roraima, nº 1000, Prédio 21, sala 5207 - CEP 97105-900, Santa Maria - RS, Brasil

E-mail: ms.oliveira@ufsm.br

Phone: 55 55 3220 9378

Abstract

Temporal lobe epilepsy (TLE) is the most frequent and medically refractory type of epilepsy in humans. In addition to seizures, patients with TLE suffer from behavioral alterations and cognitive deficits. Post-SE model of TLE induced by pilocarpine in rodents have enhanced the understanding of the processes leading to epilepsy and thus of potential targets for antiepileptogenic therapies. Clinical and experimental evidence suggests that inflammatory processes in the brain may critically contribute to epileptogenesis. So, the administration of anti-inflammatory drugs after a brain insult might be a promising strategy for antiepileptogenesis. Statins are inhibitors of cholesterol synthesis, and present pleiotropic effects that include anti-inflammatory properties. Thus, considering the key role of inflammation in epileptogenic process, we aimed the present study to test the hypothesis that atorvastatin prevent or reduce behavioral alterations in mice of both sexes with SE induce by pilocarpine. Male and female C57BL/6 mice were submitted to SE induced by pilocarpine. Following SE, treatment with atorvastatin (10 or 100mg/kg) started and the a battery of behavioral test was performed between days 7 and 13 post-SE. Treatment with atorvastatin displayed some positive effects on behavioral and cognitive performance of SE mice, indicating anxiolytic effect, especially in male mice. These differences appear to be related to inflammatory response developed in female and male mice after SE. Further studies are needed to determine the disease-modifying potential of atorvastatin in epilepsy.

Key words: epileptogenenesis, pilocarpine, gender, atorvastatin, behavior, inflammation

1. Introduction

Epilepsy is a brain disease in which affected individuals have an enduring predisposition to present unprovoked recurrent seizures (Fisher et al., 2014). With a worldwide prevalence of 0.5–1% in the general population (Goldenberg, 2010) and affecting at least 50 million people worldwide (Thurman et al., 2011), epilepsy is considered a major worldwide public health problem being one of the most frequent neurological condition (Schmidt and Sillanpää, 2012). In addition to seizures, behavioral comorbidities associated with epilepsy including anxiety, psychosis, depression, and cognitive deficits exist in many patients with epilepsy, worsening the quality of life of them (Boro and Haut, 2003, Seidenberg et al., 2009).

Temporal lobe epilepsy (TLE) is a common type of this disease, and it is often elicited by a brain insult which triggers a myriad of cellular and molecular changes that increase the chance of developing epilepsy (Engel, 2001). The period between the initial insult and the appearance of spontaneous seizures is called epileptogenesis, and may represent the best window of opportunity to modify the disease progression (Sloviter et al., 2012). One of the possible targets of epilepsy-preventing strategies is the inflammatory response that establishes in the brain after the initial epileptogenic injury (Löscher and Brandt, 2010). In fact, compelling evidence gathered in experimental and clinical studies have suggested that inflammatory mediators in the brain play a etiological role in epileptogenesis as well as in the accompanying comorbidities and neuropathology of epilepsy (Vezzani et al., 2015). Indeed, strategies aimed to reduce the levels of inflammatory cytokines and other mediators may constitute a potential tactic to achieve antiepileptogenic effects (Löscher and Brandt, 2010).

Atorvastatin is the leading drug of the class of statins, the first-line medications for treatment of hypercholesterolemia and prevention of associated cardiovascular burden (Collins et al., 2016). In addition, evidence of anti-inflammatory and neuroprotective effects of atorvastatin have been obtained in many experimental models of neurological diseases, including epilepsy, indicating that statins might be effective in the prevention of inflammation and neuronal death in the epileptic brain (Banach et al., 2014, Scicchitano et al., 2015). Moreover, atorvastatin also presented protective effects against behavioral comorbidities of epilepsy (Citraro et al., 2014). Therefore, considering the need for developing disease-modifying strategies for epileptogenesis, in the present study we investigated whether treatment with atorvastatin would improve inflammatory response and behavioral alterations during the epileptogenic period triggered by pilocarpine-induced *status epilepticus* (SE).

Given the importance of inclusion of both sexes in the preclinical research (Clayton and Collins, 2014), and the need to test new drugs to treat epilepsy in both sexes (Scharfman and MacLusky, 2014, Luef and Taubøll, 2015), the present study was performed in male and female mice.

2. Materials and methods

2.1. Animals

In the present study we used C57BL/6 mice (25-35g; 30-60 day-old) of both sexes. A total of 83 males and 82 females were used. They were kept under appropriated environmental conditions (12 h light-dark cycle, in a room temperature of 22 ± 1 °C). Standard rodent chow (Puro Lab 22 PB, Puro Trato) and filtered tap water were provided *ad libitum*. All experimental procedures were conducted in accordance with national and international legislation, and with the approval of the Ethics Committee for Animal Research of our University (Process #6165230415/2015). Every possible effort was made to limit animal's suffering as well as to keep their number to a minimum.

2.2. Pilocarpine-induced SE

Epileptogenesis was elicited by a single SE induced by pilocarpine, using a multiple low dose protocol as described previously (Gröticke et al., 2007). Because of the severe peripheral adverse cholinergic associated with pilocarpine mice received a previous injection of methylscopolamine (1 mg/kg *ip*; Sigma-Aldrich). After 30 min pilocarpine hydrochloride (Sigma-Aldrich) (100 mg/kg, *ip*, *Santisa*) was injected every 20 min until the onset of SE. The maximum number of pilocarpine injections per animal was 6. SE was stopped after 60 min with diazepam (10 mg/kg, *ip*, *Santisa*). Control animals were generated by administering age-matched mice with methylscopolamine and diazepam, but NaCl 0.9 % in place of pilocarpine. During the next 3 days after SE or control procedure all mice received special attention for welfare purposes. Special care included hand-offering of softened chow, offer of fresh fruits (apples and bananas) in their homecage and injections of Ringer-lactate solution containing 5% dextrose.

Complete data about animals used and SE induction performance are shown in Table 1.

2.3 Treatment with atorvastatin

Treatment with atorvastatin started 3 h after diazepam injection and was maintained for 14 consecutive days. Control and SE mice received daily doses of vehicle (NaCl 0.9%) or atorvastatin (10 or 100 mg/kg) by intragastric gavage. Atorvastatin solution was freshly prepared by dissolving commercial tablets (Lipitor®; Pfizer, SP, Brazil) to 1 or 10 mg/mL (Lee et al., 2008, Zaid et al., 2016) in NaCl 0.9 % and was administered at 10 ml/kg. The selection of atorvastatin dosing was based on previous studies (Funck et al., 2011) and on pilot studies.

2.4 Behavioral tests

A set of behavioral tests was employed to evaluate the effect of treatment with atorvastatin on behavioral comorbidities of epilepsy (Oliveira et al., 2015). Tests followed previously described protocols and were carried out in the following sequence: open-field (Oliveira et al., 2015), object recognition (Oliveira et al., 2015), rotarod (Oliveira et al., 2015), sucrose preference (Grigoletto et al., 2016) and forced swim (Oliveira et al., 2015). Behavioral testing occurred between days 7 and 13 after SE (please see Figure 1 for a timeline depicting the complete experimental design). Daily treatment with atorvastatin was done at the end of each day to avoid any direct acute interference of stain on behavior. Animals that died before completing all testing trials were excluded from all analyses.

2.5 Cytokine analysis

The content of IL-1 β , TNF- α , IL-6, INF- γ and IL-10, were determined in cerebral cortex and hippocampus at day 14 post SE. Brain tissue was homogenized in phosphate buffered saline (PBS 10 mM, pH 7.4) containing EDTA 1 mM and PMSF 0.1 mM. The homogenates were centrifuged at 11 r.p.m. for 10 minutes at 4°C. Protein content was measured in supernatant and adjusted for 1 mg/mL, bovine serum albumin (BSA, 0,5%) was added. The cytokine levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit for rodents, commercially provided by R&D Systems® (Minneapolis, MN, USA), in accordance with the manufacturer protocols, and the results are expressed in pg/mg of protein.

2.6 Statistical analyses

Data were analyzed by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls multiple comparisons test for *post hoc* analyses. A probability of P<0.05 was considered significant.

3. Results

3.1 Effect of Atorvastatin treatment on behavioral and cognitive parameters during epileptogenic period after SE induction.

3.1.1 Open Field

Mice submitted to SE treated with vehicle, independent of gender, presented increased latency to start the spontaneous exploration in open-field arena [$F(1,42)= 8.114$; $P= 0.0068$]. Male SE mice treated with atorvastatin 10 mg/kg also presented a higher latency to start de exploration in the arena when compared to their respective controls $F(1,42)= 8.114$; $P= 0.0355$. When compared to SE mice that received vehicle, SE mice of both genders treated with atorvastatin 100 mg/kg presented a decrease in this time ($P< 0.05$), while the dose of 10 mg/kg showed the same effect only in female SE mice [$F(1, 54) = 10.16$; $P= 0.0325$] (figure 2A and E). In addition, SE female mice treated with both doses of statin spent less time in the center of apparatus than their respective controls ($P= 0.0009$ and $P= 0.0004$, for dose of 10 and 100 mg/kg respectively), while no effect was observed in male mice ($P> 0.05$). Together, in control mice, atorvastatin 100 mg/kg increased the time in the center of arena in female mice [$F F(1,48)= 28.73$; $P= 0.0176$] (figure 2B and F).

Statistical analysis indicates interaction in crossing values [$F(2,42)= 6.30$; $P= 0.0040$]. SE male mice treated with atorvastatin 100 mg/kg, presented a higher number of crossings than male SE that received vehicle or atorvastatin 10 mg/kg ($P= 0.0002$), or than their controls ($P= 0.0002$). No difference in crossing number was observed in female mice (figure 2C and G).

Alterations in rearing responses were also observed in mice after brain insult. SE male treated with vehicle and SE female treated with statin at both doses, displayed reduced number of rearings than their respective controls. In addition, female controls treated with

atorvastatin at dose of 10 mg/kg displayed increased number of rearings than controls treated with vehicle [$F(1,54)= 24.67$; $P= 0.0116$] (figure 2D and H).

3.1.2 Object recognition

We found that SE female mice, regardless treatment, spent less time in object exploration during all three phases of test, than their respective controls ($P< 0.0001$). The same cognitive damage was observed in SE male mice, treatment with vehicle or atorvastatin 10 mg/kg ($P< 0.05$). On the other hand, SE male mice treated with atorvastatin 100 mg/kg, showed an increased recognition index 4 h after training (i.e. short-term memory) [$F(1,37)= 17.27$; $P< 0.05$] and 24 h after training (i.e. long-term memory) [$F(1,36)= 19.21$; $P< 0.05$], when compared to SE mice treated with vehicle or atorvastatin 10 mg/kg (figure 3).

3.1.3 Rotarod tests

No statistically significant differences were found between control and SE mice of both sexes in this test. In the same way, statin treatment not differ from vehicle (figure 4).

3.1.4 Forced swimming and taste preference tests

In the forced swim test we found that the SE male treated with vehicle or atorvastatin 10 mg/kg, but not the SE female mice, presented shorter immobility time than their respective controls [$F(1,42)= 13.79$; $P= 0.0118$] (figure 5A and C). On the other hand, no statistical difference was revealed in sucrose preference between the groups ($P> 0.05$) (figure 5B and D).

3.2 Effect of Atorvastatin treatment on inflammatory parameters 14 days after SE induction

Statistical analyses revealed that atorvastatin treatment down-regulated the levels of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α and INF- γ) in hippocampus and cerebral cortex of male and female mice submitted to SE. As observed in figures 6 - 9, this effect occurs in a dose-dependent manner, given that atorvastatin at dose of 100 mg/kg causes greater decrease when compared to dose of 10 mg/kg. In control mice of both sexes treated with statin, a decrease in levels of these cytokines was also observed (figures 6 - 7).

On the other hand, an increase in levels of anti-inflammatory cytokine IL-10 was observed, in hippocampus and cerebral cortex of female and male mice 14 days after brain insult induced by SE. A greater effect is also observed with the higher dose of statin 100

mg/kg, when compared to the dose of 10 mg/kg. Control mice treated with atorvastatin in both doses, also showed a higher level of IL-10 than the animals that received vehicle (figure 10).

An interesting finding in our results is that when male mice are directly compared to female mice, female generally presents a higher level of pro-inflammatory cytokines than male, while the levels of IL-10 in female are lower than in male mice, both in hippocampus and in the cerebral cortex, as shown in supplementary figures 1 and 2.

Discussion

TLE is the most frequent and medically refractory type of epilepsy in humans (Chang and Lowenstein 2003). In addition to seizures, many patients with TLE suffer from behavioral alterations, such as depression, anxiety, and psychosis, and impairment of learning and memory, which may be consequences of the morphologic and functional alterations in the temporal lobe associated with TLE (Marcangelo and Ovsiew, 2007).

Animal models of epileptogenesis have enhanced the understanding of the processes leading to epilepsy and thus of potential targets for antiepileptogenic therapies. In 2002, the National Institutes of Health/National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NIH/NINDS), recommended two groups of models as potentially useful tools for antiepileptogenic treatments discovery: kindling and post-SE models of TLE (Stables et al., 2003). In post-SE models of TLE induced by pilocarpine, rodents develop spontaneous recurrent partial and secondarily generalized seizures, hippocampal and extrahippocampal damage, and behavioral and cognitive alterations resembling the clinical characteristics of TLE (Morimoto et al., 2004).

Prophylactic drug treatment after a brain insult aims to the prevention of SRSs (spontaneous recurrent seizures). However, an alternative goal would be disease modification, which is defined as although a treatment may not prevent the occurrence of a disease, it may nevertheless modify the natural course of the disease. Disease-modifying effect of treatment after epileptogenic brain insults may affect the development of spontaneous seizures or prevents the progression of epilepsy. In addition, any beneficial effect on the neuronal damage developing after brain insults and the cognitive and behavioral disturbances associated with such damage would be desirable (Löscher and Brandt, 2010).

Experimental and clinical findings support that different types of brain insults, including SE, induce inflammatory processes in the brain that may critically contribute to epileptogenesis (Vezzani and Granata, 2005). So, because inflammation has been shown to be critically involved in the development of TLE, one potentially promising strategy for antiepileptogenesis is administration of anti-inflammatory drugs after a brain insult (Löscher and Brandt, 2010). In this sense, some drugs used clinically for other treatments also have the potential indication for inhibiting neuroinflammation, so in principle, deserve to be investigated for potential antiepileptogenic activity. One such class of drugs is the statins (Scicchitano et al., 2015).

Statins are the most commonly prescribed agents for the treatment of dyslipidemia (Wang et al., 2001), they inhibit HMG-CoA reductase, and thus block hepatic synthesis of cholesterol (Schachter, 2005). In addition to their cholesterol-lowering action, statins exhibit cholesterol-independent pleiotropic effects that include immunomodulatory, anti-inflammatory and anti-excitotoxic properties (Stüve et al., 2003, Schachter, 2005, van der Most et al., 2009, Ling and Tejada-Simon, 2016). Numerous studies reported in the literature have demonstrated the neuroprotective action of statins in several neuropathological conditions including epilepsy (Banach et al., 2014, Scicchitano et al., 2015).

In our study we decided to test the atorvastatin, the best selling prescription drug ever in the world (Ray et al., 2010) and the best studied statin in epilepsy models (Scicchitano et al., 2015). Several studies have showed that atorvastatin presents anticonvulsant effects in chemical kainic acid (KA)-induced seizures (Lee et al., 2008), efficacy in pentylenetetrazole (PTZ)-induced seizures (Funck et al., 2011), against audiogenic seizures in DBA/2 mice (Russo et al., 2013), and decrease spontaneous spike-wave discharge (SWD) seizures in WAG/Rij rats (Citraro et al., 2014). Moreover, previous study have showed that use of statins appeared to be associated with reduced risk of anxiety and depression, hostility (Young-Xu et al., 2003) and dementia (Jick et al., 2000). However, no study tested the effect of this statin on behavioral changes and inflammatory parameters during epileptogenic period in pilocarpine post-SE model of TLE.

In the open-field test, a test widely used to monitor locomotion, exploration, anxiety, and risk assessment in response to a novel environment (Rubin et al., 2004), we found that SE mice of both sexes and treatments, displayed differences during the open field test, when compared to their respective controls. Female SE mice treated with atorvastatin, in both doses, spent less time in the center of the arena, which is an indicative of increased anxiety or

stereotypic, impulsive behavior (Müller et al., 2009). However, female control treated with atorvastatin 100 mg/kg, spent more time in the center of the arena than female control that received vehicle, suggesting that statin have an anxiolytic effect, which is however, not retained in this animal model (Citraro et al., 2014). Similar results were also observed in the number of rearing responses, where control female that received statin 10 mg/kg, showed more rearings responses than those that received vehicle, while SE female mice treated with the statin in both doses, presented less rearings than their respective controls, which is another indicative of increased anxiety caused by brain insult and not counteracted by atorvastatin at this protocol. In male mice the anxiety-like behavior seems to be less pronounced, given that no difference occurs in the time spent in the center of open field.

