



Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Departamento de Farmácia

JÚLIA AKEMI KOZUMA

**Efeito do peptídeo neurovespina livre e nanoencapsulado em processos
epileptogênicos**

Brasília
2024

JÚLIA AKEMI KOZUMA

**Efeito do peptídeo neurovespina livre e nanoencapsulado em processos
epileptogênicos**

Trabalho de conclusão de curso apresentado como
requisito parcial para a obtenção do título de
Bacharel em Farmácia.

Orientador: Profa. Dra. Márcia Renata Mortari

Brasília

2024

JÚLIA AKEMI KOZUMA

**Efeito do peptídeo neurovespina livre e nanoencapsulado em processos
epileptogênicos**

Trabalho de conclusão de curso apresentado como
requisito parcial para a obtenção do título de
Bacharel em Farmácia.

Data da aprovação: 03/09/2024

Profa. Dra. Márcia Renata Mortar — Orientadora
Universidade de Brasília (UnB)

Prof. Dr. Gabriel Avohay Alves Campos — Membro da Banca
Universidade de Brasília (UnB)

Dedico este trabalho à minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por me ter dado forças, perseverança e sabedoria para concluir este trabalho.

Agradeço aos meus pais e às minhas irmãs por tudo e por tanto, mas, sobretudo, por serem meu apoio e sempre acreditarem em mim.

Agradeço à professora Márcia, por ter aceitado me orientar e por ser um exemplo de cientista para mim.

Agradeço a todos do Laboratório de Neurofarmacologia (NeurofarmaLab), e de forma muito especial, a Valéria, Lari, Jéssica e Gabi.

Agradeço a todos os outros não citados, mas que fizeram este trabalho ser possível.

“Tranque suas bibliotecas, se quiser; mas não há portão, fechadura, ferrolho que você possa colocar na liberdade da minha mente.”

Virgínia Woolf

RESUMO

A epilepsia é um transtorno cerebral crônico caracterizado por uma predisposição persistente na geração de crises epiléticas. Possui etiologias diversas, incluindo fatores estruturais, genéticos, infecciosos, metabólicos, imunológicos e causas desconhecidas. Afeta mais de 50 milhões de pessoas no mundo todo e aproximadamente 2% da população brasileira. Cerca de um terço dos pacientes desenvolvem resistência aos medicamentos anticonvulsivantes, sendo que a Epilepsia do Lobo Temporal é frequentemente associado a crises refratárias e é a causa mais frequente de epilepsia focal em adultos. A esclerose hipocampal, que leva a perda de células piramidais – principalmente em CA1, neuroinflamação, astrogliose reativa, perda neuronal e reorganização de sinapses são achados da Epilepsia do Lobo Temporal. A identificação dessas alterações morfológicas pode ser realizada através de técnicas histológicas e de imunofluorescência, com o emprego de coloração de Nissl e marcações com anticorpos anti-proteína ácida fibrilar glial (GFAP). Uma vez que a epilepsia resulta em diversas consequências neurológicas, cognitivas, psicológicas e sociais, novos tratamentos, sobretudo para casos refratários, são necessários. Assim, pesquisas para a descoberta de novas moléculas estão em constante progresso e a investigação do potencial farmacológico de peçonhas animais vem ganhando destaque. Dentre essas novas moléculas, o peptídeo neurovespina, análogo Occidentalina-1202, que é derivado da peçonha da vespa *Polybia occidentalis*, apresenta um efeito neuroprotetor e anticonvulsivante. Através de alterações que visam a melhoria da estabilidade do composto, por meio da nanotecnologia, a neurovespina foi nanoencapsulada. O presente trabalho avaliou a atividade do peptídeo em astrócitos e neurônios do hipocampo, nas regiões CA1, CA3 e giro denteado, em sua forma livre e nanoencapsulada, em um modelo animal crônico de Epilepsia do Lobo Temporal induzida por pilocarpina através do uso da coloração de Nissl e GFAP. Os resultados do estudo revelarem uma necessidade de aperfeiçoamento das técnicas de análise, tanto da perda neuronal, quanto da astrogliose.

Palavras-chave: Epilepsia do Lobo Temporal; astrogliose; neurovespina.

ABSTRACT

Epilepsy is a chronic brain disorder characterized by a persistent predisposition to generate epileptic seizures. It has diverse etiologies, including structural, genetic, infectious, metabolic, immunological factors, and unknown causes. It affects more than 50 million people worldwide and approximately 2% of the Brazilian population. About one-third of patients develop resistance to anticonvulsant drugs, with Temporal Lobe Epilepsy often associated with refractory seizures and being the most common cause of focal epilepsy in adults. Hippocampal sclerosis, leading to pyramidal cell loss—mainly in CA1—neuroinflammation, reactive astrogliosis, neuronal loss, and synaptic reorganization are findings of Temporal Lobe Epilepsy. Identifying these morphological changes can be performed using histological and immunofluorescence techniques, with Nissl staining and anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP) antibody labeling. Since epilepsy results in various neurological, cognitive, psychological, and social consequences, new treatments, especially for refractory cases, are necessary. Therefore, research for the discovery of new molecules is constantly progressing, and the investigation of the pharmacological potential of animal venoms has been gaining prominence. Among these new molecules, the neurovespin peptide, Occidentalins-1202 analog, derived from the venom of the wasp *Polybia occidentalis*, exhibits neuroprotective and anticonvulsant effects. Through modifications aimed at improving the compound's stability via nanotechnology, neurovespin was nanoencapsulated. The present work evaluated the activity of the peptide in astrocytes and neurons of the hippocampus, in the CA1, CA3 regions, and dentate gyrus, in its free and nanoencapsulated form, in a chronic animal model of Temporal Lobe Epilepsy induced by pilocarpine using Nissl staining and GFAP. The study's results revealed a need for improvement in the analysis techniques employed, both for neuronal loss and astrogliosis.

Keywords: Temporal Lobe Epilepsy; astrogliosis; neurovespine;

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Imagem da formação hipocampal, na qual é possível observar o giro denteado e as regiões CA1, CA2 e CA3. (retirado de H. Schröder *et al.*, 2020). 15

Figura 2 - Formação hipocampal obtida do encéfalo de um camundongo, na qual é possível identificar as distintas camadas que compõem o corno de Ammon (CA) e o giro denteado (GD). No CA, podem ser visualizadas as camadas *stratum oriens* (SO), *stratum pyramidalis* (SP), *stratum radiatum* (SR) e *stratum lacunosum-moleculare* (SLM). Já no GD, são evidentes a camada molecular (SM), a camada granular (SG) e a camada polimórfica (Hi)..... 16

Figura 3 - Esquema ilustrativo demonstrando a indução do SE, que ocorreu no dia 1, e o esquema do tratamento dos diferentes grupos, que iniciou no dia 15 e terminou no dia 30. Criado com BioRender.com.....22

Figura 4 - Esquema ilustrativo demonstrando o processo de perfusão, coleta e armazenamento dos encéfalos de camundongos, seguido pela secção dos mesmos utilizando o criostato.....23

Figura 5- Desenho esquemático ilustrativo do protocolo experimental para imunofluorescência de GFAP e coloração de Nissl. Criado com BioRender.com.25