In addition, in our results we have seen that SE mice of both sexes treated with vehicle presented higher latency to start the spontaneous exploration in the open field arena when compared to their respective controls. Given that, a lower propensity for exploration is correlated with a higher level of anxiety (Palanza, 2001), our results indicate an increased anxiety-like behavior in SE mice that received vehicle. In contrast, male SE mice treated with atorvastatin 100 mg/Kg, and female SE mice treated with atorvastatin 10 or 100 mg/kg, presented lower latency to spontaneous exploration than their respective controls, again indicating an anxiolytic-like behavior of atorvastatin. Thus, we can say that anxiogenic effect observed in open field test in SE mice of both sexes can be attributed to the epileptogenic process, and that atorvastatin treatment at these doses and this stage of epileptogenesis is not able to completely deflect this anxiety-like behavior.

Statins have been reported for their improvement in the motor behavior in various neurodegenerative diseases such as Huntington's disease and Parkinson's disease (Patassini et al., 2008, van der Most et al., 2009, Ling and Tejada-Simon, 2016). In rotarod test, we found that SE mice of both sexes and from all treatments appear not display deficits in fine motor coordination at this stage of epileptogenic process. These findings are in accordance with our previous study using epileptic mice, in which mice did not show any impairment in the rotarod test (Oliveira et al., 2015), and atorvastatin *per se* seems not alter the motor coordination here evaluated (Kalonja et al., 2011)

Spontaneous locomotor activity was evaluated in open field test. Again, the motor activity in SE female mice, regardless treatment, as well in SE male mice treated with vehicle or atorvastatin 10 mg/kg, appear not differ from controls. These findings agree with previous study that also found no alterations in locomotor activity of rodents submitted to the

pilocarpine model of TLE (Gröticode et al., 2007). However, SE male mice treated with atorvastatin 100 mg/kg present a higher number of crossing than their respective controls and than SE male mice treated with vehicle or atorvastatin 10 mg/kg, which indicate an improvement in locomotion. The literature demonstrates the administration of atorvastatin (0.1, 1 or 10 mg/kg) for 1 week did not affect the number of crossings in the open field test in Swiss albino mice (Vandresen-Filho et al., 2015). However, 1 week of atorvastatin treatment (20 mg/kg) improved the deficit promoted by stroke in the locomotors patterns, and atorvastatin per se did not cause any changes in open field test (Gaur and Kumar, 2011). Thus, the behavioral responses to statin treatment depend on time of treatment employed, as well as the dose used.

Depression is another important condition commonly associated with epilepsy, and impacts profoundly negatively the quality of life of patients with epilepsy (Mazarati et al., 2008). Anhedonia, defined as decreased ability to experience pleasure, is a strong symptom of human depression, used as diagnostic feature of a major depressive disorder, and predictor of antidepressant efficacy (Keedwell et al., 2005). In the present study we found that the SE mice, regardless of gender and treatment, presented no difference in sucrose preference when compared to control mice, suggesting that during epileptogenic period, the SE induced by pilocarpine not leads to development of anhedonic behavior.

The forced swimming test is widely used as a preclinical procedure to identify compounds with antidepressant activity (Cryan et al., 2005), since all antidepressants decrease the immobility time in this test without alteration in the locomotor activity. However, it is well established that the reduced immobility of the epileptic mice is a result of a problem in understanding the context (or situation) (Gröticode et al., 2007), in other words, whereas a normal mice rapidly learn to cope with the inescapable stress by developing immobility in these tests, the epileptic mice seem not understand that they cannot escape and therefore continue to struggle (Gröticode et al., 2007). In our study, SE male mice in which was administered vehicle, presented a lower immobility time than their controls, which are in agreement with previous study that also found a decrease in the immobility time of mice during epileptogenic period after SE induced by pilocarpine (Lopes et al., 2016). Antidepressant-like effect of atorvastatin have been showed in mice (Ludka et al., 2013, Shahsavarian et al., 2014), as well as WAG/Rij rats a model of absence epilepsy (Citraro et al., 2014). However, in our study atorvastatin 10 mg/kg, seems not revert the depressant-like behavior triggered by pilocarpine induced SE, i.e. SE male mice appears not to understand

that they cannot escape and therefore continue to effort. While otherwise, the results at dose 100 mg/kg, make us suggests that atorvastatin improves the capacity of understanding the context. In agreement to this, it has been showed that statins exerce positive effects on memory and learning deficits in many animal models(Parle and Singh, 2007).

Clinical and experimental evidence suggests that some inflammatory processes within the CNS (central nervous system) may either contribute to or be a consequence of epileptogenesis (Vezzani et al., 2013). As related by Vezzani and colleagues, SE induced experimentally in rodents triggers an inflammatory response in brain areas recruited in the onset and propagation of epileptic activity (Vezzani and Granata, 2005). The present study evidence the anti-inflammatory effect of atorvastatin treatment in SE mice, of both genders, during epileptogenesis. Our results shown that treatment with atorvastatin reduced significantly the levels of pro-inflammatory cytokynes IL-1 β , TNF- α , INF- γ and IL-6, in hippocampus and cerebral cortex, of mice submitted to SE and controls mice. Moreover, an increase in levels of anti-inflammatory citokine IL-10, was found in animals controls and SE, treated with atorvastatin. In addition, the anti-inflammatory effect of atorvastatin seems to be dose-dependent, given that the levels of some inflammatory cytokines are reduced in higher proportion at dose of 100 mg/kg than at 10 mg/kg. Thus, we suggest that the observed effects of atorvastatin on behavior alterations in female and male mice with SE induced by pilocarpine could be due to a decrease in levels of pro-inflammatory cytokine. Which is in agreement with previous study in which statins decreased levels of inflammatory mediators in kainate-induced SE (Lee et al., 2008).

Neuroinflammatory diseases are more prevalent in females than males (Pitkänen et al., 2014), and there is some indication that sex also affects the type and severity of a CNS inflammatory response afterepileptogenic brain insult, such as stroke or traumatic brain injury (Bruce-Keller et al., 2007, Pitkänen et al., 2014).Despite the many studies that have been tested antiepileptogenic therapies that target the immune/inflammatory response, none ofthe studies compared the effect of these drugs between males and females (Pitkänen et al., 2014). Thus, to the best of our knowledge we are the first group to test the effects of atorvastatin treatment as an antiepileptogenic therapy in both sexes. Interestingly, our statistical analysis revealed that female mice, presented a higher level of pro-inflammatory cytokines and a lower level of IL-10 than male mice, which make us suggests that in model of TLE pilocarpine-induced the inflammatory process is more pronounced in female than male. These sex-dependent differences apparently relate to immunological changes, neuronal network

organization, and to circulating levels of steroid hormones that can regulate both peripheral and central nervous system inflammation (Pitkänen et al., 2014, Reddy, 2017). Therefore, sex differences in such factors that control inflammation could likely contribute to sex based differences in the incidence of epilepsy and in its consequences (Reddy, 2017), as in behavioral alterations after brain insult, which can reflect on atorvastatin effects.

Conclusion

In the present study atorvastatin treatment during epileptogenesis in the model of TLE induced by pilocarpine displayed some positive effects on animal cognition after SE. The observed effects might be considered as the result of their pleiotropic effects, especially due to anti-inflammatory properties. Female mice present higher inflammatory response than male mice, even when with the same dose of atorvastatin. Which reflected in the effect of atorvastatin on cognitive parameters, that are more pronounced in male than female. These results reinforce the importance of developing preclinical studies in animals of both sexes.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the student fellowships from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) (to C.V.O., J.G., T.D.), A.F.F., J.M.C. and M.S.O. are grantees of CNPq research productivity fellowships.

Conflict of Interest statement

The authors declare no conflict of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

Funding sources

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

References

- Banach M, Czuczwarc SJ, Borowicz KK (2014) Statins - are they anticonvulsant? *Pharmacol Rep* 66:521-528.
- Boro A, Haut S (2003) Medical comorbidities in the treatment of epilepsy. *Epilepsy Behav* 4 Suppl 2:S2-12.

- Bruce-Keller AJ, Dimayuga FO, Reed JL, Wang C, Angers R, Wilson ME, Dimayuga VM, Scheff SW (2007) Gender and Estrogen Manipulation Do Not Affect Traumatic Brain Injury in Mice. *Journal of Neurotrauma* 24:203-215.
- Chang BS, Lowenstein DH (2003) Epilepsy. *New England Journal of Medicine* 349:1257-1266.
- Citraro R, Chimirri S, Aiello R, Gallelli L, Trimboli F, Britti D, De Sarro G, Russo E (2014) Protective effects of some statins on epileptogenesis and depressive-like behavior in WAG/Rij rats, a genetic animal model of absence epilepsy. *Epilepsia* 55:1284-1291.
- Clayton JA, Collins FS (2014) Policy: NIH to balance sex in cell and animal studies. *Nature* 509:282-283.
- Collins R, Reith C, Emberson J, Armitage J, Baigent C, Blackwell L, Blumenthal R, Danesh J, Smith GD, DeMets D, Evans S, Law M, MacMahon S, Martin S, Neal B, Poulter N, Preiss D, Ridker P, Roberts I, Rodgers A, Sandercock P, Schulz K, Sever P, Simes J, Smeeth L, Wald N, Yusuf S, Peto R (2016) Interpretation of the evidence for the efficacy and safety of statin therapy. *Lancet* 388:2532-2561.
- Cryan JF, Mombereau C, Vassout A (2005) The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neurosci Biobehav Rev* 29:571-625.
- Engel J (2001) Mesial temporal lobe epilepsy: what have we learned? *Neuroscientist* 7:340-352.
- Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, Engel J, Forsgren L, French JA, Glynn M, Hesdorffer DC, Lee BI, Mathern GW, Moshé SL, Perucca E, Scheffer IE, Tomson T, Watanabe M, Wiebe S (2014) ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* 55:475-482.
- Funck VR, de Oliveira CV, Pereira LM, Rambo LM, Ribeiro LR, Royes LF, Ferreira J, Guerra GP, Furian AF, Oliveira MS, Mallmann CA, de Mello CF (2011) Differential effects of atorvastatin treatment and withdrawal on pentylenetetrazol-induced seizures. *Epilepsia* 52:2094-2104.
- Gaur V, Kumar A (2011) Neuroprotective potentials of candesartan, atorvastatin and their combination against stroke induced motor dysfunction. *Inflammopharmacology* 19:205-214.
- Goldenberg MM (2010) Overview of Drugs Used For Epilepsy and Seizures: Etiology, Diagnosis, and Treatment. *Pharmacy and Therapeutics* 35:392-415.
- Grigoletto J, Oliveira CVd, Graunke ACB, Souza TLD, Souto NS, Freitas MLd, Furian AF, Santos ARS, Oliveira MS (2016) Rosmarinic acid is anticonvulsant against seizures induced by pentylenetetrazol and pilocarpine in mice. *Epilepsy & Behavior* 62:27-34.
- Gröticode I, Hoffmann K, Löscher W (2007) Behavioral alterations in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in mice. *Exp Neurol* 207:329-349.
- Jick H, Zornberg GL, Jick SS, Seshadri S, Drachman DA (2000) Statins and the risk of dementia. *The Lancet* 356:1627-1631.
- Kalonia H, Kumar P, Kumar A (2011) Comparative neuroprotective profile of statins in quinolinic acid induced neurotoxicity in rats. *Behavioural Brain Research* 216:220-228.
- Keedwell PA, Andrew C, Williams SC, Brammer MJ, Phillips ML (2005) The neural correlates of anhedonia in major depressive disorder. *Biol Psychiatry* 58:843-853.
- Lee JK, Won JS, Singh AK, Singh I (2008) Statin inhibits kainic acid-induced seizure and associated inflammation and hippocampal cell death. *Neurosci Lett* 440:260-264.
- Ling Q, Tejada-Simon MV (2016) Statins and the brain: New perspective for old drugs. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 66:80-86.

- Lopes MW, Lopes SC, Santos DB, Costa AP, Gonçalves FM, de Mello N, Prediger RD, Farina M, Walz R, Leal RB (2016) Time course evaluation of behavioral impairments in the pilocarpine model of epilepsy. *Epilepsy & Behavior* 55:92-100.
- Löscher W, Brandt C (2010) Prevention or modification of epileptogenesis after brain insults: experimental approaches and translational research. *Pharmacol Rev* 62:668-700.
- Ludka FK, Zomkowski ADE, Cunha MP, Dal-Cim T, Zeni ALB, Rodrigues ALS, Tasca CI (2013) Acute atorvastatin treatment exerts antidepressant-like effect in mice via the l-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway and increases BDNF levels. *European Neuropsychopharmacology* 23:400-412.
- Luef G, Taubøll E (2015) Gender issues in epilepsy--Difference in management of epilepsy. *Seizure* 28:1-2.
- Marcangelo MJ, Ovsiew F (2007) Psychiatric aspects of epilepsy. *Psychiatr Clin North Am* 30:781-802.
- Mazarati A, Siddarth P, Baldwin RA, Shin D, Caplan R, Sankar R (2008) Depression after status epilepticus: behavioural and biochemical deficits and effects of fluoxetine. *Brain* 131:2071-2083.
- Morimoto K, Fahnestock M, Racine RJ (2004) Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. *Prog Neurobiol* 73:1-60.
- Müller CJ, Gröticke I, Bankstahl M, Löscher W (2009) Behavioral and cognitive alterations, spontaneous seizures, and neuropathology developing after a pilocarpine-induced status epilepticus in C57BL/6 mice. *Exp Neurol* 219:284-297.
- Oliveira CV, Grigoletto J, Funck VR, Ribeiro LR, Royes LF, Fighera MR, Furian AF, Oliveira MS (2015) Evaluation of potential gender-related differences in behavioral and cognitive alterations following pilocarpine-induced status epilepticus in C57BL/6 mice. *Physiol Behav* 143:142-150.
- Palanza P (2001) Animal models of anxiety and depression: how are females different? *Neurosci Biobehav Rev* 25:219-233.
- Parle M, Singh N (2007) Reversal of Memory Deficits by Atorvastatin and Simvastatin in Rats. *YAKUGAKU ZASSHI* 127:1125-1137.
- Patassini S, Giampà C, Martorana A, Bernardi G, Fusco FR (2008) Effects of simvastatin on neuroprotection and modulation of Bcl-2 and BAX in the rat quinolinic acid model of Huntington's disease. *Neuroscience letters* 448:166-169.
- Pitkänen A, Huusko N, Ndode-Ekane XE, Kyyriäinen J, Lipponen A, Lipsanen A, Sierra A, Bolkvadze T (2014) Gender issues in antiepileptic treatments. *Neurobiol Dis* 72 Pt B:224-232.
- Ray KK, Seshasai SR, Erqou S, Sever P, Jukema JW, Ford I, Sattar N (2010) Statins and all-cause mortality in high-risk primary prevention: a meta-analysis of 11 randomized controlled trials involving 65,229 participants. *Arch Intern Med* 170:1024-1031.
- Reddy DS (2017) The neuroendocrine basis of sex differences in epilepsy. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 152:97-104.
- Rubin MA, Berlese DB, Stiegemeier JA, Volkweis MA, Oliveira DM, dos Santos TL, Fenili AC, Mello CF (2004) Intra-amygda administration of polyamines modulates fear conditioning in rats. *J Neurosci* 24:2328-2334.
- Russo E, Donato di Paola E, Gareri P, Siniscalchi A, Labate A, Gallelli L, Citraro R, De Sarro G (2013) Pharmacodynamic potentiation of antiepileptic drugs' effects by some HMG-CoA reductase inhibitors against audiogenic seizures in DBA/2 mice. *Pharmacol Res* 70:1-12.
- Schachter M (2005) Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 19:117-125.