Figura 6 – Foram obtidas imagem do hipocampo nas três fatias de encéfalo marcado e montado na lâmina, em cada fatia nos hemisférios direito e esquerdo e em cada um dos lados foram registradas três imagens, de três áreas do hipocampo: 1 – CA3, 2 – CA1 e 3 – GD. As marcações em vermelho (Nissl) mostram neurônios, em verde (GFAP) indicam astrocitos e em azul (DAPI) núcleo celular. Criado com BioRender.com.....26

Figura 7 - Contagem de células por unidade de área (μm^2) em diferentes regiões do hipocampo coradas com Nissl Vermelho, em seis grupos experimentais: Naive, Sadio, Epiléptico, Neurovespina, Diazepam, Nano Branco, e Nano Neurovespina. Em (A) não foi encontrada uma diferença significativamente estatística, em (B) observa-se uma redução na densidade neuronal no grupo neurovespina e em (C) observa-se uma diferença significativamente estatística entre os grupos nanovespina livre e nanoencapsulada. (*) Diferença estatisticamente significativa.....29

Figura 8 - Região CA3 evidenciando células piramidais coradas com Nissl Vermelho, em um aumento de 200x, mostrando os grupos: (A) Naive; (B) Sadio; (C) Epiléptico; (D) Neurovespina; (E) Diazepam; (F) Nano Branco; (G) Neurovespina nanoencapsulada.....30

Figura 9 - Região CA1 evidenciando células piramidais coradas com Nissl Vermelho, em um aumento de 200x, mostrando os grupos: (A) Naive; (B) Sadio; (C) Epiléptico; (D) Neurovespina; (E) Diazepam; (F) NanoBranco; (G) Neurovespina nanoencapsulada.....32

Figura 10 - Densidade de astrócitos em CA1. Em (A) não foi encontrada uma diferença significativamente estatística entre os grupos e em (B) observa-se que o grupo NanoBranco possui uma maior densidade de astrócitos em relação aos grupos neurovespina, sadio e naive.....33

Figura 11 - Expressão de GFAP, um marcador de astrogliose, quantificada em densidade de astrócitos em diferentes camadas do GD do hipocampo de camungondos de diferentes grupos experimentais: naive, sadio, epiléptico, neurovespina, diazepam, nano branco e nano neurovespina. Em (A) apresenta a quantificação da densidade de astrócitos na camada molecular, onde não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais. E em (B) que é a densidade de astrócitos na camada granular, foi observado um aumento significativo na expressão de GFAP no grupo nano branco em relação ao naive.....33

Figura 12- Região CA1 marcada com Nissl (vermelho), GFAP (verde) e DAPI (azul), em um aumento de 200x, mostrando os grupos: (A) Naive; (B) Sadio; (C) Epiléptico; (D) Neurovespina; (E) Diazepam; (F) Nano Branco; (G) Neurovespina nanoencapsulada. As marcações em vermelho indicam neurônios, pode se observar que essas células compõe a camada de células piramidais da região CA1. As marcações em verde nas imagens, indicam astrócitos, pode-se observar que essas células se encontram em pequenas quantidade, ou até mesmo ausente em algumas imagens, na região de células piramidais. E em azul foi marcado núcleos celulares.35

Figura 13 - Região GD marcada com Nissl (vermelho), GFAP (verde) e DAPI (azul), em um aumento de 200x, mostrando os grupos: (A) Naive; (B) Sadio; (C) Epiléptico; (D) Neurovespina; (E) Diazepam; (F) Nano Branco; (G) Neurovespina nanoencapsulada. As marções em verde indicam astrócitos e agrupamentos de tons que variam do azul, roxo e rosa, indicam a camada granular do GD, essa cor é o resultado da sobreposição da coloração de Nissl (Vermelha) e do DAPI (azul).36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
BHE	Barreira hematoencefálica
CA	Corno de Ammon
EEG	Eletroencefalograma
ELT	Epilepsia do Lobo Temporal
ELTM	Epilepsia do Lobo Temporal Mesial
EH	Esclerose Hipocampal
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
i.p.	Intraperitoneal
PBS	Solução Tampão de Fosfato de Sódio
SE	<i>Status Epilepticus</i>
SG	Camada granular
SNC	Sistema nervoso central
SM	Camada molecular
SLM	<i>Stratum lacunosum-moleculare</i>
SO	<i>Stratum oriens</i>
SP	<i>Stratum pyramidalis</i>
SR	<i>Stratum radiatum</i>
OcTx-1202	Occidentalina-1202

SUMÁRIO

1 Introdução	13
1.1 Epilepsia.....	13
1.2 Epilepsia do Lobo Temporal.....	14
1.3 Hipocampo e a ELT.....	14
1.4 Astrócitos e epileptogênese.....	16
1.5 Tratamentos.....	18
2 Metodologia:	20
2.1 Animais:.....	20
2.2 Indução do Modelo de Epilepsia do Lobo Temporal.....	20
2.3 Tratamento.....	21
2.4 Análise Histológica.....	22
2.5 Imunofluorescência e coloração de Nissl.....	23
2.6 Análise de imagem.....	26
2.7 Análise Estatística.....	27
3. Resultado e Discussão	28
3.1 Análise do efeito neuroprotetor em CA1, CA3 e GD.....	28
3.2 – Análise da astrogliose em CA1 e GD.....	32
4 Conclusão	38
REFERÊNCIAS	39

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epilepsia

A epilepsia é um transtorno cerebral crônico conhecido há pelo menos 3 mil anos. Em um dos textos mais antigos da medicina ayurvédica, o Charaka Samhita (400 a.C), já havia descrições sobre sintomas, causas, diagnósticos e tratamento da doença. Na antiga região da Mesopotâmia, os babilônicos também fizeram relatos sobre a epilepsia, em tábuas que datam de 1067 a.C. Os gregos antigos acreditavam que a doença tinha origem divina, mas Hipócrates (400 a.C) associou a origem da doença a distúrbios físicos e Galeno (130–200 d.C.) deduziu que a epilepsia estava relacionada com o acúmulo de humores no cérebro (Pierce, 2002). No século XIX, os estudos de John Hughlings Jackson moldaram a compreensão moderna sobre a base neurológica da epilepsia (Magiorkinis, 2014).

Atualmente, a epilepsia é definida como uma desordem cerebral caracterizada por uma predisposição persistente na geração de crises epiléticas, que ocorrem de forma recorrente e imprevisível devido à atividade anormal, excessiva e síncrona de uma população de neurônios no sistema nervoso central. A epilepsia não constitui uma doença única, mas um conjunto de distúrbios que refletem uma disfunção cerebral e que necessita da ocorrência de pelo menos uma crise epilética para seu diagnóstico. Uma crise epilética é um evento transitório e súbito de uma descarga neuronal síncrona e excessiva, que pode manifestar-se mesmo na ausência de epilepsia, e pode afetar funções sensoriais, motoras, emocionais, estado de consciência ou comportamento (Fisher, 2005). Essas descargas neuronais anormais e excessivas tem como fisiopatologia um desequilíbrio entre processos excitatórios e inibitórios, mediados pelo glutamato e o ácido gama-aminobutírico (GABA), respectivamente, que pode ser secundário a rearranjos patológico da circuitaria neuronal (Mcnamara, 1994).