- Scharfman HE, MacLusky NJ (2014) Sex differences in the neurobiology of epilepsy: a preclinical perspective. *Neurobiol Dis* 72 Pt B:180-192.
- Schmidt D, Sillanpää M (2012) Evidence-based review on the natural history of the epilepsies. *Curr Opin Neurol* 25:159-163.
- Scicchitano F, Constanti A, Citraro R, Sarro GD, Russo E (2015) Statins and epilepsy: preclinical studies, clinical trials and statin-anticonvulsant drug interactions. *Current Drug Targets* 16:747-756.
- Seidenberg M, Pulsipher DT, Hermann B (2009) Association of epilepsy and comorbid conditions. *Future Neurol* 4:663-668.
- Shahsavarian A, Javadi S, Jahanabadi S, Khoshnoodi M, Shamsaei J, Shafaroodi H, Mehr SE, Dehpour A (2014) Antidepressant-like effect of atorvastatin in the forced swimming test in mice: The role of PPAR-gamma receptor and nitric oxide pathway. *European Journal of Pharmacology* 745:52-58.
- Sloviter RS, Bumanglag AV, Schwarcz R, Frotscher M (2012) Abnormal dentate gyrus network circuitry in temporal lobe epilepsy. In: Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies [Internet] 4th edition(Noebels JL, A. M., Rogawski MA, et al., editors., ed) Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US)
- Stables JP, Bertram E, Dudek FE, Holmes G, Mathern G, Pitkanen A, White HS (2003) Therapy Discovery for Pharmacoresistant Epilepsy and for Disease-modifying Therapeutics: Summary of the NIH/NINDS/AES Models II Workshop. *Epilepsia* 44:1472-1478.
- Stüve O, Youssef S, Steinman L, Zamvil SS (2003) Statins as potential therapeutic agents in neuroinflammatory disorders. *Curr Opin Neurol* 16:393-401.
- Thurman DJ, Beghi E, Begley CE, Berg AT, Buchhalter JR, Ding D, Hesdorffer DC, Hauser WA, Kazis L, Kobau R, Kroner B, Labiner D, Liow K, Logroscino G, Medina MT, Newton CR, Parko K, Paschal A, Preux PM, Sander JW, Selassie A, Theodore W, Tomson T, Wiebe S, Epidemiology ICo (2011) Standards for epidemiologic studies and surveillance of epilepsy. *Epilepsia* 52 Suppl 7:2-26.
- van der Most PJ, Dolga AM, Nijholt IM, Luiten PG, Eisel UL (2009) Statins: mechanisms of neuroprotection. *Prog Neurobiol* 88:64-75.
- Vandresen-Filho S, França LM, Alcantara-Junior J, Nogueira LC, de Brito TM, Lopes L, Junior FM, Vanzeler ML, Bertoldo DB, Dias PG, Colla ARS, Hoeller A, Duzzioni M, Rodrigues ALS, de Lima TCM, Tasca CI, Viola GG (2015) Statins enhance cognitive performance in object location test in albino Swiss mice: Involvement of beta-adrenoceptors. *Physiology & Behavior* 143:27-34.
- Vezzani A, Friedman A, Dingledine RJ (2013) The role of inflammation in epileptogenesis. *Neuropharmacology* 69:16-24.
- Vezzani A, Granata T (2005) Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence. *Epilepsia* 46:1724-1743.
- Vezzani A, Lang B, Aronica E (2015) Immunity and Inflammation in Epilepsy. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 6:a022699.
- Wang TJ, Stafford RS, Ausiello JC, Chaisson CE (2001) Randomized clinical trials and recent patterns in the use of statins. *American Heart Journal* 141:957-963.
- Young-Xu Y, Chan KA, Liao JK, Ravid S, Blatt CM (2003) Long-term statin use and psychological well-being. *Journal of the American College of Cardiology* 42:690-697.
- Zaid AN, Assali M, Zalmout S, Basheer A (2016) Compounding and stability evaluation of atorvastatin extemporaneous oral suspension using tablets or pure powder. *European Journal of Hospital Pharmacy*.

Figures

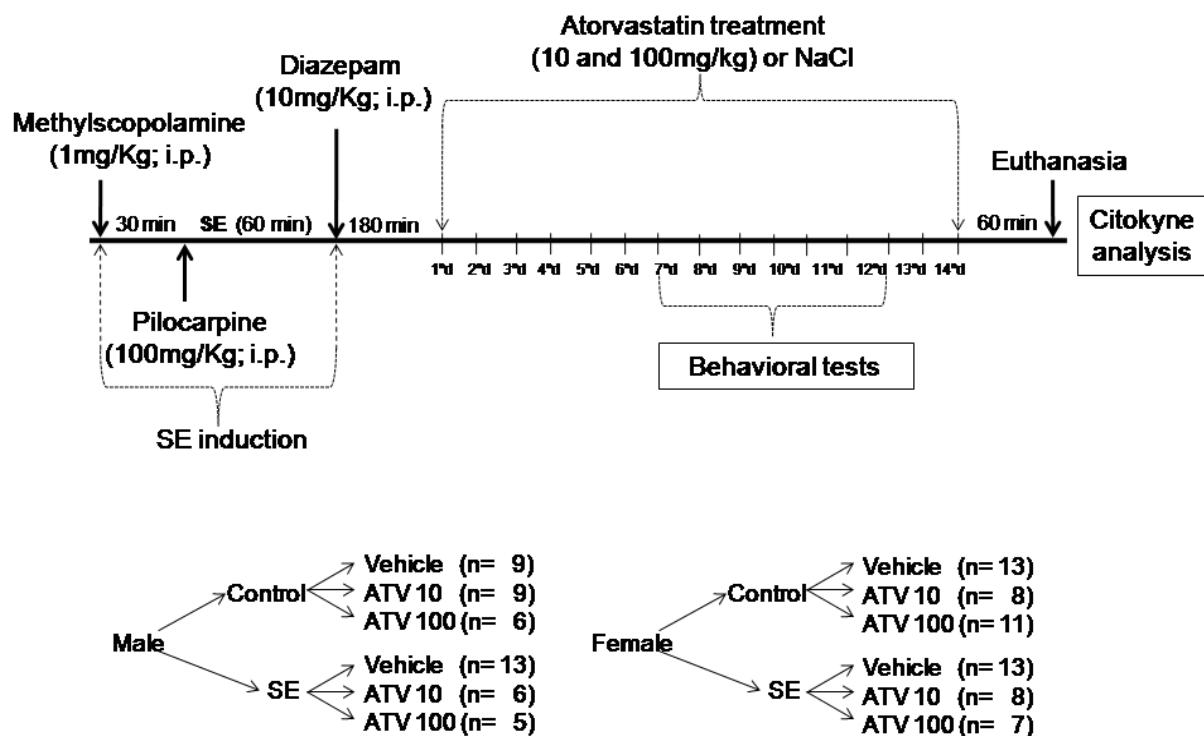


Figure 1: Schematic illustration of the experimental protocol used in this study. Numbers in parentheses indicate the number of animals in each experimental group.

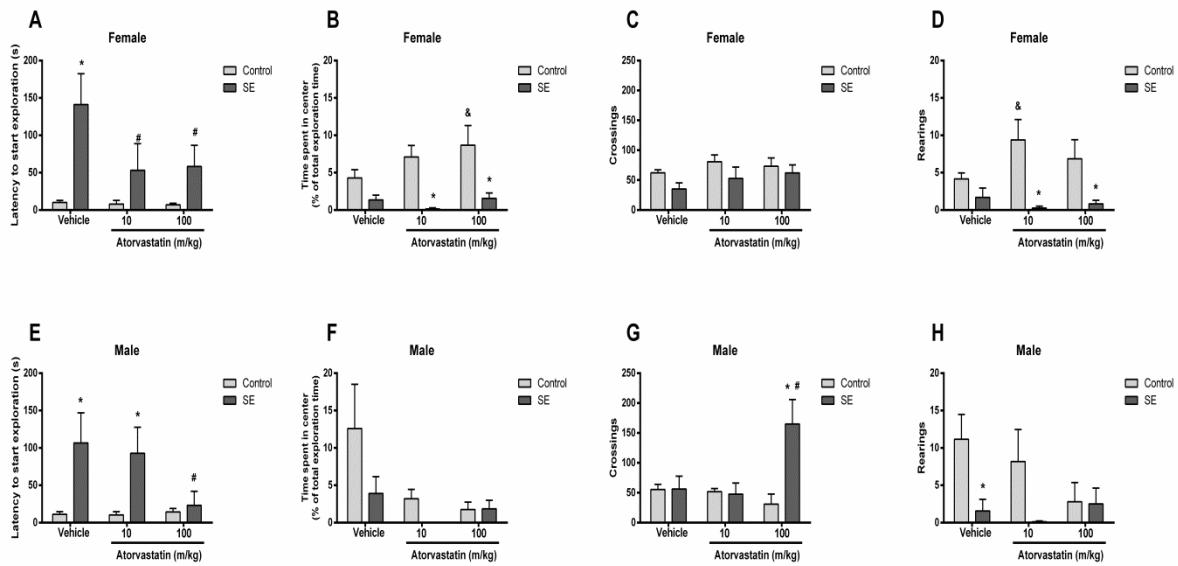


Figure 2: Effect of oral administration of increasing doses of atorvastatin (10 or 100 mg/kg; i.g.) on mice behavior in the open-field test during epileptogenic period after SE induction. (A and E) Latency to start exploration, (B and F) time spent in the center of the arena, (C and G) number of crossings and (D and H) number of rearing responses. Data are mean and SEM for n = 5-13 per group. *Indicates a statistically significant difference between post-SE mice and respective age-matched controls ($P < 0.05$). #Indicates a statistically significant difference between post-SE mice treated with vehicle or atorvastatin ($P < 0.05$). &Indicates a statistically significant difference between control mice treated with vehicle or atorvastatin ($P < 0.05$).

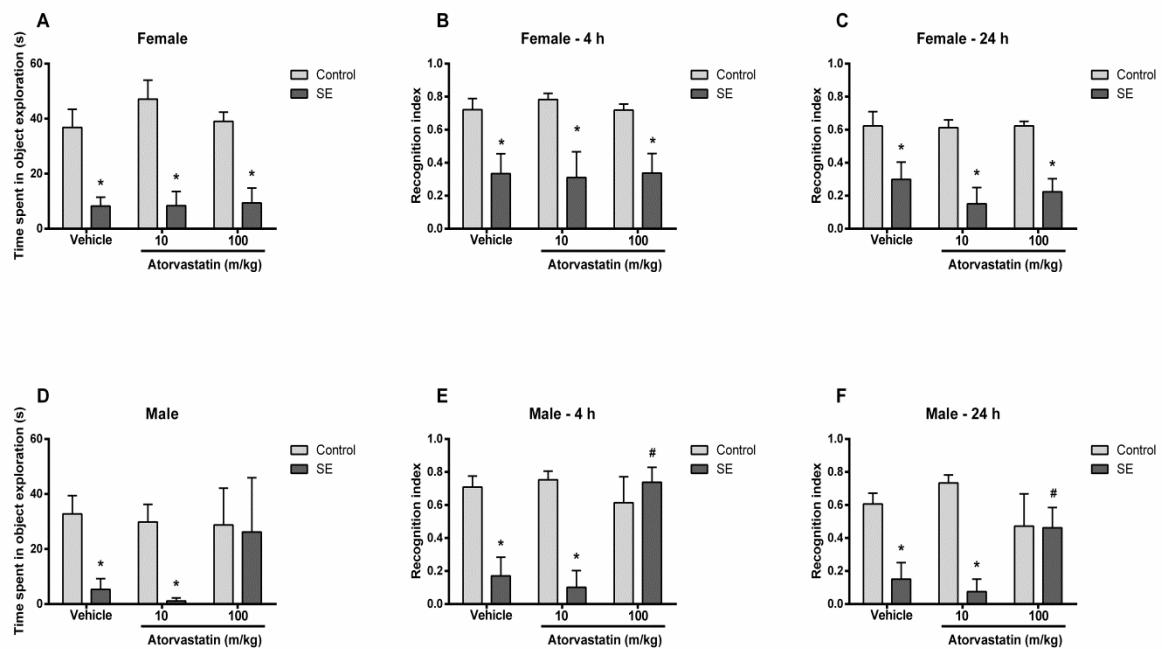


Figure 3: Effect of oral administration of increasing doses of atorvastatin (10 or 100 mg/kg; i.g.) on mice behavior in the object recognition test during epileptogenic period after SE induction. Time spent in object exploration during training (A and D) and object recognition index at (B and E) 4 or (C and F) 24 h after training (short and long memory, respectively). Data are mean and SEM for n = 5-13 per group. *Indicates a statistically significant difference between post-SE mice and respective age-matched controls ($P < 0.05$). #Indicates a statistically significant difference between post-SE mice treated with vehicle or atorvastatin ($P < 0.05$).

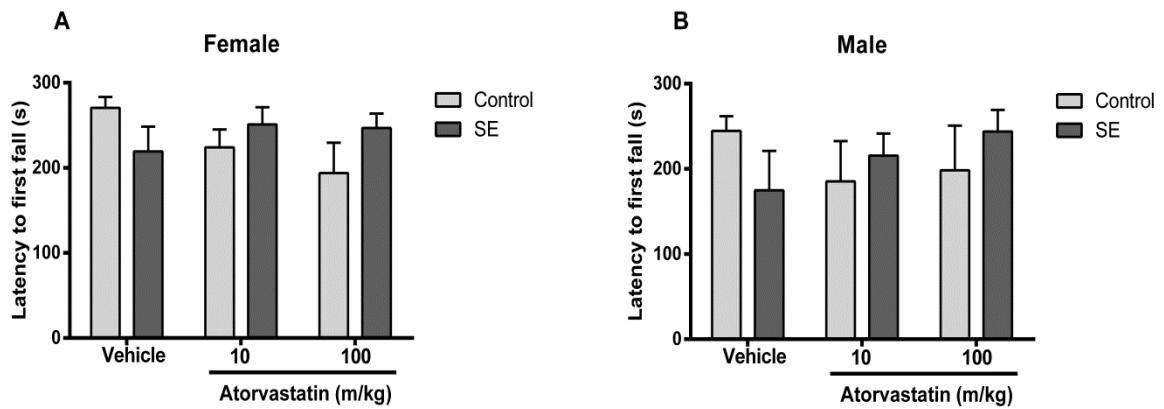


Figure 4: Effect of oral administration of increasing doses of atorvastatin (10 or 100 mg/kg; i.g.) on mice behavior in the rotarod test during epileptogenic period after SE induction. (A and B) Latency to the first fall. Data are mean and SEM for n = 5-13 per group. #Indicates a statistically significant difference between post-SE mice treated with vehicle or atorvastatin ($P < 0.05$).

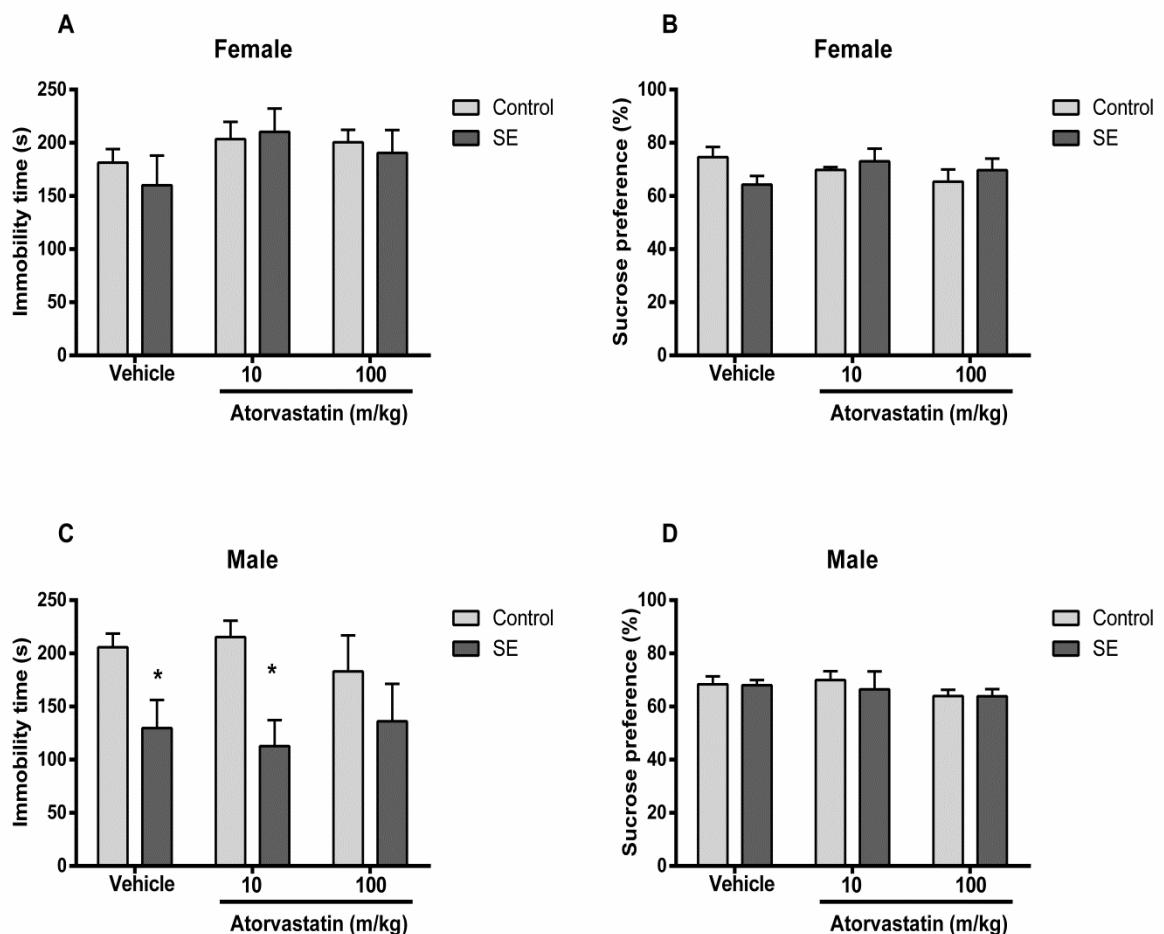


Figure 5: Effect of oral administration of increasing doses of atorvastatin (10 or 100 mg/kg; i.g.) on mice behavior in the forced swimming and taste preference tests during epileptogenic period after SE induction. (A and C) Immobility time and (B and D) sucrose preference Data are mean and SEM for n = 5-13 per group. *Indicates a statistically significant difference between post-SE mice and respective age-matched controls ($P < 0.05$).