As causas da epilepsia são variadas e podem incluir doenças subjacentes, como acidente vascular cerebral, traumatismos ou infecções. Dependendo de sua etiologia, a epilepsia pode ser classificada em diferentes categorias: estrutural, genética, infecciosa, metabólica, imunológica e de etiologia desconhecida. Além da classificação etiológica, o tipo da epilepsia pode ser definido como: generalizada, focais, focais e generalizadas combinadas e desconhecidas. Na epilepsia

generalizada, o diagnóstico é feito com base em atividade generalizadas de espículas e ondas de eletroencefalograma (EEG) e pode incluir tipos variados de crise, como ausência e tônico-cônicas. A focal abrange distúrbios unifocais e multifocais, o diagnóstico é feito com base em sintomas clínicos e achados de EEG que mostram descargas epileptiformes focais. O tipo generalizado e focal combinada abrange pacientes que têm tanto crises generalizadas quanto focais e, por fim, o termo desconhecido é usado para casos em que não é possível determinar se a epilepsia é focal ou generalizada devido à falta de informações, como EEGs normais ou não conclusivos. (Scheffer, *et al.*, 2017)

1.2 Epilepsia do Lobo Temporal

A Epilepsia do Lobo Temporal (ELT) apresenta grande relevância, sendo a causa mais frequente de epilepsias focais em adultos, os lobos temporais são regiões vulneráveis a insultos, como hipoxia e traumatismo craniano, que podem levar a epileptogênese (Walker, 2015). Ela pode ser classificada clinicamente em Epilepsia do Lobo Temporal Mesial (ELTM) ou Epilepsia do Lobo Temporal lateral ou neocortical. A ELTM é a forma mais comum, ela envolve as estruturas medial e interna do lobo temporal e tem como manifestações clínicas comuns a presença de manifestações sensitivo-sensoriais, auras, que podem ocorrer de diversas formas, como através da sensação de náusea, medo, angústia (Fernandes, 2013). Já a epilepsia do lobo temporal lateral envolve as regiões externas e, também, apresenta auras como manifestação clínica (Charuta, *et al.*, 2019). A distinção clínica desses dois tipos é difícil, mas geralmente, paciente com a forma lateral apresentam auras auditivas antes das crises e a ELTM está associada a Esclerose Hipocampal (EH), neuroinflamação, astrogliose reativa, perda neuronal e reorganização de sinapses (Henning, *et al.*, 2023).

1.3 Hipocampo e a ELT

A formação hipocampal é uma região associada ao aprendizado, processamento da memória, navegação espacial e emoções. Os principais componentes da formação hipocampal são o giro denteado, hipocampo propriamente

dito e o subículo. O hipocampo propriamente dito tem como principal célula os neurônios piramidais e é subdividido em outras em três ou quatro regiões, a depender do autor, chamada de corno de Ammon - CA1, CA2 e CA3 (Figura 1).

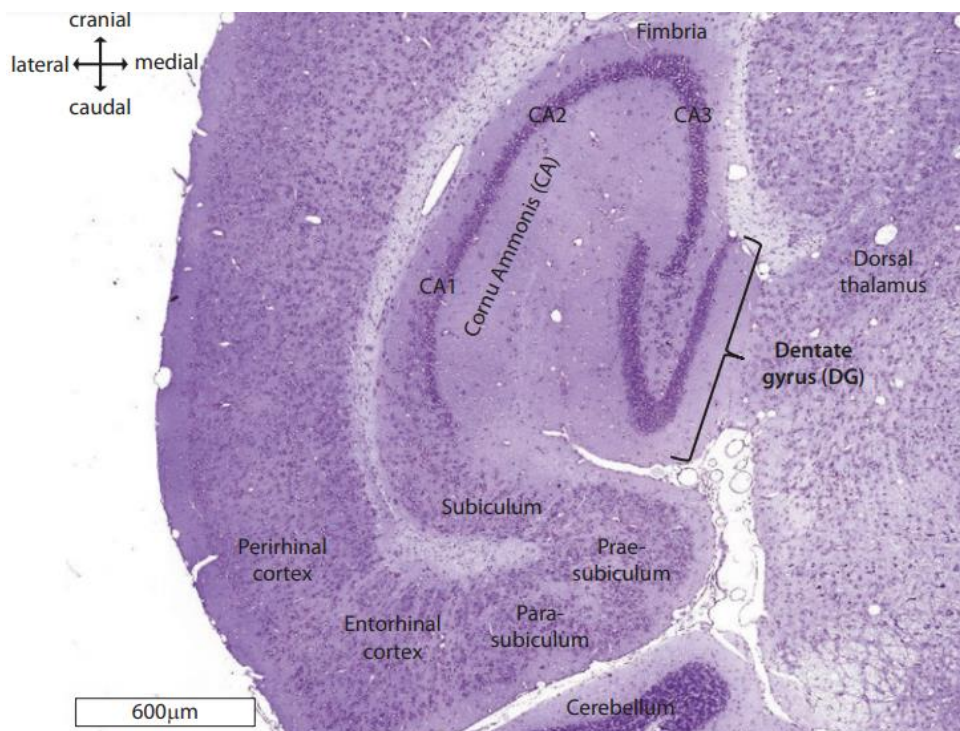


Figura 1- Imagem da formação hipocampal, na qual é possível observar o giro denteado e as regiões CA1, CA2 e CA3. (retirado de H. Schröder *et al.*, 2020).

A região do corno de Ammon é composta por outras diferentes camadas celulares: *stratum oriens* (SO), *stratum pyramidalis* (SP), *stratum radiatum* (SR) e *stratum lacunosum-moleculare* (SLM). Ramon y Cajal e Lorente de Nó chamaram a junção do *stratum radiatum* e do *stratum lacunosum-moleculare* de zona molecular. E o giro denteado é constituído pela camada molecular, camada granular e a camada polimorfica (hilus), o giro denteado é composto principalmente por células granulares (Figura 2) (Chauhan, *et al.*, 2021).

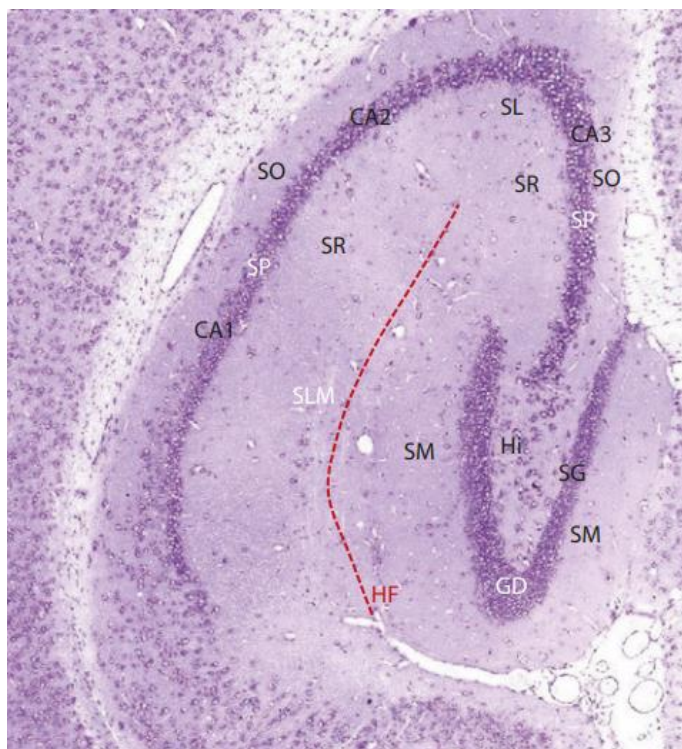


Figura 2 - Formação hipocampal obtida do encéfalo de um camundongo, na qual é possível identificar as distintas camadas que compõem o cornu de Ammon (CA) e o giro denteado (GD). No CA, podem ser visualizadas as camadas *stratum oriens* (SO), *stratum pyramidale* (SP), *stratum radiatum* (SR) e *stratum lacunosum-moleculare* (SLM). Já no GD, são evidentes a camada molecular (SM), a camada granular (SG) e a camada polimórfica (Hi).