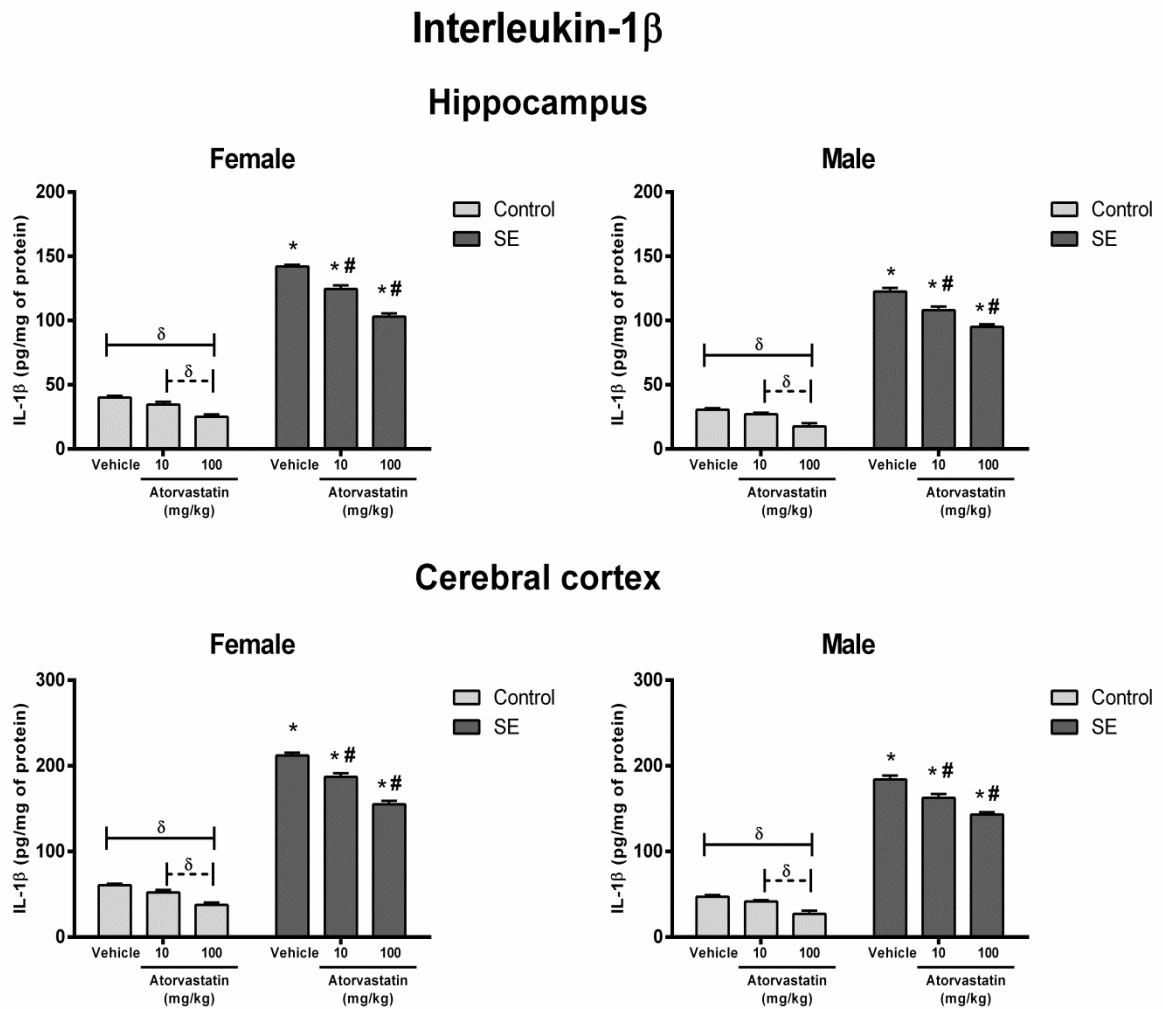


Figure 6: Effect of oral administration of increasing doses of atorvastatin (10 or 100 mg/kg; i.g.) on IL-1 β levels in hippocampus and cerebral cortex of female and male mice during epileptogenic period after SE induction. Data are mean and SEM for n = 4 per group. *Indicates a statistically significant difference between post-SE mice and respective age-matched controls ($P < 0.05$). #Indicates a statistically significant difference between post-SE mice treated with vehicle or atorvastatin ($P < 0.05$). &Indicates a statistically significant difference between control mice treated with vehicle or atorvastatin ($P < 0.05$).

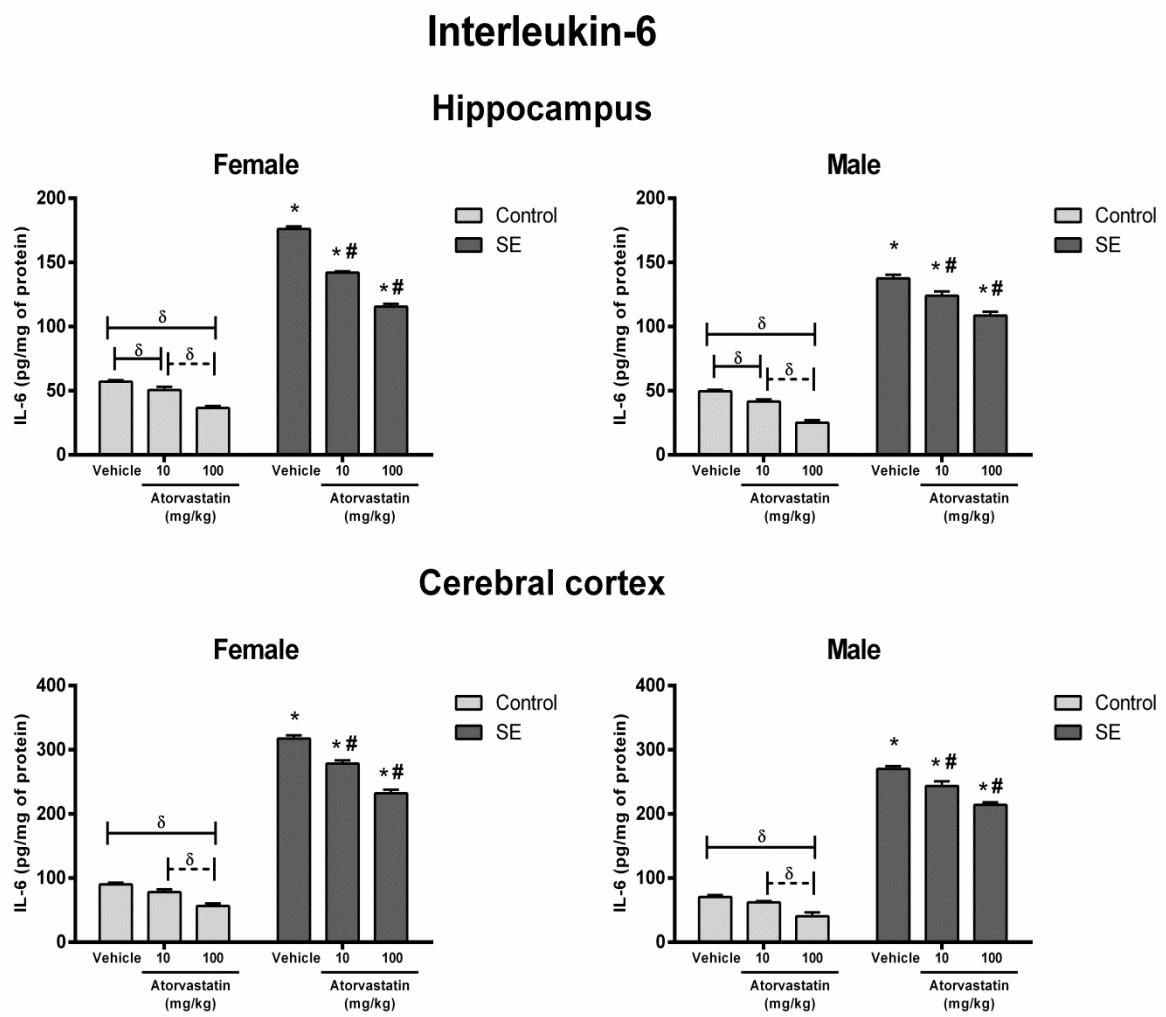
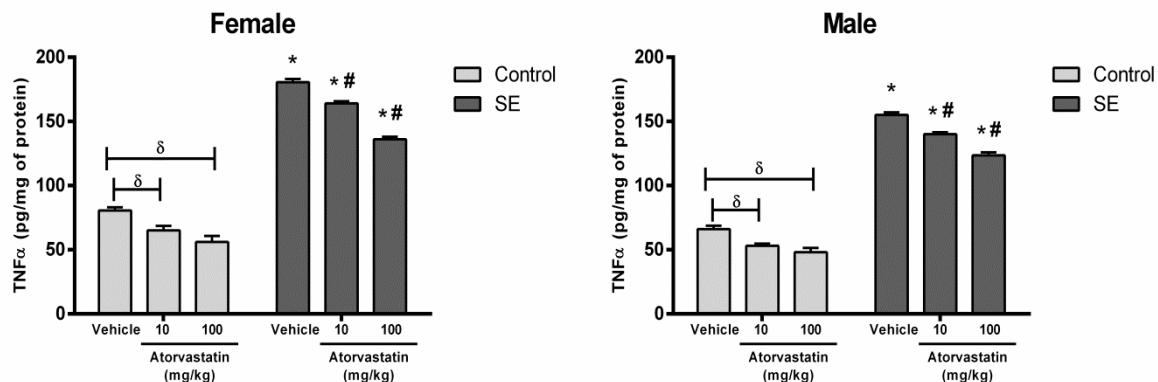


Figure 7: Effect of oral administration of increasing doses of atorvastatin (10 or 100 mg/kg; i.g.) on IL-6 levels in hippocampus and cerebral cortex of female and male mice during epileptogenic period after SE induction. Data are mean and SEM for $n = 4$ per group. *Indicates a statistically significant difference between post-SE mice and respective age-matched controls ($P < 0.05$). #Indicates a statistically significant difference between post-SE mice treated with vehicle or atorvastatin ($P < 0.05$). &Indicates a statistically significant difference between control mice treated with vehicle or atorvastatin ($P < 0.05$).

Tumor necrosis factor- α

Hippocampus



Cerebral cortex

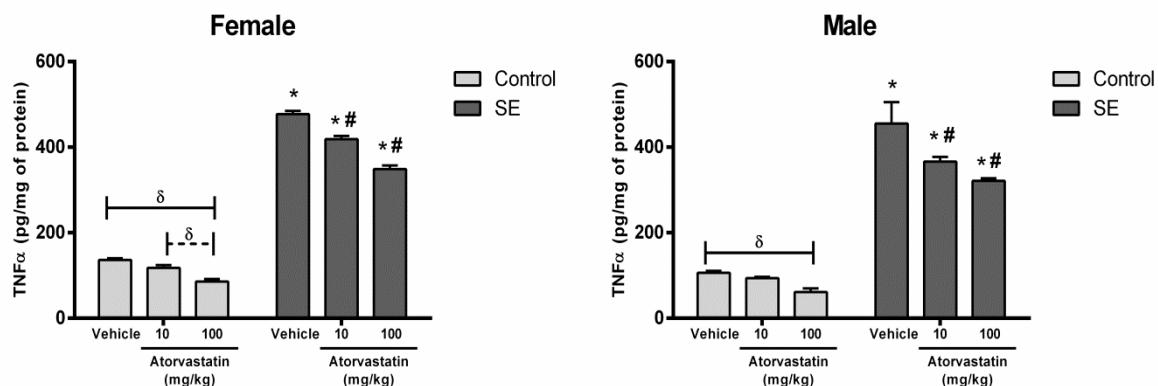
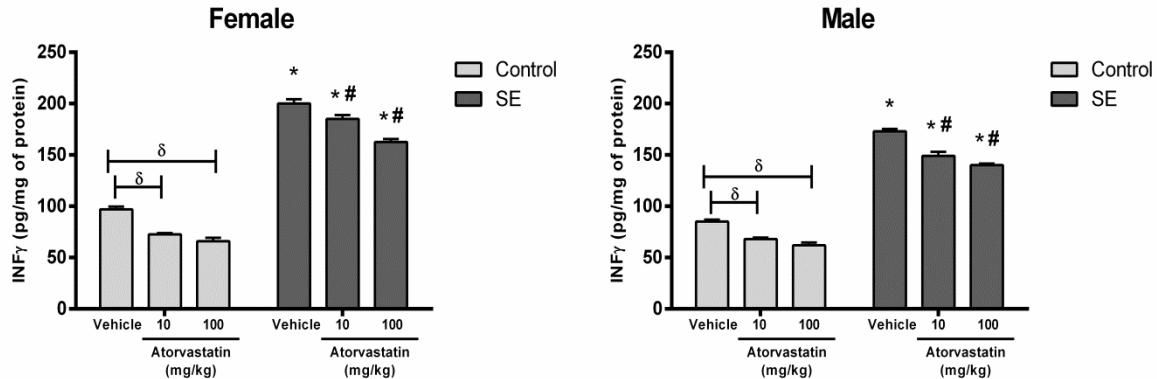


Figure 8: Effect of oral administration of increasing doses of atorvastatin (10 or 100 mg/kg; i.g.) on TNF- α levels in hippocampus and cerebral cortex of female and male mice during epileptogenic period after SE induction. Data are mean and SEM for n = 4 per group. *Indicates a statistically significant difference between post-SE mice and respective age-matched controls ($P < 0.05$). #Indicates a statistically significant difference between post-SE mice treated with vehicle or atorvastatin ($P < 0.05$). &Indicates a statistically significant difference between control mice treated with vehicle or atorvastatin ($P < 0.05$).

Interferon- γ

Hippocampus



Cerebral cortex

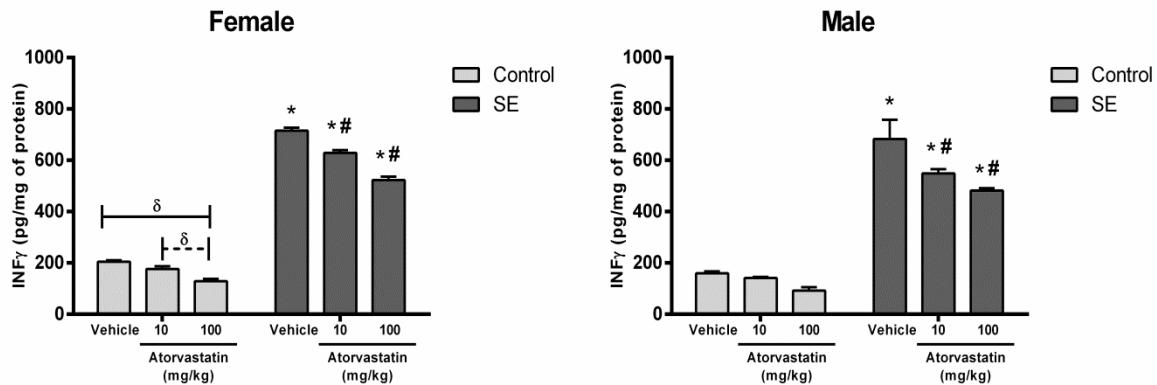
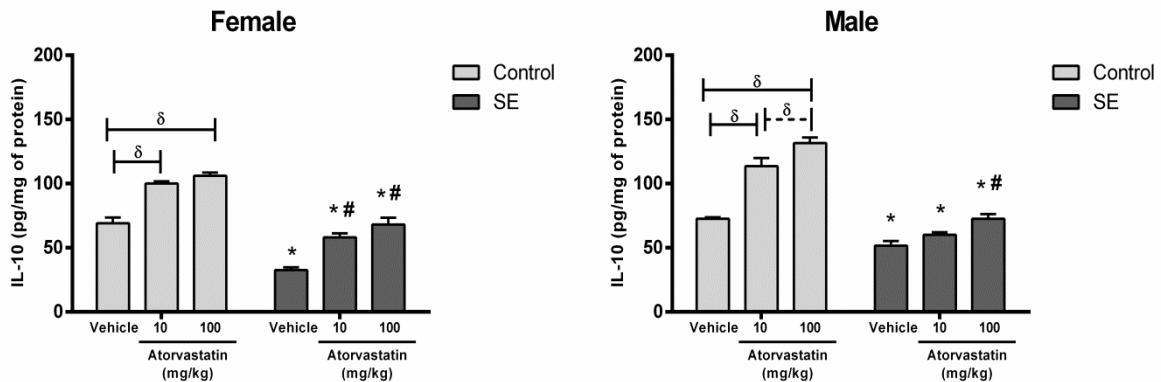


Figure 9: Effect of oral administration of increasing doses of atorvastatin (10 or 100 mg/kg; i.g.) on IFN- γ levels in hippocampus and cerebral cortex of female and male mice during epileptogenic period after SE induction. Data are mean and SEM for $n = 4$ per group. *Indicates a statistically significant difference between post-SE mice and respective age-matched controls ($P < 0.05$). #Indicates a statistically significant difference between post-SE mice treated with vehicle or atorvastatin ($P < 0.05$). &Indicates a statistically significant difference between control mice treated with vehicle or atorvastatin ($P < 0.05$).