Sommer, no século XIX, através de análises *post mortem*, observou que encéfalos de paciente epilépticos apresentavam uma perda de neurônios da formação hipocampal, sobretudo na região CA1, entretanto, além da degeneração dessa região, também foi observado perda celular na região CA3 e no giro denteado, além de dispersão de células granulares (Babb *et al.*, 1984; Dam, 1982).

O hipocampo é uma região sensível a insultos cerebrais e um dos achados histopatológicos mais comuns na ELTM é a esclerose hipocampal. A EH, tem uma grande relevância na ELT, estando presente em proximamente 10% das epilepsias focais em adultos e sendo associada a grande parte dos casos refratários. Além de se observar EH, caracterizada por perda de células piramidais, principalmente na região de CA1, na ELT também ocorre astrogliose, que pode causar impactos na conectividade neuronal (Curia, *et al.*, 2014; Sano, *et al.*, 2021).

1.4 Astrócitos e epileptogênese

A glia constitui a maior parte das células do sistema nervoso central (SNC) e, até recentemente, acreditava-se que seu papel se limitava ao suporte estrutural e funcional dos neurônios. No entanto, essa visão tem se transformado significativamente, com pesquisas revelando a importância crucial das células gliais em diversas doenças neurodegenerativas e no processo de epileptogênese.

A epileptogênese é caracterizada por alterações morfológicas e funcionais no ambiente celular cerebral, como a ativação de células gliais, perda de neurônios e remodelagem de sinapses, que predispõem o cérebro a gerar crises epiléticas. Novas evidências tem destacado o envolvimento das células gliais na epileptogênese e sua relevância como alvos potenciais para novas abordagens terapêuticas (Sano, 2021).

Os astrócitos são as células da glia mais abundantes do SNC, eles desempenham funções essenciais, como a regulação da barreira hematoencefálica (BHE), o fornecimento de suporte metabólico aos neurônios, a manutenção da homeostase iônica e a modulação da transmissão sináptica por meio da liberação de gliotransmissores e da regulação de neurotransmissores. Em resposta a estímulos danosos, como lesões ou doenças no SNC, os astrócitos passam por alterações morfológicas, moleculares e funcionais, adquirindo um estado reativo denominado astrogliose (Vezzani, 2022).

A astrogliose é uma resposta reativa dos astrócitos a lesões ou disfunções no SNC, caracterizada pela proliferação de astrócitos e formação de cicatrizes no tecido nervoso afetado. Sua principal função fisiológica é proteger o SNC, isolando as áreas lesionadas para evitar a propagação do dano, além de promover o reparo do tecido. A astrogliose envolve também o recrutamento de células imunes e a substituição dos neurônios lesados (Escartin *et al.*, 2021).

A proteína ácida fibrilar glial (GFAP) é um dos principais marcadores de astrogliose reativa. Essa proteína, que compõe os filamentos intermediários dos astrócitos, apresenta uma expressão aumentada após danos cerebrais e degeneração do SNC (Vezzani, 2022; Middeldorp, 2011).

Na epilepsia do lobo temporal (ELT), a astrogliose é uma característica comum da doença. Estudos de Sano *et al.* (2021) destacam que a astrogliose reativa, desencadeada pela atividade da micróglia, desempenha um papel significativo na

indução da epileptogênese. Além disso, pesquisas de Ding *et al.* (2007) apontaram que a astrogliose, subsequente ao SE, promove um aumento da sinalização astrocítica de cálcio e na liberação de glutamato que contribui para morte neuronal por excitotoxicidade.

1.5 Tratamentos

A epilepsia é uma condição que acarreta diversas consequências neurológicas, cognitivas, psicológicas e sociais e aumenta em até três vezes o risco de morte em pacientes afetados. Estima-se que cerca de 50 milhões de pessoas no mundo tenham epilepsia, sendo que aproximadamente 80% delas vivem em países em desenvolvimento, onde mais de 75% não recebem o tratamento necessário (WHO, 2019), no Brasil cerca de 2% da população tem a doença (Brasil, 2022).

Cerca de um terço dos pacientes com epilepsia desenvolvem resistência aos medicamentos anticonvulsivantes, um estado em que as crises não são totalmente controladas, mesmo com o uso de múltiplos medicamentos anticonvulsivantes. Essa resistência pode se manifestar desde o início da doença, surgir após um período inicial de controle, seguir um padrão flutuante, ou, em alguns casos, ser superada ao longo do tempo. As causas subjacentes a essa resistência permanecem em grande parte desconhecidas, o que ressalta a necessidade contínua de desenvolver novos tratamentos (Löscher, 2020).

Desta forma, considerando que a epilepsia acarreta diversos prejuízos, que vão além da saúde do paciente, novos tratamentos, sobretudo para casos refratários, são necessários. Pesquisas que visam descobrir novas moléculas estão em constante evolução, com destaque crescente para a investigação do potencial farmacológico das peçonhas animais.

As peçonhas de animais representam uma rica fonte de compostos bioativos, como aqueles produzidos por aranhas e vespas, cujas substâncias, quando isoladas, demonstraram atividades seletivas e específicas no sistema nervoso central, tornando-se potenciais alvos de investigação para o desenvolvimento de novos medicamentos destinados ao tratamento de distúrbios neurológicos (Belebony, *et al.*, 2004), como em estudos realizados por Mortari, *et al.* (2005), que investigou o uso da

peçonha desnaturada da vespa social *Polybia occidentalis* e que demonstrou atividade anticonvulsivantes.

Pesquisas subsequentes isolarem o peptídeo neuroativo Occidentalina-1202 (OcTx-1202) da peçonha de *Polybia occidentalis* e demonstraram sua capacidade de atravessar a BHE, além de apresentarem seus efeitos anticonvulsivantes em modelos agudos e crônicos, e um potencial efeito neuroprotetor (Mortari, 2007; Mortari *et al.*, 2023). Posteriormente, foi desenvolvido um análogo do OcTx-1202, o peptídeo neurovespina, que possui características mais apolares, resultando em maior afinidade pela barreira hematoencefálica (BHE) (Mortari; Carneiro, 2014). Em estudos recentes foi desenvolvida uma nanoemulsão como peptídeo neurovespina, que foi testado em um modelo crônico de ELT induzida por pilocarpina (Marques, 2024).

Considerando a necessidade de desenvolver novos fármacos para o tratamento da ELT, especialmente em casos refratários, e o efeito neuroprotetor e anticonvulsivante da peçonha da vespa *Polybia occidentalis*, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do peptídeo neurovespina, análogo de uma substância derivada da peçonha dessa vespa, em suas formas livre e nanoencapsulada, nos processos epileptogênicos. A investigação desses processos foi realizada por meio da análise do dano neural, utilizando coloração de Nissl, e da astrogliose reativa, por imunomarcagem com GFAP. A hipótese é de que o tratamento com neurovespina possa reduzir tanto o dano neural quanto a reatividade astrocitária, já que a astrogliose está associada a uma resposta a um dano neural, levando a formação de cicatrizes no tecido nervoso lesionado.