Interleukin-10

Hippocampus



Cerebral cortex

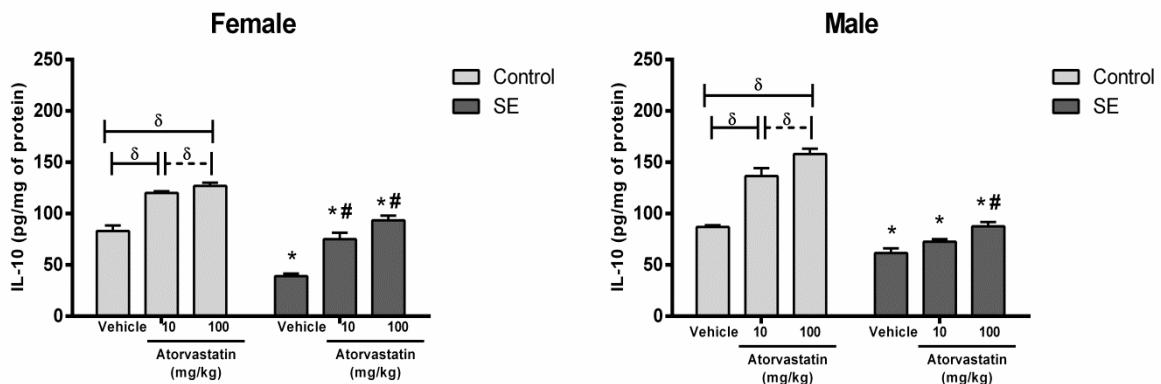
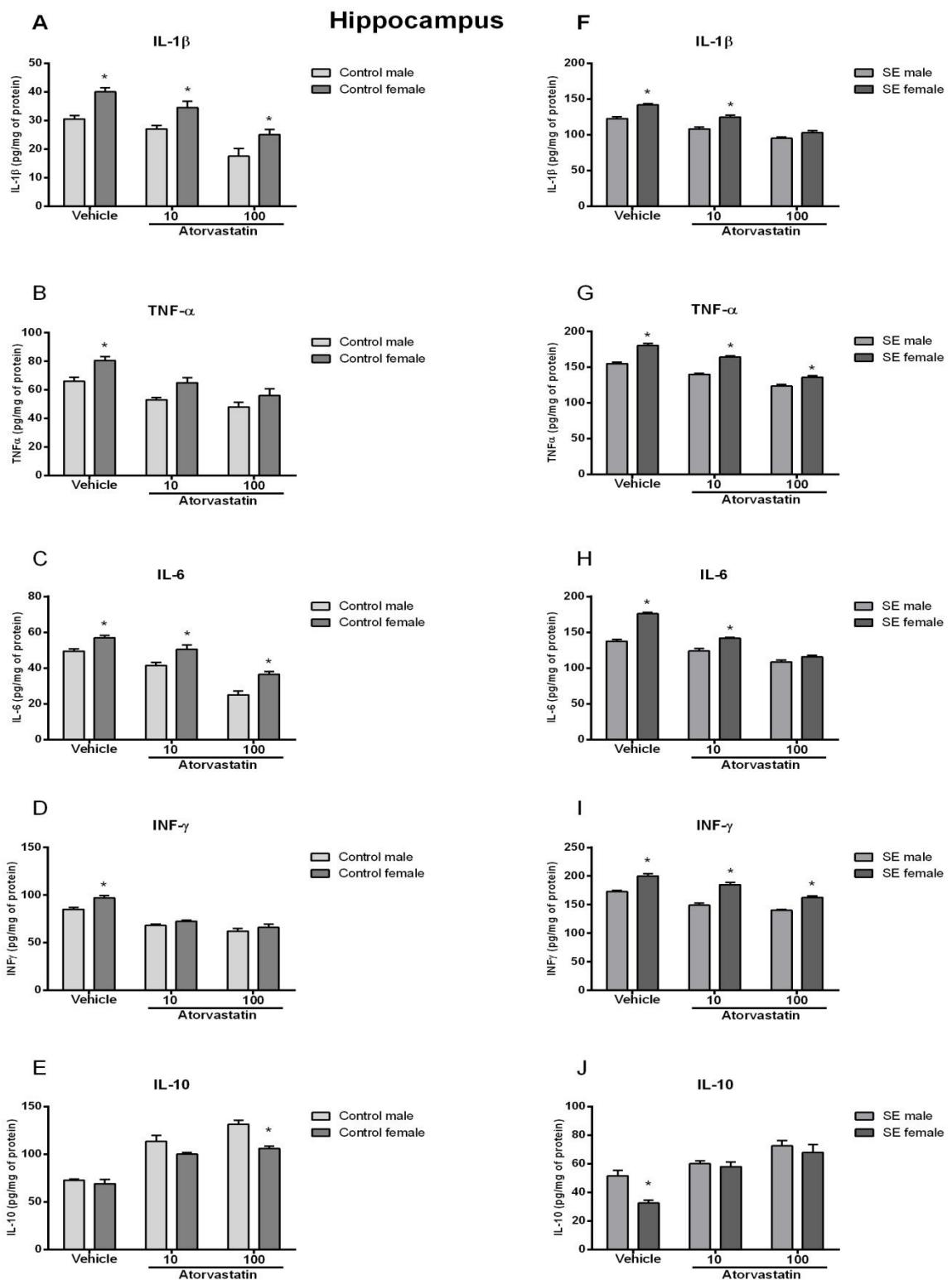
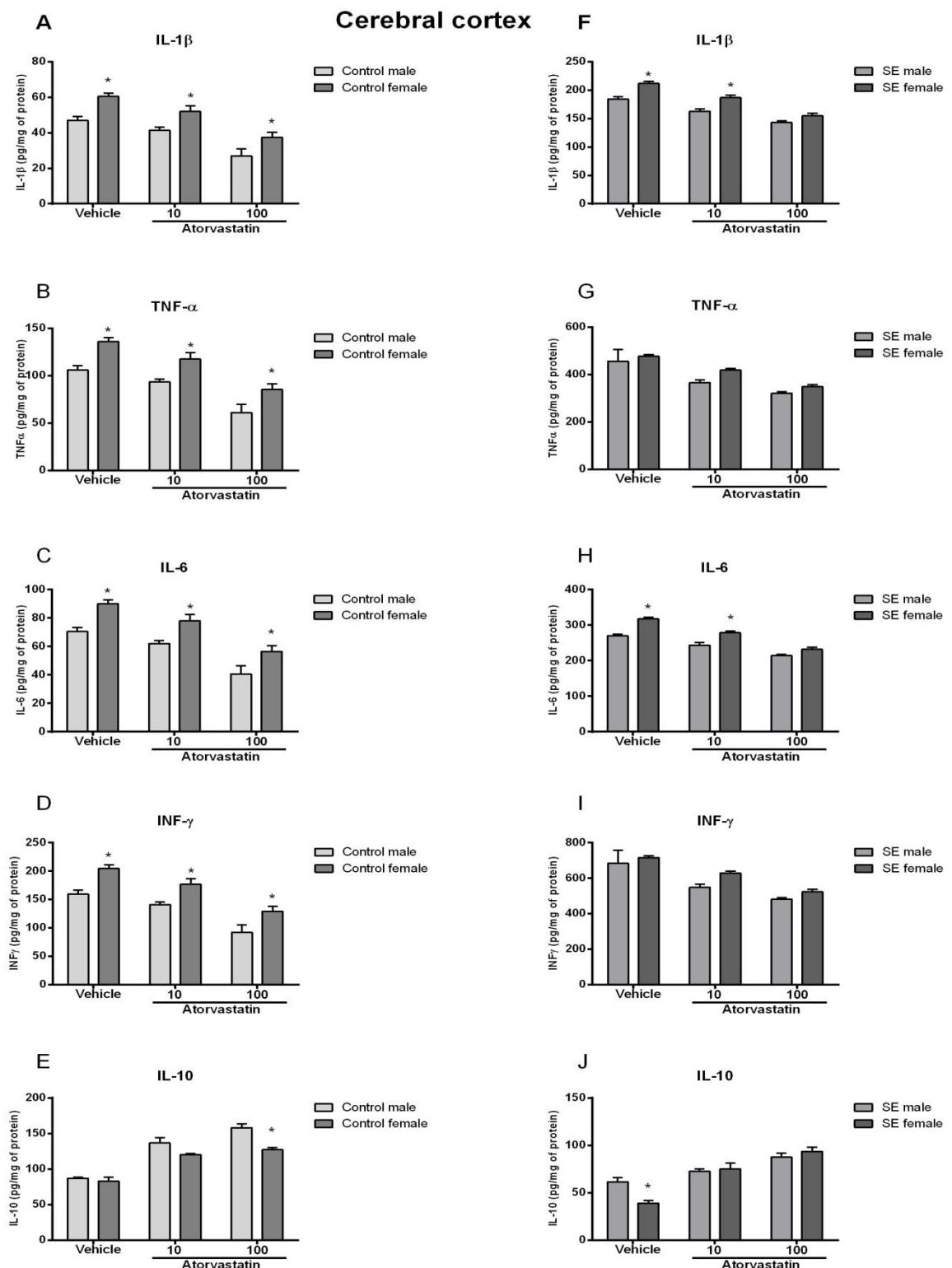


Figure 10: Effect of oral administration of increasing doses of atorvastatin (10 or 100 mg/kg; i.g.) on IL-10 levels in hippocampus and cerebral cortex of female and male mice during epileptogenic period after SE induction. Data are mean and SEM for $n = 4$ per group. *Indicates a statistically significant difference between post-SE mice and respective age-matched controls ($P < 0.05$). #Indicates a statistically significant difference between post-SE mice treated with vehicle or atorvastatin ($P < 0.05$). &Indicates a statistically significant difference between control mice treated with vehicle or atorvastatin ($P < 0.05$).



Supplementary figure 1: Effect of oral administration of increasing doses of atorvastatin (10 or 100 mg/kg; i.g.) and gender on cytokines levels in mice hippocampus during epileptogenic period after SE induction. (A and F) IL-1 β , (B and G) IL-6, (C and H) TNF- α , (D and I) IFN- γ , (E and J) IL-10 levels. Data are mean and SEM for $n = 4$ per group. *Indicates a statistically significant difference between female and male control or post-SE mice treated with vehicle or atorvastatin ($P < 0.05$).



Supplementary figure 2: Effect of oral administration of increasing doses of atorvastatin (10 or 100 mg/kg; i.g.) and gender on cytokines levels in mice cerebral cortex during epileptogenic period after SE induction. (A and F) IL-1 β , (B and G) IL-6, (C and H) TNF- α , (D and I) IFN- γ , (E and J) IL-10 levels. Data are mean and SEM for n = 4 per group. *Indicates a statistically significant difference between female and male control or post-SE mice treated with vehicle or atorvastatin ($P < 0.05$).

Table 1: Data about animals used in the study

	Male	Female
Number of animals used to SE induction ¹	83	82
Mice with SE ²	39	43
Mice resistant to SE ³	12	10
Mortality during SE ⁴	32	29
Total mortality ⁵	15	11
Control animals ⁶	27	28
Control animals mortality ⁷	3	0
Total	110	110

¹: Number of animals submitted to pilocarpine injections

²: Number of animals that entered SE

³: Number of animals that did not enter in SE after 6 pilocarpine injections

⁴: Number of animals that died within the 60-min SE period

⁵: Number of animals in SE that died in the 14-day follow-up

⁶: Number of animals submitted to NaCl 0.9% (pilocarpine vehicle) injections

⁷: Number of control animals that died in the 14-day follow-up

8 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo mostram que o tratamento com atorvastatina iniciado logo após um insulto cerebral (*status epilepticus*), e mantido durante a epileptogênese, exerce um sutil efeito modificador da doença. Esse efeito pode ser observado através do aumento do limiar convulsivo para as crises induzidas pelo PTZ nos animais submetidos ao SE, dado que a hiperexcitabilidade é uma característica do processo epileptogênico (LÖSCHER; BRANDT, 2010), e que a susceptibilidade aos efeitos convulsivos da PTZ pode servir como um biomarcador para predizer o desenvolvimento da epilepsia (BRÖER; LÖSCHER, 2015). Além disso, considerando os estudos que sugerem que os distúrbios na cognição ou no comportamento podem preceder o aparecimento das crises epilépticas e assim, representar a manifestação inicial da epilepsia (HESDORFFER et al., 2012; KANNER, 2016), o efeito modificador da doença pela atorvastatina pode ser visto também através da melhora moderada dos parâmetros cognitivos e comportamentais observados nos animais pós-SE.

Considerando que a neuroinflamação parece desempenhar um papel central na patogênese da epilepsia adquirida (VEZZANI; GRANATA, 2005), dentre os mecanismos subjacentes ao efeito modificador da doença pela atorvastatina, está a inibição do processo inflamatório. Os resultados da presente pesquisa mostram que a atorvastatina diminuiu de forma significante os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , TNF- α , IL-6, INF- γ , e elevou os níveis da citocina anti-inflamatória IL-10, no córtex cerebral e no hipocampo dos animais submetidos ao SE induzido pela pilocarpina. Esse resultado vai ao encontro do estudo de Lee e grupo (2008), que já haviam mostrado que a atorvastatina reduz as reações inflamatórias no cérebro de ratos com SE induzido por cainato (LEE et al., 2008).

A produção de citocinas precede a degeneração neuronal (RAVIZZA et al., 2005), e Lee e colaboradores (2008) também relataram que atorvastatina reduziu a morte neuronal no hipocampo dos animais 3 dias após injeção do cainato (LEE et al., 2008). No entanto, essa neuroproteção não foi encontrada na nossa análise histológica utilizando Nissl. Essa diferença pode estar ligada ao modelo utilizado por nós para a indução do SE. Conforme relatado por Pitkänen (2002), a falta de eficácia antiepiléptica nos modelos pós-SE induzidos quimicamente pode ter várias explicações, incluindo o modelo, o desenho do estudo, e obviamente o composto usado (PITKÄNEN, 2002). Além disso, existem muitos problemas conceituais, logísticos e experimentais associados ao uso desses modelos, por exemplo, no modelo de pós-SE induzido pela pilocarpina, é muito difícil terminar o SE (PITKÄNEN,

2002; LÖSCHER; BRANDT, 2010). O diazepam, assim como os outros anticonvulsivante e os anestésicos gerais, suprimem as crises motoras, mas as crises clínicas e eletrográficas freqüentemente recorrem mais tarde. Nesse sentido, Bankstahl e Löscher (2008), depois de verificarem que a combinação de diazepam e fenobarbital era mais eficaz para cessar o SE induzido por pilocarpina, do que os fármacos isolados (BANKSTAHL; LÖSCHER, 2008), utilizarem esta combinação em estudos de fármacos com potencial antiepileptogênico e observaram que a neurodegeneração nos animais em que o SE foi encerrado pelo coquetel (diazepam e fenobarbital) era muito menos severa do que nos animais em que o SE foi terminado apenas com o diazepam (BRANDT et al., 2010). Desse modo, parece que o fármaco utilizado para a cessar o SE também pode afetar as suas consequências a longo prazo, e isso pode ser um dos motivos pelos quais não se observa, na presente pesquisa, uma diminuição na morte neuronal nos animais em SE que receberam atorvastatina.

Além disso, entre os modelos de TLE pós-SE induzido pela pilocarpina ou pelo cainato, foram encontrados diferentes padrões de morte neuronal ao longo do tempo. No modelo do cainato em ratos, os neurônios em degeneração foram observados em 6 horas, atingindo pico em 1-4 dias após indução do SE (BENKOVIC et al., 2004). Já no modelo da pilocarpina em camundongos, a neurodegeneração começou a ser observada em 4h, atingindo o pico em 12 horas - 3 dias pós SE, diminuindo gradualmente entre 7-14 dias após indução SE (WANG et al., 2008). Adicionalmente, Wang e grupo (2008), com o intuito de verificar se os neurônios em degeneração (positivamente marcados para FJC) sofreram apoptose, realizou uma marcação dupla nos slices cerebrais de camundongos submetidos ao SE induzido pela pilocarpina. Os slices marcados com FJC foram co-marcados com anticorpos contra moléculas de sinalização envolvidas na via apoptótica, como citocromo c, caspase-9 e caspase-3. E os resultados mostraram que 98% dos neurônios FJC positivos exibiram imunorreatividade para os marcadores apoptóticos testados, indicando que a apoptose pode ser subjacente na maioria das mortes neuronais nesse modelo (WANG et al., 2008).

Desse modo, além da diferença no curso de tempo da neurodegeneração entre os modelos, outra possível explicação para a diversidade em relação a neuroproteção observada entre o estudo de Lee e grupo (2008) e o nosso estudo, é o tempo para o início do tratamento com a atorvastatina (LEE et al., 2008). Enquanto no estudo de Lee e colaboradores (2008), o tratamento foi iniciado 30 minutos após a injeção do cainato, no nosso estudo o tratamento com atorvastatina foi iniciado 3 horas após a injeção do diazepam, ou seja, 4 horas após o SE induzido pela pilocarpina. Se considerarmos que o estudo de Wang e grupo (2008), citado

acima, mostra que nesse tempo (4 horas pós-SE) a morte neuronal já é observada, podemos inferir que o processo de morte celular, provavelmente via apoptose, já havia começado e que a atorvastatina não foi capaz de reverter o mesmo.