2 METODOLOGIA:

2.1 Animais:

Utilizou-se no modelo experimental camundongos, *Mus musculus*, da linhagem Swiss, provenientes do biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (IB/UnB). Todos os procedimentos realizados envolvendo camundongos cumpriram com as diretrizes de bem-estar de animais de laboratório, seguindo os Princípios Éticos na Experimentação Animal, estabelecidos pelo Conselho Nacional de Controle na Experimentação Animal (CONCEA) de 2008, além do cumprimento da legislação vigente, Lei Arouca (Lei 11.794/2008). Além disso, o projeto foi aprovado pela Comissão de Experimentação e Uso Animal (CEUA), protocolo nº 23106.104582/2020-71 da CEUA-UnB

Os camundongos utilizados no experimento eram machos, com idade entre 5 e 6 semanas, e peso entre 30 e 40 g. Eles foram mantidos em caixas de polipropileno, alimentados com ração específica (Labina) e água *ad libitum*. Os animais estavam alojados no biotério do IB/UnB, sob condições controladas de temperatura (22 °C), umidade (55%) e ciclo claro/escuro de 12 horas.

2.2 Indução do Modelo de Epilepsia do Lobo Temporal

O modelo crônico de ELT induzido por pilocarpina (via i.p.) foi o utilizado para avaliar a atividade astrocitária e efeitos neuroprotetores advindo do tratamento da neurovespina, em suas versões livre e nanoencapsuladas. O protocolo usado para esse modelo foi baseado em estudos realizados no Laboratório de Neurofarmacologia (NeuropharmaLab) da UnB.

Para a indução do insulto inicial foi administrado um agonista dos receptores colinérgicos muscarínicos, o cloridrato de pilocarpina (150 mg/Kg, via i.p.; Sigma-Aldrich®, EUA), solubilizado em solução salina (NaCl 150 mM). A pilocarpina é um alcaloide colinomimético de ação direta que se liga aos receptores muscarínicos, ativando-os. Quando administrada por via intraperitoneal, pode induzir *status epilepticus* (SE) devido à ativação excessiva dos receptores colinérgicos em neurônios excitatórios.

Em um intervalo de 15 a 30 minutos, anteriores a aplicação da pilocarpina, foi administrado butilbrometo de escopolamina, antagonista de receptores muscarínicos, (4mg.Kg⁻¹; Boehringer Ingelheim, Brasil). Devido aos efeitos periféricos significativos da pilocarpina, é utilizado um antagonista muscarínicos previamente com o intuito de bloqueia os receptores colinérgicos muscarínicos e a escolha da escopolamina é justificada, porque além de ser um anticolinérgico é um fármaco que não atravessa a BHE, não prejudicando a indução do SE pela pilocarpina e reduzindo efeitos periféricos. A dose da pilocarpina foi escolhida com base em experimentos anteriores e após a administração do fármaco que gerou o SE os animais foram mantidos sob observação.

A interrupção das crises geradas pelo SE ocorreu 180 minutos após seu início, através da administração de isoflurano, pela via inalatória, a uma taxa de 4%.

Após a indução do SE e a recuperação dos camundongos, eles foram mantidos no biotério sob condições de bem-estar por um período de 15 dias, período latente, antes de iniciar o tratamento, no período crônico.

O período latente, que durou 15 dias, corresponde ao intervalo entre a indução do SE, no dia 1, e o início do tratamento, no dia 15. Esse intervalo é uma fase crítica na qual ocorrem alterações neuropatológicas. Após esse período, inicia-se a fase crônica, que é o período de tratamento, ocorrendo do dia 15 ao dia 30. No dia 30, os animais foram submetidos à eutanásia.

2.3 Tratamento

O tratamento ocorreu diariamente e foi realizado no período crônico, do 15^o ao 30^o dia após o insulto inicial. Os animais foram agrupados em 7 grupos: naive, sadio, epilético, neurovespina, diazepam, nano branco e nano neurovespina (NE). Esses grupos receberam diferentes tratamentos, com exceção do grupo naive, que não foi tratado.

O grupo sadio e o epilético receberam solução salina (NaCl 150mM, s.c.), grupo neurovespina recebeu o peptídeo neurovespina (4 mg/Kg, s.c.), o grupo diazepam recebeu diazepam (Compaz®; 4 mg/kg, s.c.), o grupo nano branco recebeu nanopartículas base (20µg/animal, i.n.) e no grupo nanoNE foi administrado

neurovespina nanoencapsulado (20 μ g/animal, i.n.) (Figura 3). Marques (2024) desenvolveu a nanoemulsão com o neuropeptídeo neurovespina.

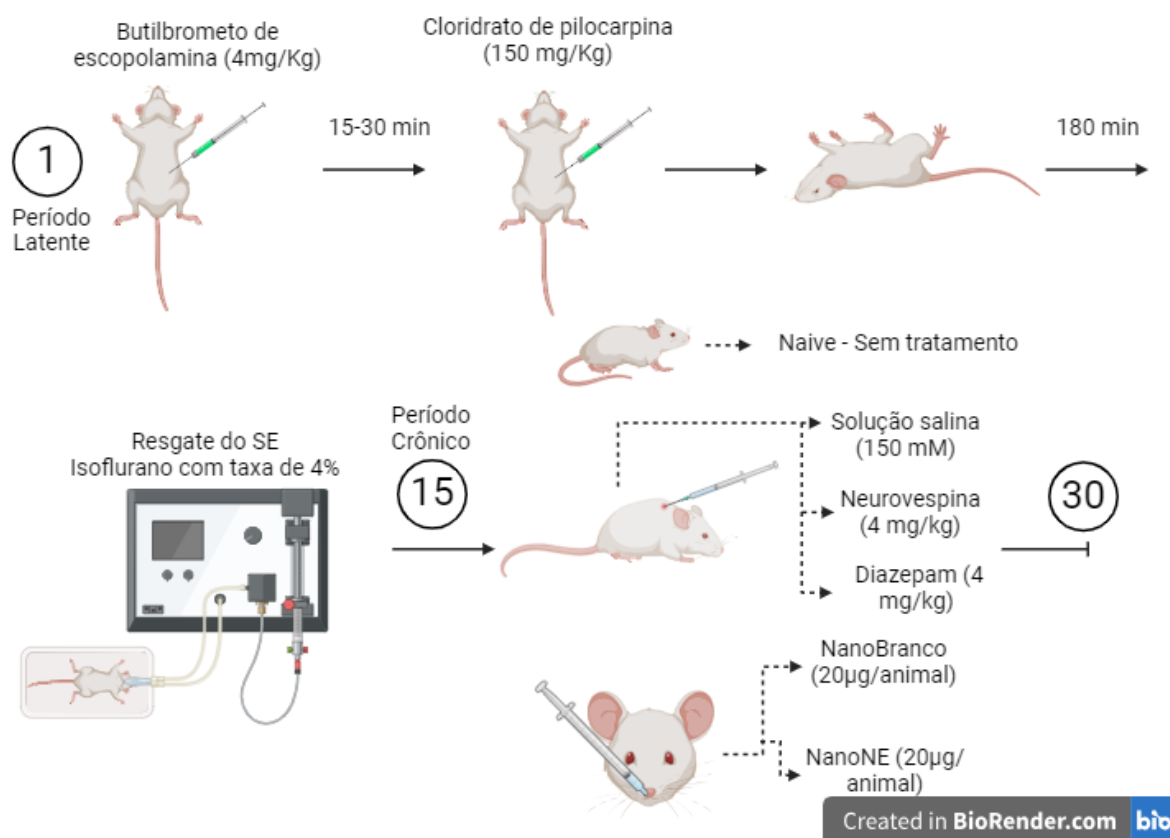


Figura 3 - Esquema ilustrativo demonstrando a indução do SE, que ocorreu no dia 1, e o esquema do tratamento dos diferentes grupos, que iniciou no dia 15 e terminou no dia 30. Criado com BioRender.com.

2.4 Análise Histológica

No último dia do período crônico, o 30º dia após o insulto inicial, os animais foram profundamente anestesiados com tiopental sódico (120 mg/Kg, i.p, Cristália, Brasil) e após certificar-se que os animais não respondiam mais a estímulos dolorosos e estavam profundamente anestesiados, foi realizada a abertura da cavidade torácica e a exposição do coração. Assim, foi injetado solução tampão de fosfato de sódio (PBS) no ventrículo cardíaco esquerdo com o auxílio de uma agulha conectada a uma seringa, em seguida, no mesmo local, foi adicionado uma solução fixadora, 4% de formaldeído diluído em PBS. Após a perfusão, os encéfalos foram removidos e armazenados em formaldeído a 4%, em temperatura de 4 °C, posteriormente, foram

imersos em solução desidratante de sacarose 30% (Sigma-Aldrich®, EUA), diluída em PBS e após 48 horas, foram congelados, submersos em isopentano por 20 segundos, e armazenados a temperatura de -80°C (Figura 4).

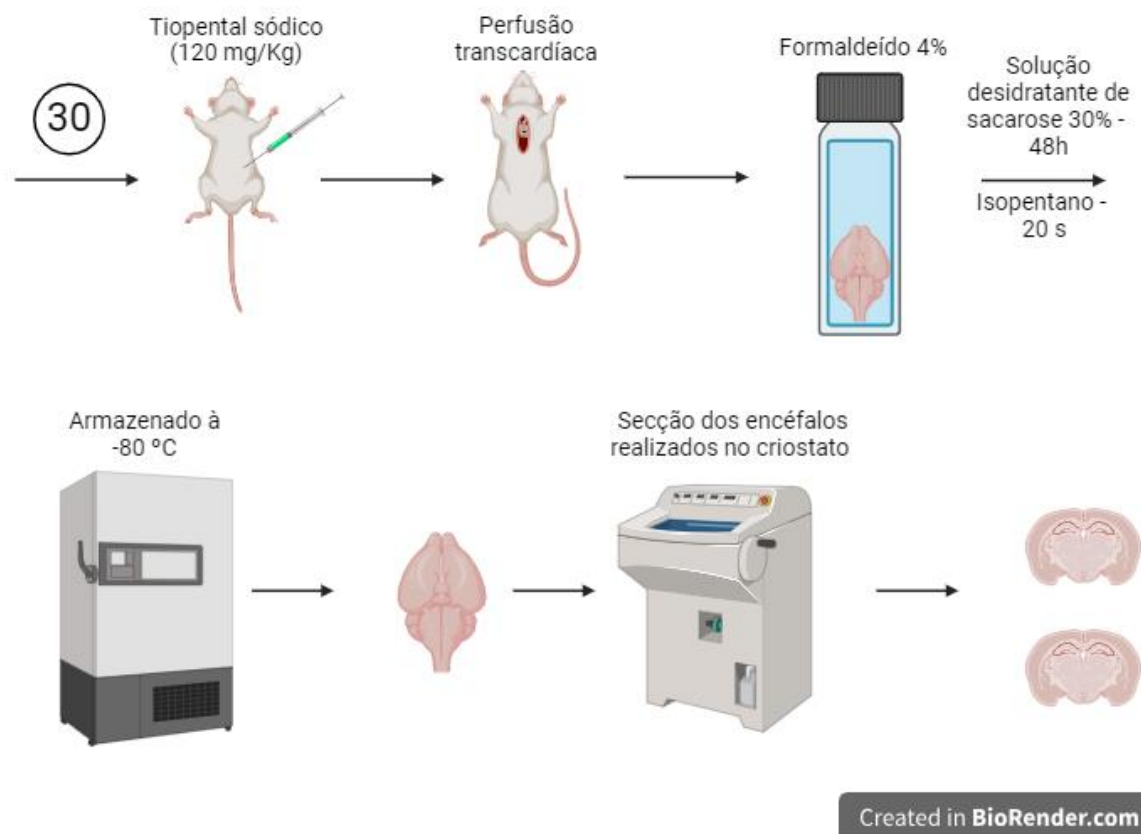


Figura 4 - Esquema ilustrativo demonstrando o processo de perfusão, coleta e armazenamento dos encéfalos de camundongos, seguido pela secção dos mesmos utilizando o criostato.

As secções dos encéfalos foram realizados utilizando o criostato (modelo CM1850, da Leica), foi utilizado o Atlas Estereotáxico de Paxinos & Franklin (2001), com cortes situados entre 1,6 e -2,8 mm, como referência para se obter a região da formação hipocampal. Foram obtidos cortes coronais, com $30\ \mu\text{m}$ de espessura, que foram armazenados em placas de 24 poços, identificadas, imersos em solução anti-congelante (solução de 19,5g de sacarose diluída em 50 mL de PBS e 30 mL de etilenoglicol) e refrigeradas em temperatura de 4°C .

2.5 Imunofluorescência e coloração de Nissl

A imunofluorescência é uma técnica usada para identificar antígenos específicos em tecidos, explorando as propriedades químicas do sistema imunológico e utilizando anticorpos ligados a um corante fluorescente (Potts, 2020), foi utilizado nessa técnica anticorpos anti-GFAP, o GFAP é uma proteína de filamento intermediário dos astrócitos e que tem sua expressão aumentada relacionada a astrogliose, que é um achado importante na ELT (Vezzani, 2022; Middeldorp, 2011).

A coloração de Nissl é uma técnica histológica amplamente utilizada para evidenciar os corpúsculos de Nissl, que são estruturas basofílicas localizadas no citoplasma dos neurônios. Esses corpúsculos são compostos principalmente por retículo endoplasmático rugoso (RER) e ribossomos. Tradicionalmente, o corante violeta de cresil é empregado para visualizar os corpúsculos de Nissl em microscopia de campo claro. No entanto, neste estudo, foram aplicadas técnicas de marcação fluorescente para a coloração de Nissl. Essa abordagem foi adotada com o objetivo de evitar a interferência que a coloração convencional poderia causar na visualização do outro marcador, o GFAP (Alvarez-Buylla, 1990).

Para realizar a coloração dos tecidos em técnicas de imuno-histoquímica, podem ser adotadas duas abordagens diferente. A primeira consiste em montar os cortes de tecido diretamente em lâminas de vidro, enquanto a segunda utiliza a técnica de free-floating, onde os cortes são mantidos em uma solução durante o processo. Esta última abordagem é recomendada para secções mais espessas, entre 40-50 μm , pois permite uma penetração mais eficiente dos anticorpos no tecido (Potts, 2020).