É importante ressaltar, que apesar da literatura relatar que o dano hipocampal pode ser prevenido ou minimizado pela administração de um agente neuroprotetor pós-SE, apenas os tratamentos que protegem o hipocampo e as áreas parahipocampais (como a amígdala e o tálamo) são capazes de retardar ou prevenir totalmente a ocorrência de crises espontâneas (ANDRÉ et al., 2007). Contudo, segundo a literatura, mesmo a neuroproteção (definida no sentido estreito de proteger os neurônios da morte) pode não ser suficiente para a terapia antiepileptica, visto que a neuroproteção pós-SE deve abranger não apenas a prevenção da morte neuronal, mas também a preservação da função neuronal e da rede na qual esses neurônios estão inseridos (WALKER, 2007).

Além do efeito anti-inflamatório, outro possível mecanismo envolvido no efeito modificador da doença pela atorvastatina seria o aumento nos níveis de corpos cetônicos. Nesse sentido, sabe-se que as estatinas inibem a HMG-CoA redutase, impedindo a conversão do HMG-CoA a mevalonato, e assim, promovendo o acúmulo de acetil-CoA. O acetil-CoA é fonte de energia e precursor metabólico da cetogênese. De acordo com a lei das massas (BENDER et al., 2014), um bloqueio na biossíntese do colesterol no fígado, pode ter consequências sobre outras vias metabólicas, como o catabolismo dos combustíveis geradores de acetil-coA, por um lado, e o processo de cetogênese (síntese de corpos cetônicos: acetoacetato, β -hidroxibutirato e acetona), por outro. É possível então, que as estatinas possam contribuir para a elevação nos níveis sanguíneos de combustíveis orgânicos ou exacerbação da cetogênese.

Nesse sentido, a dieta cetogênica (DC) é uma dieta terapêutica cuja composição é rica em lipídeos, moderada em proteínas e pobre em carboidratos, que induz o organismo humano a produzir uma modificação química resultando em Cetose (SU et al., 2000). Essa dieta tem se mostrado boa terapêutica nos casos de epilepsia refratária ao tratamento farmacológico, ou casos em que os medicamentos causam efeitos adversos que dificultam sua utilização (KIM; RHO, 2008). Além disso, o efeito antiepileptogênico da DC foi também testado em dois modelos de epileptogênese em roedores, no *kindling* por PTZ em camundongos e no modelo de TLE pós-SE induzido por pilocarpina em ratos. No primeiro modelo, foi visto que dieta suprimiu o desenvolvimento da epileptogênese pelo *kindling*, e quando a dieta foi retirada os animais apresentaram aumento no limiar convulsivo. Já no segundo modelo, foi observado

que os animais alimentados com a dieta cetogênica apresentaram significante diminuição na freqüência e na severidade das crises espontâneas, e esse efeito foi mantido após a retirada da dieta (LUSARDI et al., 2015). Embora os mecanismos subjacentes à ampla eficácia clínica da dieta cetogênica permanecem pouco claros, há evidências crescentes de que a dieta cetogênica altera a bioquímica fundamental dos neurônios de uma forma que não só inibe a hiperexcitabilidade neuronal, mas também induz um efeito protetor (KIM; RHO, 2008).

Em conjunto, estudos mostram que atorvastatina, assim como os metabólitos da dieta cetogênica, são carboxilatos, e como tais, podem ser inibidores da enzima anidrase carbônica (AC) (EC 4.2.1.1) (PARKKILA et al., 2012). A anidrase carbônica é uma metaloenzima que contém um átomo de zinco. Sua função de maior importância é a hidratação do dióxido de carbono e a desidratação do ácido carbônico, sendo o seu substrato natural o dióxido de carbono. Na espécie humana foram reconhecidas diferentes isoformas da AC, as quais diferem entre si quanto à estrutura molecular propriedades cinéticas, especificidade pelo substrato, padrões de inibição, de eficiência catalítica e da distribuição tecidual. Estudos mostram que muitos anticonvulsivantes, tais como zonisamida, topiramato e lacosamida inibem fortemente várias isoformas de AC encontradas no cérebro (DE SIMONE et al., 2009). Assim, o efeito da atorvastatina nos nossos resultados também pode estar relacionado com a inibição de diferentes isoformas da enzima anidrase carbônica no cérebro dos animais submetidos ao SE induzido pela pilocarpina.

Conforme observado nos resultados do teste com o PTZ, o efeito protetor da atorvastatina parece ser similar nos camundongos machos e fêmeas, no entanto, uma dose maior da estatina é necessária para tal efeito nas fêmeas. Entre as razões para essa diferença entre os sexos está a questão metabólica, a qual é válida tanto nos animais como nos humanos, como por exemplo, as diferenças nos percentuais de gordura entre homens e mulheres (e machos e fêmeas), que influenciam a farmacocinética do fármaco (GIBSON et al., 1996; KARALIS et al., 2016). Também é possível que a expressão e/ou a função do transportador OATP-C seja menor nas fêmeas, o que faz com que uma quantidade menor de atorvastatina entre no hepatócito, reduzindo assim sua efetividade (FONSECA, 2005; HIRANO et al., 2006; SORTICA, 2009). Além disso, já está bem estabelecido que a organização estrutural e funcional de várias redes cerebrais difere entre os sexos (LUDERS et al., 2005; GIEDD et al., 2006), e é plausível que possam influenciar o desenvolvimento do processo epileptogênico (SAVIC; ENGEL, 2014), e consequentemente, no efeito de qualquer terapia antiepileptogênica.

Ademais, há muitos componentes da neuroinflamação envolvidos no processo epileptogênico, que estão ligados às diferenças sexuais e que podem assim, influenciar na resposta ao tratamento com atorvastatina. Entre esses componentes estão as alterações imunológicas, a organização da rede neuronal e os níveis circulantes de hormônios esteróides (ROOF; HALL, 2000; MANWANI et al., 2013), os quais. Nesse sentido, sabe-se que os hormônios esteróides são moduladores importantes da fisiologia cerebral em adultos e, de fato, estudos clínicos e experimentais mostram que a susceptibilidade a crises e o início das mesmas são influenciados pelos níveis de hormônios circulantes, tornando este um fator importante, que contribui para as diferenças sexuais na epileptogênese.

Além disso, os hormônios esteróides também são extremamente importantes na diferenciação sexual do cérebro durante o desenvolvimento inicial, formando circuitos neurais e potencialmente alterando a susceptibilidade a crises de modo sexualmente dimórfico (KIGHT; MCCARTHY, 2014). Assim, é plausível que as diferenças observadas entre machos e fêmeas sejam significativamente influenciadas pelos hormônios esteróides.

9 CONCLUSÃO

O objetivo final de um fármaco capaz de interferir na epileptogênese seria a prevenção do aparecimento das crises epilépticas, mas também é possível que essa molécula exerça um efeito modificador do processo epileptogênico, reduzindo a freqüência, a duração e a severidade das crises, prevenindo a neurodegeneração ou reduzindo as alterações cognitivas e comportamentais associadas à epilepsia (LÖSCHER; BRANDT, 2010). Como várias alterações patológicas ocorrem simultaneamente durante o processo epileptogênico, dificilmente esse processo será interrompido/contido utilizando fármacos que tenham apenas um único alvo envolvido nessas alterações. Assim, o uso de combinações de fármacos (coquetéis) que atuem sobre os diferentes pontos do processo epileptogênico (como a inflamação), após um insulto cerebral deve ser explorado (LÖSCHER et al., 2013).

Considerando que no presente trabalho foi visto que a atorvastatina exerce um sutil efeito modificador do processo epileptogênico, e que esse fármaco tem um perfil de segurança bem conhecido e apresenta boa tolerabilidade, é possível inferir que a atorvastatina constitui uma boa opção para associação com outros fármacos na terapia antiepileptogênica. Contudo, mais estudos são necessários para avaliar tal possibilidade.

10 REFERÊNCIAS

- ACOSTA, M. T. et al. Lovastatin as Treatment for Neurocognitive Deficits in Neurofibromatosis Type 1: Phase I Study. **Pediatric Neurology**, v. 45, n. 4, p. 241-245, 2011. ISSN 0887-8994. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2011.06.016>>. Acesso em: 2017/01/25.
- ADAMS, S. P.; TSANG, M.; WRIGHT, J. M. Lipid-lowering efficacy of atorvastatin. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 3, p. CD008226, Mar 2015. ISSN 1469-493X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25760954>>.
- ALESSIO, A. et al. Evidence of memory impairment in asymptomatic individuals with hippocampal atrophy. **Epilepsy & Behavior**, v. 5, n. 6, p. 981-987, 2004. ISSN 1525-5050. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1525505004002793>>.
- ALLEN, J. S. et al. Sexual dimorphism and asymmetries in the gray-white composition of the human cerebrum. **NeuroImage**, v. 18, n. 4, p. 880-894, 2003. ISSN 1053-8119. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S105381190300034X>>.
- ALLERS, K. et al. The economic impact of epilepsy: a systematic review. **BMC Neurol**, v. 15, p. 245, Nov 2015. ISSN 1471-2377. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26607561>>.
- ANDRADE-VALENÇA, L. P. A. et al. Epilepsia do lobo temporal mesial associada à esclerose hipocampal. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**, v. 12, p. 31-36, 2006. ISSN 1676-2649. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-26492006000100007&nrm=iso>.
- ANDRÉ, V. et al. Pathogenesis and Pharmacology of Epilepsy in the Lithium-pilocarpine Model. **Epilepsia**, v. 48, p. 41-47, 2007. ISSN 1528-1167. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1528-1167.2007.01288.x>>.
- ANNEGERS , J. F. et al. A Population-Based Study of Seizures after Traumatic Brain Injuries. **New England Journal of Medicine**, v. 338, n. 1, p. 20-24, 1998. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM199801013380104>>.
- BANACH, M.; CZUCZWAR, S. J.; BOROWICZ, K. K. Statins - are they anticonvulsant? **Pharmacol Rep**, v. 66, n. 4, p. 521-8, Aug 2014. ISSN 1734-1140. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24948050>>.
- BANKSTAHL, J. P.; LÖSCHER, W. Resistance to antiepileptic drugs and expression of P-glycoprotein in two rat models of status epilepticus. **Epilepsy Research**, v. 82, n. 1, p. 70-85, 2008. ISSN 0920-1211. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2008.07.007>>. Acesso em: 2017/01/27.
- BAXENDALE, S. et al. Predicting Memory Decline Following Epilepsy Surgery: A Multivariate Approach. **Epilepsia**, v. 47, n. 11, p. 1887-1894, 2006. ISSN 1528-1167. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1528-1167.2006.00810.x>>.

BENDER, D. A. et al. **Bioquímica ilustrada de Harper.** AMGH, 2014. ISBN 9788580552805. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=rSTpjwEACAAJ>>.

BERG, A. T. et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. **Epilepsia**, v. 51, n. 4, p. 676-85, Apr 2010. ISSN 1528-1167. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20196795>>.

BLUME, W. T. et al. Glossary of descriptive terminology for ictal semiology: report of the ILAE task force on classification and terminology. **Epilepsia**, v. 42, n. 9, p. 1212-8, Sep 2001. ISSN 0013-9580. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11580774>>.

BOER, H. M.; MULA, M.; SANDER, J. W. The global burden and stigma of epilepsy. **Epilepsy Behav**, v. 12, n. 4, p. 540-6, May 2008. ISSN 1525-5050. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18280210>>.

BRANDT, C. et al. Disease-Modifying Effects of Phenobarbital and the NKCC1 Inhibitor Bumetanide in the Pilocarpine Model of Temporal Lobe Epilepsy. **The Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 25, p. 8602-8612, 2010.

BRÖER, S.; LÖSCHER, W. Novel combinations of phenotypic biomarkers predict development of epilepsy in the lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in rats. **Epilepsy Behav**, v. 53, p. 98-107, Dec 2015. ISSN 1525-5069. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26539702>>.

BUCKMASTER, P. Mossy Fiber Sprouting in the Dentate Gyrus. In: IN: NOEBELS JL, A. M., ROGAWSKI MA, ET AL., EDITORS. (Ed.). **Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies [Internet]. 4th edition.** Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US), 2012.

ÇAKU, A. et al. Effect of lovastatin on behavior in children and adults with fragile X syndrome: An open-label study. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 164, n. 11, p. 2834-2842, 2014. ISSN 1552-4833. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/ajmg.a.36750>>.

CANLI, T. et al. Sex differences in the neural basis of emotional memories. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 16, p. 10789-10794, August 6, 2002 2002. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/99/16/10789.abstract>>.

CAVALHEIRO, E. et al., Eds. **The pilocarpine model of seizures.** Models of Seizures And Epilepsy. Amsterdam: Elsevier, p.433–448, Models of Seizures And Epilepsyed. 2006.

CAVALHEIRO, E. A.; SANTOS, N. F.; PRIEL, M. R. The pilocarpine model of epilepsy in mice. **Epilepsia**, v. 37, n. 10, p. 1015-9, Oct 1996. ISSN 0013-9580. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8822702>>.

CLAYTON, J. A.; COLLINS, F. S. Policy: NIH to balance sex in cell and animal studies. **Nature**, v. 509, n. 7500, p. 282-3, May 2014. ISSN 1476-4687. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24834516>>.

COCKERELL, O. C. et al. Prognosis of Epilepsy: A Review and Further Analysis of the First Nine Years of the British National General Practice Study of Epilepsy, a Prospective Population-Based Study. **Epilepsia**, v. 38, n. 1, p. 31-46, 1997. ISSN 1528-1167. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1528-1157.1997.tb01075.x>>.

CORRAO, G. et al. Long-term use of statins reduces the risk of hospitalization for dementia. **Atherosclerosis**, v. 230, n. 2, p. 171-176, 2013. ISSN 0021-9150. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2013.07.009>>. Acesso em: 2017/01/25.

CURIA, G. et al. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 172, n. 2-4, p. 143-157, 2008. ISSN 0165-0270 1872-678X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2518220/>>.

DE SIMONE, G.; SCOZZAFAVA, A.; SUPURAN, C. T. Which Carbonic Anhydrases are Targeted by the Antiepileptic Sulfonamides and Sulfamates? **Chemical Biology & Drug Design**, v. 74, n. 3, p. 317-321, 2009. ISSN 1747-0285. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1747-0285.2009.00857.x>>.

DUDEK, F. et al., Eds. **Kainate-induced status epilepticus: A chronic model of acquired epilepsy**. Models of Seizures And Epilepsy. Amsterdam: Elsevier, p.415–432, Models of Seizures And Epilepsy. 2006.

DUNCAN, J. S. et al. Adult epilepsy. **Lancet**, v. 367, n. 9516, p. 1087-100, Apr 2006. ISSN 1474-547X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16581409>>.

EDEH, J.; TOONE, B. Relationship between interictal psychopathology and the type of epilepsy. Results of a survey in general practice. **Br J Psychiatry**, v. 151, p. 95-101, Jul 1987. ISSN 0007-1250. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3118998>>.

EGOM, E. E. A.; HAFEEZ, H. Chapter Five - Biochemistry of Statins. In: GREGORY, S. M. (Ed.). **Advances in Clinical Chemistry**: Elsevier, v. Volume 73, 2016. p.127-168. ISBN 0065-2423.

EKINS, S. et al. In silico repositioning of approved drugs for rare and neglected diseases. **Drug Discovery Today**, v. 16, n. 7-8, p. 298-310, 2011. ISSN 1359-6446. Disponível em: <www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359644611000675>.

ENDO, A. A historical perspective on the discovery of statins. **Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci**, v. 86, n. 5, p. 484-93, 2010. ISSN 1349-2896. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20467214>>.

ENGEL, J. Mesial temporal lobe epilepsy: what have we learned? **Neuroscientist**, v. 7, n. 4, p. 340-52, Aug 2001. ISSN 1073-8584. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11488399>>.

EPILEPSY, F. Employment for People with Epilepsy: The Hardest Nut. **Epilepsy & Behavior**, v. 2, n. 5, p. 379-380, 2001. ISSN 1525-5050. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1006/ebeh.2001.0264>>. Acesso em: 2017/01/25.

EXPERT PANEL ON, D.; EVALUATION; AND TREATMENT OF HIGH BLOOD CHOLESTEROL IN, A. Executive summary of the third report of the national cholesterol education program (ncep) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (adult treatment panel iii). **JAMA**, v. 285, n. 19, p. 2486-2497, 2001. ISSN 0098-7484. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1001/jama.285.19.2486>>.

FERREIRA, I. D. L. M.; SILVA, T. P. T. Mortalidade por epilepsia no Brasil, 1980-2003. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 14, p. 89-94, 2009. ISSN 1413-8123. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-81232009000100014&nrm=iso>.

FISHER, R. S. Redefining epilepsy. **Current Opinion in Neurology**, v. 28, n. 2, p. 130-135, 2015. ISSN 1350-7540. Disponível em: <http://journals.lww.com/co-neurology/Fulltext/2015/04000/Redefining_epilepsy.8.aspx>.

FISHER, R. S. et al. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. **Epilepsia**, v. 55, n. 4, p. 475-82, Apr 2014. ISSN 1528-1167. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24730690>>.

FISHER, R. S. et al. 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. 470-2, Apr 2005. ISSN 0013-9580. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15816939>>.

FONSECA, F. A. H. Farmacocinética das estatinas. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 85, p. 9-14, 2005. ISSN 0066-782X. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0066-782X2005002400003&nrm=iso>.