A imunofluorescência foi conduzida em conjunto com a coloração de Nissl, de acordo com protocolos estabelecidos no NeuropharmaLab – UnB, utilizando a técnica de free-floating. A coloração de Nissl foi empregada com o objetivo de identificar e avaliar a presença de esclerose hipocampal, uma alteração neuropatológica frequentemente associada à epilepsia do lobo temporal. Paralelamente, o marcador GFAP foi utilizado para a visualização dos astrócitos, além disso foi realizada a coloração com 4',6-Diamidino-2-fenilindol (DAPI), que se liga ao DNA e é muito utilizado como contracorantes em imunofluorescências.

Desta forma, depois que as fatias de encéfalo foram selecionadas e lavadas com PBS, foi realizado a etapa de bloqueio e permeabilização, com PBST 0,8% + Protein Block por 2 horas, seguidas de duas lavagens com PBS. Em seguida, o anticorpo primário anti-GFAP (na concentração 1:250) foi aplicado por 48 horas para

a marcação específica dos astrócitos, seguido por três lavagens com PBS. O anticorpo secundário Alexa Fluor 488 (concentração 1:400) foi então adicionado por 2 horas e novamente as secções são lavadas três vezes com PBS. A coloração de Nissl foi realizada por 1 hora, seguida por três lavagens em PBS. Finalmente, as fatias foram montadas em lâminas de vidro com DAPI, um marcador de núcleo celular, por 5 minutos, sendo, por fim, preparadas para observação e análise sob microscopia de fluorescência (Figura 5).

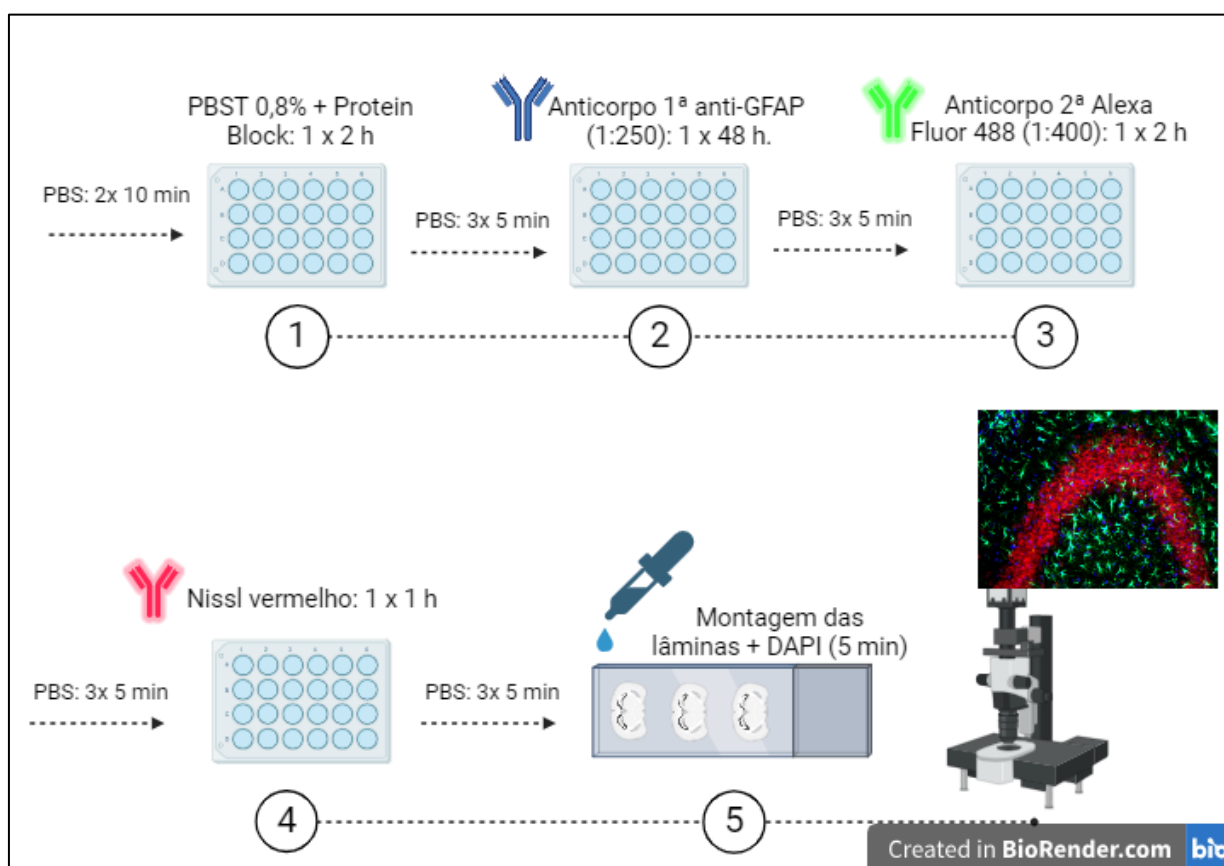


Figura 5- Desenho esquemático ilustrativo do protocolo experimental para imunofluorescência de GFAP e coloração de Nissl. Criado com BioRender.com.

O processo de permeabilização e bloqueio foi realizado utilizando protein block (solução de PBS contendo 22% de BSA - albumina sérica bovina, 2M de glicina, 10% de leite desnatado em pó -Molico e Tween 20) com 0,8% de Triton X-100. Esta etapa visa permeabilizar as membranas celulares, permitindo que os anticorpos acessem tanto proteínas localizadas no interior das células quanto proteínas transmembrana. O bloqueio é realizado para prevenir ligações inespecíficas dos anticorpos.

A incubação do anticorpo primário anti-GFAP policlonal (1:250; Invitrogen, Estados Unidos) foi feita após diluição em protein block. A diluição do anticorpo secundário Alexa Fluor® 488 (1:400; Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Estados Unidos) foi realizada em PBS com 1% de BSA (albumina sérica bovina), enquanto a diluição do Nissl vermelho NeuroTrace™ 530/615 (1:100; Invitrogen, Estados Unidos) foi feita em PBS.

2.6 Análise de imagem

As imagens utilizadas neste estudo foram obtidas por meio de um microscópio óptico Leica (modelo DM2000), com objetivas de 20x e acoplado a uma câmera de vídeo digital (Leica DFC 310 FX). A captura das imagens foi realizada com o auxílio do software Leica Las V4.1.0, fornecido pela Leica Microsystems.

Para a captura das imagens, foi selecionado a região da formação hipocampal, obtendo imagens das regiões CA1, CA3 e GD. Além disso, foram obtidas imagens de ambos os hemisférios cerebrais, cobrindo as três regiões de cada lâmina analisada (Figura 6).