From the Epilepsy Foundation. **Epilepsy & Behavior**, v. 2, n. 5, p. 379-380, ISSN 1525-5050. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1006/ebeh.2001.0264>>. Acesso em: 2017/01/25.

FUNCK, V. R. et al. Differential effects of atorvastatin treatment and withdrawal on pentylenetetrazol-induced seizures. **Epilepsia**, v. 52, n. 11, p. 2094-104, Nov 2011. ISSN 1528-1167. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21906051>>.

GAITATZIS, A.; SISODIYA, S. M.; SANDER, J. W. The somatic comorbidity of epilepsy: A weighty but often unrecognized burden. **Epilepsia**, v. 53, n. 8, p. 1282-1293, 2012. ISSN 1528-1167. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1528-1167.2012.03528.x>>.

GALLUCCI NETO, J.; MARCHETTI, R. L. [Epidemiologic aspects and relevance of mental disorders associated with epilepsy]. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 27, n. 4, p. 323-8, Dec 2005. ISSN 1516-4446. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16358116>>.

GASTAUT, H. et al. Relative Frequency of Different Types of Epilepsy: A Study Employing the Classification of the International League Against Epilepsy. **Epilepsia**, v. 16, n. 3, p. 457-461, 1975. ISSN 1528-1167. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1528-1157.1975.tb06073.x>>.

GIBSON, D. M. et al. Effect of age and gender on pharmacokinetics of atorvastatin in humans. **J Clin Pharmacol**, v. 36, n. 3, p. 242-6, Mar 1996. ISSN 0091-2700. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8690818>>.

GIEDD, J. N. et al. Puberty-related influences on brain development. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 254–255, p. 154-162, 2006. ISSN 0303-7207. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0303720706001742>>.

GRÖTICKE, I.; HOFFMANN, K.; LÖSCHER, W. Behavioral alterations in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in mice. **Exp Neurol**, v. 207, n. 2, p. 329-49, Oct 2007. ISSN 0014-4886. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17714705>>.

HALL, E. D.; GIBSON, T. R.; PAVEL, K. M. Lack of a Gender Difference in Post-Traumatic Neurodegeneration in the Mouse Controlled Cortical Impact Injury Model. **Journal of Neurotrauma**, v. 22, n. 6, p. 669-679, 2005/06/01 2005. ISSN 0897-7151. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1089/neu.2005.22.669>>. Acesso em: 2017/01/25.

HAUSER, W. A.; ANNEGERS, J. F.; KURLAND, L. T. Incidence of Epilepsy and Unprovoked Seizures in Rochester, Minnesota: 1935–1984. **Epilepsia**, v. 34, n. 3, p. 453-458, 1993. ISSN 1528-1167. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1528-1157.1993.tb02586.x>>.

HAUSER, W. A.; BEGHI, E. First seizure definitions and worldwide incidence and mortality. **Epilepsia**, v. 49 Suppl 1, p. 8-12, 2008. ISSN 0013-9580. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18184148>>.

HEANEY, D. C. et al. Socioeconomic variation in incidence of epilepsy: prospective community based study in south east England. **BMJ**, v. 325, n. 7371, p. 1013-6, Nov 2002. ISSN 1756-1833. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12411362>>.

HEART PROTECTION STUDY, C. G. MRC/BHF Heart Protection Studyof cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: arandomised placebo-controlled trial. Elsevier, p.7-22. 2002. (0140-6736)

HERMAN, S. T. Epilepsy after brain insult: targeting epileptogenesis. **Neurology**, v. 59, n. 9 Suppl 5, p. S21-6, Nov 2002. ISSN 0028-3878. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12428028>>.

HERMANN, B. P. et al. Cognitive prognosis in chronic temporal lobe epilepsy. **Ann Neurol**, v. 60, n. 1, p. 80-7, Jul 2006. ISSN 0364-5134. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16802302>>.

HESDORFFER, D. C. et al. Epilepsy, suicidality, and psychiatric disorders: a bidirectional association. **Ann Neurol**, v. 72, n. 2, p. 184-91, Aug 2012. ISSN 1531-8249. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22887468>>.

HESDORFFER, D. C. et al. Combined analysis of risk factors for SUDEP. **Epilepsia**, v. 52, n. 6, p. 1150-1159, 2011. ISSN 1528-1167. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1528-1167.2010.02952.x>>.

HICKS, R. A.; HICKS, M. J. Attitudes of major employers toward the employment of people with epilepsy: a 30-year study. **Epilepsia**, v. 32, n. 1, p. 86-8, 1991 Jan-Feb 1991. ISSN 0013-9580. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1985835>>.

HIRANO, M. et al. DRUG-DRUG INTERACTION BETWEEN PITAVASTATIN AND VARIOUS DRUGS VIA OATP1B1. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 34, n. 7, p. 1229-1236, 2006.

HOPPE, C.; ELGER, C. E. Depression in epilepsy: a critical review from a clinical perspective. **Nat Rev Neurol**, v. 7, n. 8, p. 462-472, 2011. ISSN 1759-4758. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2011.104>>.

IBARRA, M. et al. Sex related differences on valproic acid pharmacokinetics after oral single dose. **J Pharmacokinet Pharmacodyn**, v. 40, n. 4, p. 479-86, Aug 2013. ISSN 1573-8744. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23784346>>.

IGARASHI, T.; HUANG, T. T.; NOBLE, L. J. Regional vulnerability after traumatic brain injury: gender differences in mice that overexpress human copper, zinc superoxide dismutase. **Experimental neurology**, v. 172, n. 2, p. 332-341, 2001/12// 2001. ISSN 0014-4886. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/MED/11716557>
<http://dx.doi.org/10.1006/exnr.2001.7820>>.

ILAE. Proposal for Revised Clinical and Electroencephalographic Classification of Epileptic Seizures. **Epilepsia**, v. 22, n. 4, p. 489-501, 1981. ISSN 1528-1167. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1528-1157.1981.tb06159.x>>.

INGALHALIKAR, M. et al. Sex differences in the structural connectome of the human brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 2, p. 823-828, 2014. ISSN 0027-8424
1091-6490. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3896179/>>.

JACOBY, A.; GORRY, J.; BAKER, G. A. Employers' attitudes to employment of people with epilepsy: still the same old story? **Epilepsia**, v. 46, n. 12, p. 1978-87, Dec 2005. ISSN 0013-9580. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16393165>>.

KAN, A. A. et al. Protein expression profiling of inflammatory mediators in human temporal lobe epilepsy reveals co-activation of multiple chemokines and cytokines. **Journal of Neuroinflammation**, v. 9, p. 207-207, 2012. ISSN 1742-2094. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3489559/>>.

KANAAN, R. A. et al. Gender Differences in White Matter Microstructure. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. -, 2012. ISSN 1932-6203.

KANNER, A. M. Management of psychiatric and neurological comorbidities in epilepsy. **Nat Rev Neurol**, v. 12, n. 2, p. 106-116, 2016. ISSN 1759-4758. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2015.243>>.

KARALIS, D. G. et al. Gender differences in side effects and attitudes regarding statin use in the Understanding Statin Use in America and Gaps in Patient Education (USAGE) study. **J**

Clin Lipidol, v. 10, n. 4, p. 833-41, 2016 Jul-Aug 2016. ISSN 1933-2874. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27578114>>.

KEEZER, M. R.; SISODIYA, S. M.; SANDER, J. W. Comorbidities of epilepsy: current concepts and future perspectives. **The Lancet Neurology**, v. 15, n. 1, p. 106-115, 2015. ISSN 1474-4422. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)00225-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00225-2)>. Acesso em: 2017/01/25.

KIGHT, K. E.; MCCARTHY, M. M. Using sex differences in the developing brain to identify nodes of influence for seizure susceptibility and epileptogenesis. **Neurobiology of disease**, v. 72 Pt B, p. 136-143, 2014/12// 2014. ISSN 0969-9961. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/MED/24892888>
<http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2014.05.027>>.

KIM, D. Y.; RHO, J. M. The ketogenic diet and epilepsy. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 11, n. 2, p. 113-120, 2008. ISSN 1363-1950. Disponível em:<http://journals.lww.com/coclinicalnutrition/Fulltext/2008/03000/The_ketogenic_diet_an_d_epilepsy.6.aspx>.

KWAN, P. et al. Definition of drug resistant epilepsy: Consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. **Epilepsia**, v. 51, n. 6, p. 1069-1077, 2010. ISSN 1528-1167. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1528-1167.2009.02397.x>>.

LAUFS, U. et al. Atorvastatin upregulates type III nitric oxide synthase in thrombocytes, decreases platelet activation, and protects from cerebral ischemia in normocholesterolemic mice. **Stroke**, v. 31, n. 10, p. 2442-9, Oct 2000. ISSN 1524-4628. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11022078>>.

LEE, J. K. et al. Statin inhibits kainic acid-induced seizure and associated inflammation and hippocampal cell death. **Neurosci Lett**, v. 440, n. 3, p. 260-4, Aug 2008. ISSN 0304-3940. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18583044>>.

LEE, Y.-C. et al. Discontinuation of statin therapy associates with Parkinson disease: A population-based study. **Neurology**, v. 81, n. 5, p. 410-416, July 30, 2013 2013. Disponível em: <<http://www.neurology.org/content/81/5/410.abstract>>.

LI, W. et al. The HMG-CoA Reductase Inhibitor Lovastatin Reverses the Learning and Attention Deficits in a Mouse Model of Neurofibromatosis Type 1. **Current Biology**, v. 15, n. 21, p. 1961-1967, 2005. ISSN 0960-9822. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2005.09.043>>. Acesso em: 2017/01/25.

LING, Q.; TEJADA-SIMON, M. V. Statins and the brain: New perspective for old drugs. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 66, p. 80-86, 2016/04// 2016. ISSN 0278-5846. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/MED/26655447>
<http://dx.doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.11.013>>.

LÖSCHER, W. Strategies for antiepileptogenesis: Antiepileptic drugs versus novel approaches evaluated in post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy In: NOEBELS JL, A. M., ROGAWSKI MA, ETAL., EDITORS (Ed.). **Jasper's Basic**

Mechanisms of the Epilepsies [Internet]. 4th edition. 4th. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US) 2012.

LÖSCHER, W.; BRANDT, C. Prevention or modification of epileptogenesis after brain insults: experimental approaches and translational research. **Pharmacol Rev**, v. 62, n. 4, p. 668-700, Dec 2010. ISSN 1521-0081. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21079040>>.

LÖSCHER, W. et al. New avenues for anti-epileptic drug discovery and development. **Nat Rev Drug Discov**, v. 12, n. 10, p. 757-76, Oct 2013. ISSN 1474-1784. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24052047>>.

LOWENSTEIN, D. H. Epilepsy after head injury: An overview. **Epilepsia**, v. 50, p. 4-9, 2009. ISSN 1528-1167. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1528-1167.2008.02004.x>>.

LUDERS, E. et al. Mapping cortical gray matter in the young adult brain: Effects of gender. **NeuroImage**, v. 26, n. 2, p. 493-501, 2005. ISSN 1053-8119. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1053811905001059>>.

LUSARDI, T. A. et al. Ketogenic diet prevents epileptogenesis and disease progression in adult mice and rats. **Neuropharmacology**, v. 99, p. 500-509, 2015. ISSN 0028-3908. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0028390815300538>>.

MAKIHARA, N. et al. Statins and the risks of stroke recurrence and death after ischemic stroke: the Fukuoka Stroke Registry. **Atherosclerosis**, v. 231, n. 2, p. 211-215, 2013/12// 2013. ISSN 0021-9150. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/MED/24267228> <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2013.09.017>>.

MALFITANO, A. M. et al. Statins in neurological disorders: an overview and update. **Pharmacol Res**, v. 88, p. 74-83, Oct 2014. ISSN 1096-1186. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24954580>>.

MANWANI, B. et al. Differential effects of aging and sex on stroke induced inflammation across the lifespan. **Experimental Neurology**, v. 249, p. 120-131, 2013. ISSN 0014-4886. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014488613002513>>.

MARCANGELO, M. J.; OVSIEW, F. Psychiatric aspects of epilepsy. **Psychiatr Clin North Am**, v. 30, n. 4, p. 781-802, Dec 2007. ISSN 1558-3147. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17938045>>.

MARINO, S. E. et al. Steady-state carbamazepine pharmacokinetics following oral and stable-labeled intravenous administration in epilepsy patients: effects of race and sex. **Clin Pharmacol Ther**, v. 91, n. 3, p. 483-8, Mar 2012. ISSN 1532-6535. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22278332>>.

MCTAGGART, F. et al. Preclinical and clinical pharmacology of rosuvastatin, a new 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor¹. **American Journal of Cardiology**, v. 87, n. 5, p. 28-32, 2001. ISSN 0002-9149. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9149\(01\)01454-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9149(01)01454-0)>. Acesso em: 2017/01/25.

MILLER, J. M. et al. Depressive symptoms in epilepsy: prevalence, impact, aetiology, biological correlates and effect of treatment with antiepileptic drugs. **Drugs**, v. 68, n. 11, p. 1493-509, 2008. ISSN 0012-6667. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18627207>>.

MOEZI, L. et al. Chronic administration of atorvastatin induced anti-convulsant effects in mice: The role of nitric oxide. **Epilepsy & Behavior**, v. 23, n. 4, p. 399-404, 2012. ISSN 1525-5050. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.yebeh.2012.02.001>>. Acesso em: 2017/01/25.

MORIMOTO, K.; FAHNESTOCK, M.; RACINE, R. J. Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. **Prog Neurobiol**, v. 73, n. 1, p. 1-60, May 2004. ISSN 0301-0082. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15193778>>.

MURRAY, C. J.; AL, E. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **Lancet**, v. 380, n. 9859, p. 2197-223, Dec 2012. ISSN 1474-547X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23245608>>.

NEUHAUS, O. et al. Are statins a treatment option for multiple sclerosis? **The Lancet Neurology**, v. 3, n. 6, p. 369-371, 2004. ISSN 1474-4422. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(04\)00770-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(04)00770-7)>. Acesso em: 2017/01/25.

NEUVONEN, P. J.; NIEMI, M.; BACKMAN, J. T. Drug interactions with lipid-lowering drugs: Mechanisms and clinical relevance. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 80, n. 6, p. 565-581, 2006. ISSN 1532-6535. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.clpt.2006.09.003>>.

NGUGI, A. K. et al. Estimation of the burden of active and life-time epilepsy: a meta-analytic approach. **Epilepsia**, v. 51, n. 5, p. 883-90, May 2010. ISSN 1528-1167. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20067507>>.

OLIVEIRA, C. C. D. et al. Anticonvulsant activity of β -caryophyllene against pentylenetetrazol-induced seizures. **Epilepsy & Behavior**, v. 56, p. 26-31, 2016. ISSN 1525-5050. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.12.040>>. Acesso em: 2017/01/25.

OLIVEIRA, C. V. et al. Evaluation of potential gender-related differences in behavioral and cognitive alterations following pilocarpine-induced status epilepticus in C57BL/6 mice. **Physiol Behav**, v. 143, p. 142-50, May 2015. ISSN 1873-507X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25749198>>.

OSTERWEIL, E. K. et al. Lovastatin corrects excess protein synthesis and prevents epileptogenesis in a mouse model of fragile X syndrome. **Neuron**, v. 77, n. 2, p. 243-250, 2013. ISSN 0896-6273 1097-4199. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3597444/>>.

PAHAN, K. et al. Lovastatin and phenylacetate inhibit the induction of nitric oxide synthase and cytokines in rat primary astrocytes, microglia, and macrophages. **Journal of Clinical**

Investigation, v. 100, n. 11, p. 2671-2679, 1997. ISSN 0021-9738. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC508470/>>.

PARKKILA, S. et al. Serendipitous fragment-based drug discovery: ketogenic diet metabolites and statins effectively inhibit several carbonic anhydrases. **Chemical Communications**, v. 48, n. 29, p. 3551-3553, 2012. ISSN 1359-7345. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C2CC30359K>>.

PENG, W. et al. Impact of statins on cognitive deficits in adult male rodents after traumatic brain injury: a systematic review. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 261409, 2014. ISSN 2314-6141. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25157352>>.

PERENO, G. L.; BELTRAMINO, C. A. Differential role of gonadal hormones on kainic acid-induced neurodegeneration in medial amygdaloid nucleus of female and male rats. **Neuroscience**, v. 163, n. 3, p. 952-963, 2009. ISSN 0306-4522. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306452209011087>>.

PERUCCA, P.; CAMFIELD, P.; CAMFIELD, C. Does gender influence susceptibility and consequences of acquired epilepsies? **Neurobiology of disease**, v. 72, Part B, p. 125-130, 2014. ISSN 0969-9961. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096999611400134X>>.

PFIZER. Doing this differently. 2008. Disponível em: <[http://www\(pfizer.com/files/annualreport/2008/annual/review2008.pdf](http://www(pfizer.com/files/annualreport/2008/annual/review2008.pdf)>. Acesso em: 25 de janeiro.

PIERMARTIRI, T. C. et al. Atorvastatin prevents hippocampal cell death due to quinolinic acid-induced seizures in mice by increasing Akt phosphorylation and glutamate uptake. **Neurotox Res**, v. 16, n. 2, p. 106-15, Aug 2009. ISSN 1476-3524. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19526287>>.

PITKÄNEN, A. Drug-mediated neuroprotection and antiepileptogenesis: Animal data. **Neurology**, v. 59, n. 9 suppl 5, p. S27-S33, November 12, 2002 2002. Disponível em: <http://www.neurology.org/content/59/9_suppl_5/S27.abstract>.

PITKÄNEN, A.; HALONEN, T. Prevention of epilepsy. **Trends Pharmacol Sci**, v. 19, n. 7, p. 253-5, Jul 1998. ISSN 0165-6147. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9703755>>.

PITKÄNEN, A. et al. Gender issues in antiepileptogenic treatments. **Neurobiol Dis**, v. 72 Pt B, p. 224-32, Dec 2014. ISSN 1095-953X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24912075>>.

RACINE, R. J. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. **Electroencephalogr Clin Neurophysiol**, v. 32, n. 3, p. 281-94, Mar 1972. ISSN 0013-4694. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4110397>>.

RAVIZZA, T. et al. Inflammatory Response and Glia Activation in Developing Rat Hippocampus after Status Epilepticus. **Epilepsia**, v. 46, p. 113-117, 2005. ISSN 1528-1167. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1528-1167.2005.01006.x>>.

- RAVIZZA, T. et al. Innate and adaptive immunity during epileptogenesis and spontaneous seizures: Evidence from experimental models and human temporal lobe epilepsy. **Neurobiology of disease**, v. 29, n. 1, p. 142-160, 2008. ISSN 0969-9961. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0969996107001933>>.
- REISS, A. B.; WIRKOWSKI, E. Statins in Neurological Disorders: Mechanisms and Therapeutic Value. **TheScientificWorldJOURNAL**, v. 9, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1100/tsw.2009.141>>.
- ROGAWSKI, M. A.; LOSCHER, W. The neurobiology of antiepileptic drugs. **Nat Rev Neurosci**, v. 5, n. 7, p. 553-564, 2004. ISSN 1471-003X. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrn1430>>.
- ROOF, R. L.; HALL, E. D. Gender Differences in Acute CNS Trauma and Stroke: Neuroprotective Effects of Estrogen and Progesterone. **Journal of Neurotrauma**, v. 17, n. 5, p. 367-388, 2000/05/01 2000. ISSN 0897-7151. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1089/neu.2000.17.367>>. Acesso em: 2017/01/25.
- ROWAN, C. G. et al. Clinical importance of the drug interaction between statins and CYP3A4 inhibitors: a retrospective cohort study in The Health Improvement Network. **Pharmacoepidemiology and Drug Safety**, v. 21, n. 5, p. 494-506, 2012. ISSN 1099-1557. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/pds.3199>>.
- RUBIA, K. et al. Effects of age and gender on neural networks of motor response inhibition: From adolescence to mid-adulthood. **NeuroImage**, v. 83, p. 690-703, 2013. ISSN 1053-8119. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1053811913007210>>.
- RUSSO, E. et al. Pharmacodynamic potentiation of antiepileptic drugs' effects by some HMG-CoA reductase inhibitors against audiogenic seizures in DBA/2 mice. **Pharmacol Res**, v. 70, n. 1, p. 1-12, Apr 2013. ISSN 1096-1186. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23253428>>.
- SANDER, J. W. The epidemiology of epilepsy revisited. **Curr Opin Neurol**, v. 16, n. 2, p. 165-70, Apr 2003. ISSN 1350-7540. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12644744>>.
- SARKAR, S.; SCHMUED, L. C. Fluoro-Jade Dyes: Fluorochromes for the Histochemical Localization of Degenerating Neurons. **Fundamental Neuropathology for Pathologists and Toxicologists: Principles and Techniques** Hoboken, NJ, USA, 2011.
- SATO, R. Sterol metabolism and SREBP activation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 501, n. 2, p. 177-181, 2010. ISSN 0003-9861. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003986110002237>>.
- SAVIC, I.; ENGEL, J. Structural and functional correlates of epileptogenesis — Does gender matter? **Neurobiology of disease**, v. 70, p. 69-73, 2014. ISSN 0969-9961 1095-953X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5003532/>>.

SCHACHTER, M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 19, n. 1, p. 117-125, 2005. ISSN 1472-8206. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-8206.2004.00299.x>>.

SCHARFMAN, H. E.; MACLUSKY, N. J. Sex differences in the neurobiology of epilepsy: a preclinical perspective. **Neurobiol Dis**, v. 72 Pt B, p. 180-92, Dec 2014. ISSN 1095-953X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25058745>>.

SCHARFMAN, H. E. et al. A rat model of epilepsy in women: a tool to study physiological interactions between endocrine systems and seizures. **Endocrinology**, v. 150, n. 9, p. 4437-42, Sep 2009. ISSN 1945-7170. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19443573>>.

SCHEFFER, I. E. et al. **The organization of the epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology**. ILAE Commission on Classification and Terminology, p.17. 2013

SCICCHITANO, F. et al. Statins and epilepsy: preclinical studies, clinical trials and statin-anticonvulsant drug interactions. **Current Drug Targets**, v. 16, n. 7, p. 747-756, 2015. ISSN 1389-4501/1873-5592. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/node/129876/article>>.

SELLEY, M. L. Simvastatin prevents 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced striatal dopamine depletion and protein tyrosine nitration in mice. **Brain Research**, v. 1037, n. 1-2, p. 1-6, 2005. ISSN 0006-8993. Disponível em: <[//www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006899305000715](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006899305000715)>.

SLOVITER, R. S. The functional organization of the hippocampal dentate gyrus and its relevance to the pathogenesis of temporal lobe epilepsy. **Ann Neurol**, v. 35, n. 6, p. 640-54, Jun 1994. ISSN 0364-5134. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8210220>>.

SORTICA, V. D. A. **Investigação dos polimorfismos dos genes de polipeptídeos transportadores de ânions orgânicos (OATP) e a resposta ao tratamento com simvastatina**. 2009. 91 (DOUTORADO). Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SOWELL, E. R. et al. Sex Differences in Cortical Thickness Mapped in 176 Healthy Individuals between 7 and 87 Years of Age. **Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)**, v. 17, n. 7, p. 1550-1560, 2007. ISSN 1047-3211 1460-2199. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2329809/>>.

SPENCER, F. A. et al. Association of statin therapy with outcomes of acute coronary syndromes: The grace study. **Annals of Internal Medicine**, v. 140, n. 11, p. 857-866, 2004. ISSN 0003-4819. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.7326/0003-4819-140-11-200406010-00006>>.

SPRING, S.; LERCH, J. P.; HENKELMAN, R. M. Sexual dimorphism revealed in the structure of the mouse brain using three-dimensional magnetic resonance imaging. **NeuroImage**, v. 35, n. 4, p. 1424-1433, 2007. ISSN 1053-8119. Disponível em: <[//www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1053811907001334](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1053811907001334)>.

STABLES, J. P. et al. Therapy Discovery for Pharmacoresistant Epilepsy and for Disease-modifying Therapeutics: Summary of the NIH/NINDS/AES Models II Workshop. **Epilepsia**, v. 44, n. 12, p. 1472-1478, 2003. ISSN 1528-1167. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.0013-9580.2003.32803.x>>.

STANISLAUS, R. et al. Amelioration of experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats by lovastatin. **Neuroscience Letters**, v. 269, n. 2, p. 71-74, 1999. ISSN 0304-3940. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304394099004140>>.

SU, S. W. et al. Timing of ketogenic diet initiation in an experimental epilepsy model. **Developmental Brain Research**, v. 125, n. 1-2, p. 131-138, 2000. ISSN 0165-3806. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165380600001309>>.

TAN, C.-C. et al. NLRP1 inflammasome is activated in patients with medial temporal lobe epilepsy and contributes to neuronal pyroptosis in amygdala kindling-induced rat model.

Journal of Neuroinflammation, London, v. 12, p. 18, 2015. ISSN 1742-2094. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4314732/>>.

TELLEZ-ZENTENO, J. F. et al. Psychiatric Comorbidity in Epilepsy: A Population-Based Analysis. **Epilepsia**, v. 48, n. 12, p. 2336-2344, 2007. ISSN 1528-1167. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1528-1167.2007.01222.x>>.

TEMKIN, N. R. Antiepileptogenesis and Seizure Prevention Trials with Antiepileptic Drugs: Meta-Analysis of Controlled Trials. **Epilepsia**, v. 42, n. 4, p. 515-524, 2001. ISSN 1528-1167. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1046/j.1528-1157.2001.28900.x>>.

THURMAN, D. J. et al. Standards for epidemiologic studies and surveillance of epilepsy. **Epilepsia**, v. 52 Suppl 7, p. 2-26, Sep 2011. ISSN 1528-1167. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21899536>>.

TISON, F. et al. Simvastatin decreases levodopa-induced dyskinesia in monkeys, but not in a randomized, placebo-controlled, multiple cross-over (“n-of-1”) exploratory trial of simvastatin against levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease patients. **Parkinsonism & Related Disorders**, v. 19, n. 4, p. 416-421, 2013. ISSN 1353-8020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.parkreldis.2012.12.003>>. Acesso em: 2017/01/25.

TRINKA, E. et al. A definition and classification of status epilepticus--Report of the ILAE Task Force on Classification of Status Epilepticus. **Epilepsia**, v. 56, n. 10, p. 1515-23, Oct 2015. ISSN 1528-1167. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26336950>>.

TURSKI, W. A. et al. Seizures produced by pilocarpine in mice: A behavioral, electroencephalographic and morphological analysis. **Brain Research**, v. 321, n. 2, p. 237-253, 1984. ISSN 0006-8993. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/000689938490177X>>.

TURSKI, W. A. et al. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. **Behav Brain Res**, v. 9, n. 3, p. 315-35, Sep 1983. ISSN 0166-4328. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6639740>>.

UZÜM, G.; AKGÜN-DAR, K.; AKSU, U. The effects of atorvastatin on memory deficit and seizure susceptibility in pentylenetetrazole-kindled rats. **Epilepsy Behav**, v. 19, n. 3, p. 284-9, Nov 2010. ISSN 1525-5069. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20888302>>.

VAN DER MOST, P. J. et al. Statins: mechanisms of neuroprotection. **Prog Neurobiol**, v. 88, n. 1, p. 64-75, May 2009. ISSN 1873-5118. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19428962>>.

VAN VLIET, E. A. et al. Atorvastatin treatment during epileptogenesis in a rat model for temporal lobe epilepsy. **Epilepsia**, v. 52, n. 7, p. 1319-1330, 2011.

VAUGHAN, C. J.; DELANTY, N. Neuroprotective properties of statins in cerebral ischemia and stroke. **Stroke**, v. 30, n. 9, p. 1969-73, Sep 1999. ISSN 0039-2499. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10471452>>.

VEZZANI, A. Epilepsy and Inflammation in the Brain: Overview and Pathophysiology. **Epilepsy Currents**, v. 14, n. 1 Suppl, p. 3-7, Jan-Feb 2014. ISSN 1535-7597535-7511. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3966641/>>.

VEZZANI, A.; FRIEDMAN, A.; DINGLEDINE, R. J. The role of inflammation in epileptogenesis. **Neuropharmacology**, v. 69, p. 16-24, Jun 2013. ISSN 1873-7064. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22521336>>.

VEZZANI, A.; GRANATA, T. Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence. **Epilepsia**, v. 46, n. 11, p. 1724-43, Nov 2005. ISSN 0013-9580. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16302852>>.

VEZZANI, A. et al. Functional Role of Inflammatory Cytokines and Antiinflammatory Molecules in Seizures and Epileptogenesis. **Epilepsia**, v. 43, p. 30-35, 2002. ISSN 1528-1167. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1046/j.1528-1157.43.s.5.14.x>>.

VEZZANI, A.; VIVIANI, B. Neuromodulatory properties of inflammatory cytokines and their impact on neuronal excitability. **Neuropharmacology**, v. 96, Part A, p. 70-82, 2015. ISSN 0028-3908. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002839081400402X>>.

WALKER, M. Neuroprotection in epilepsy. **Epilepsia**, v. 48, p. 66-68, 2007. ISSN 1528-1167. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1528-1167.2007.01354.x>>.

WANG, L. et al. Time-course of neuronal death in the mouse pilocarpine model of chronic epilepsy using Fluoro-Jade C staining. **Brain Res**, v. 1241, p. 157-67, Nov 2008. ISSN 1872-6240. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18708038>>.

WANG, L. et al. Combined structural and resting-state functional MRI analysis of sexual dimorphism in the young adult human brain: An MVPA approach. **NeuroImage**, v. 61, n. 4, p. 931-940, 2012. ISSN 1053-8119. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1053811912003680>>.

WASTERLAIN, C. G.; SHIRASAKA, Y. Seizures, brain damage and brain development. **Brain and Development**, v. 16, n. 4, p. 279-295, 1994/07/01 1994. ISSN 0387-7604. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0387760494900256>>.

WEAVER, D. F. Epileptogenesis, Ictogenesis and the Design of Future Antiepileptic Drugs. **Canadian Journal of Neurological Sciences / Journal Canadien des Sciences Neurologiques**, Cambridge, UK, v. 30, n. 1, p. 4-7, 2003/002/001 2003. Disponível em: <<https://www.cambridge.org/core/article/div-class-title-epileptogenesis-ictogenesis-and-the-design-of-future-antiepileptic-drugs-div/5C1CFAB04C25C0CEE5C14D9F6ED9ABAB>>.

WHO. Epilepsy Fact sheet nº999. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/en/>, 2015. Acesso em: 25 de janeiro.

WIESER, H. G. **ILAE Commission Report. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis**. Jun, p.695-714. 2004. (0013-9580)

WILSON, S. J.; BAXENDALE, S. Reprint of: The new approach to classification: Rethinking cognition and behavior in epilepsy. **Epilepsy & Behavior**, v. 64, p. 300-303, 2016. ISSN 1525-5050. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.yebeh.2016.11.024>>. Acesso em: 2017/01/25.

WOLOZIN, B. et al. Decreased prevalence of alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors. **Archives of Neurology**, v. 57, n. 10, p. 1439-1443, 2000. ISSN 0003-9942. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1001/archneur.57.10.1439>>.

YACUBIAN, E. M. T. Proposta de Classificação das Crises e Síndromes Epilépticas. Correlação Videoeletrencefalográfica. **Rev Neurociencia**, v. 10, n. 2, p. 16, 2002.

YACUBIAN, E. M. T.; CAICEDO, G. C.; POHL, L. R., Eds. **Tratamento medicamentoso das epilepsias**. São Paulo: Leitura Médica Ltda., 2014ed. 2014.

YILMAZER-HANKE, D. M. et al. Subregional pathology of the amygdala complex and entorhinal region in surgical specimens from patients with pharmacoresistant temporal lobe epilepsy. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 59, n. 10, p. 907-20, Oct 2000. ISSN 0022-3069. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11079781>>.

ZEICHNER, S.; MIHOS, C. G.; SANTANA, O. The pleiotropic effects and therapeutic potential of the hydroxy-methyl-glutaryl-CoA reductase inhibitors in malignancies: a comprehensive review. **J Cancer Res Ther**, v. 8, n. 2, p. 176-83, 2012 Apr-Jun 2012. ISSN 1998-4138. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22842358>>.

ZEMAN A, J.-G. M., KAPUR N, Ed. **Epilepsy and Memory**: Oxford: Oxford University Pressed. 2012.

ZHANG, X. et al. Simvastatin inhibits secretion of Th17-polarizing cytokines and antigen presentation by DCs in patients with relapsing remitting multiple sclerosis. **European Journal of Immunology**, v. 43, n. 1, p. 281-289, 2013. ISSN 1521-4141. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/eji.201242566>>.

ANEXO A - Carta de aprovação da Comissão de ética no Uso de Animais da UFSM



ANEXO B - Carta de aprovação da Comissão de ética no Uso de Animais da UFSM



Comissão de Ética no Uso de Animais
da
Universidade Federal de Santa Maria

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do potencial efeito neuroprotetor da atorvastatina no modelo do status epilepticus induzido pela pilocarpina em camundongos C57BL/6", protocolada sob o CEUA nº 6165230415, sob a responsabilidade de **Mauro Schneider Oliveira** e equipe; Ana Claudia Beck Graunke; Clarissa Vasconcelos de Oliveira; Jéssica Grigoletto; Mauro Schneider Oliveira; Thalize Lopes de Souza - 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 Santa Maria (CEUA/UFSM) na reunião de 11/06/2015.

We certify that the proposal "Evaluation of potential neuroprotective effect of atorvastatin in model of status epilepticus pilocarpine-induced in C57BL/6 mice", utilizing 252 Isogenics mice (males and females), protocol number CEUA 6165230415, under the responsibility of **Mauro Schneider Oliveira** and team; Ana Claudia Beck Graunke; Clarissa Vasconcelos de Oliveira; Jéssica Grigoletto; Mauro Schneider Oliveira; Thalize Lopes de Souza - 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 Santa Maria (CEUA/UFSM) in the meeting of 06/11/2015.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 06/2015 a 07/2018

Área: Fisiologia E Farmacologia

Origem: Biotério Central UFSM
 Espécie: Camundongos isogênicos
 Linhagem: C57BL/6

sexo: Machos e Fêmeas idade: 60 a 60 dias N: 252
 Peso: 25 a 25 g