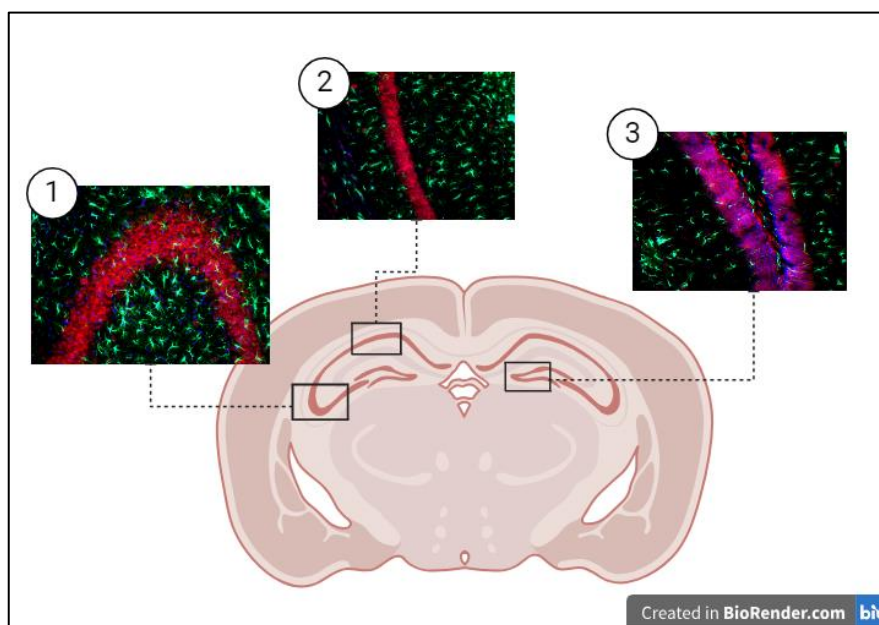


Figura 6 – Foram obtidas imagem do hipocampo nas três fatias de encéfalo marcado e montado na lâmina, em cada fatia nos hemisférios direito e esquerdo e em cada um dos lados foram registradas três imagens, de três áreas do hipocampo: 1 – CA3, 2 – CA1 e 3 – GD. As marcações em vermelho (Nissl) mostram neurônios, em verde (GFAP) indicam astrocitos e em azul (DAPI) núcleo celular. Criado com BioRender.com.

Foram capturadas imagens individuais para cada uma das marcações, GFAP, Nissl e DAPI. Essas imagens foram obtidas separadamente para garantir a visualização das estruturas específicas marcadas por cada técnica. Posteriormente, as três imagens foram sobrepostas utilizando o software Leica Las V4.1.0, permitindo a integração das diferentes marcações em uma única imagem composta.

Para a análise das imagens, foi utilizado o software ImageJ, que serviu para quantificar o número de células, tanto astrócitos quanto neurônios. As imagens marcadas com Nissl foram selecionadas para avaliar o dano neuronal, contabilizando o número de neurônios nas regiões do *stratum pyramidalis* (SP) nas áreas CA1 e CA3, assim como na camada granular do giro denteado (GD). A análise da astrogliose foi realizada por meio de imagens obtidas com a marcação GFAP, onde foi feita a contagem dos astrócitos nas regiões do *stratum radiatum* (SR) e do *stratum lacunosum-moleculare* (SLM) em CA1. No GD, a avaliação foi feita na camada molecular.

Além de realizar a contagem do número de neurônios e astrócitos, o software foi utilizado para definir a área correspondente a cada contagem. Com esses dados, foi possível calcular a densidade neuronal e a densidade de astrócitos, expressas como o número de células por micrômetro quadrado (células/ μm^2).

2.7 Análise Estatística

Para a análise estatística dos dados relacionados à densidade de neurônios e astrócitos, foi utilizado o software GraphPad Prism 8.4.2. Inicialmente, os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk, o qual indicou uma distribuição normal. Como os dados apresentavam distribuição normal e o intuito era comparar três ou mais grupos independentes por meio de uma variável quantitativa foi empregado análise de variância de uma via (ANOVA). Após a ANOVA, realizou-se o Teste de Comparações Múltiplas de Tukey para identificar diferenças significativas entre os grupos. O tamanho amostral (N) foi de 4 para os grupos naive, sadio, epiléptico, neurovespina, nano branco e nanoNE, e de 3 para o grupo diazepam.

3. RESULTADO E DISCUSSÃO

3.1 Análise do efeito neuroprotetor em CA1, CA3 e GD

A análise estatística da densidade neuronal na região do GD não revelou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos comparados (Figura 7). Estudos, como o de Noebels (2024), indicam que a esclerose hipocampal (EH), o achado histopatológico mais comum na ELT, geralmente apresenta uma perda celular acentuada no CA1, enquanto as células granulares do GD tendem a ser preservadas. Essa preservação de células granulares observada em quase todos os subtipos de EH pode justificar a ausência de diferenças estatísticas significativas na contagem de neurônios entre os grupos na região do GD.

Os dados referentes à densidade neuronal na região CA3 indicam uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados com neurovespina e neurovespina nanoencapsulada, enquanto os demais grupos não apresentaram diferenças significativas entre si. Na região CA1, a diferença estatística foi observada apenas entre os grupos naive e neurovespina (Figura 7). Estudos de Marques (2024), que utilizaram os mesmos tratamentos que o deste trabalho e o mesmo modelo de ELT induzido por pilocarpina, encontraram diferenças significativas na densidade óptica de neurônios piramidais entre os grupos epilético e neurovespina nanoencapsulada nas regiões CA1 e CA3. As divergências entre os dados deste trabalho e os obtidos por Marques podem sugerir a necessidade de refinamento das análises no software ImageJ para avaliar a densidade neuronal utilizando a coloração Nissl fluorescente, visto que Marques utilizou Nissl convencional e avaliou o dano neural por densidade óptica.

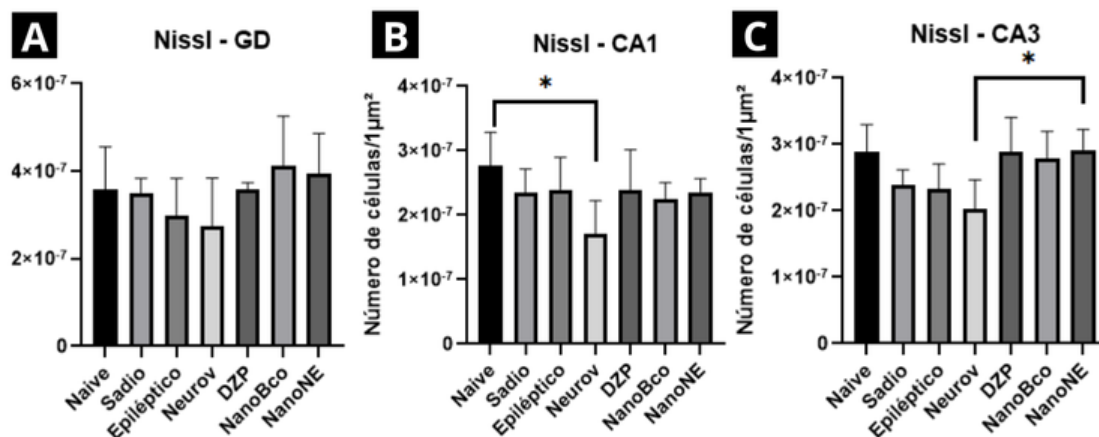


Figura 7 - Contagem de células por unidade de área (μm^2) em diferentes regiões do hipocampo coradas com Nissl Vermelho, em seis grupos experimentais: Naive, Sadio, Epiléptico, Neurovespina, Diazepam, Nano Branco, e Nano Neurovespina. Em (A) não foi encontrada uma diferença significativamente estatística, em (B) observa-se uma redução na densidade neuronal no grupo neurovespina e em (C) observa-se uma diferença significativamente estatística entre os grupos nanovespina livre e nanoencapsulada. (*) Diferença estatisticamente significativa.

O padrão observado na EH é a perda variável de neurônios piramidais na região CA3 e uma perda acentuada na região CA1 (Noebels, 2024). Na Figura 8, que mostra a região CA3, não é observado perda neuronal e não é possível observar diferenças entres os grupos.

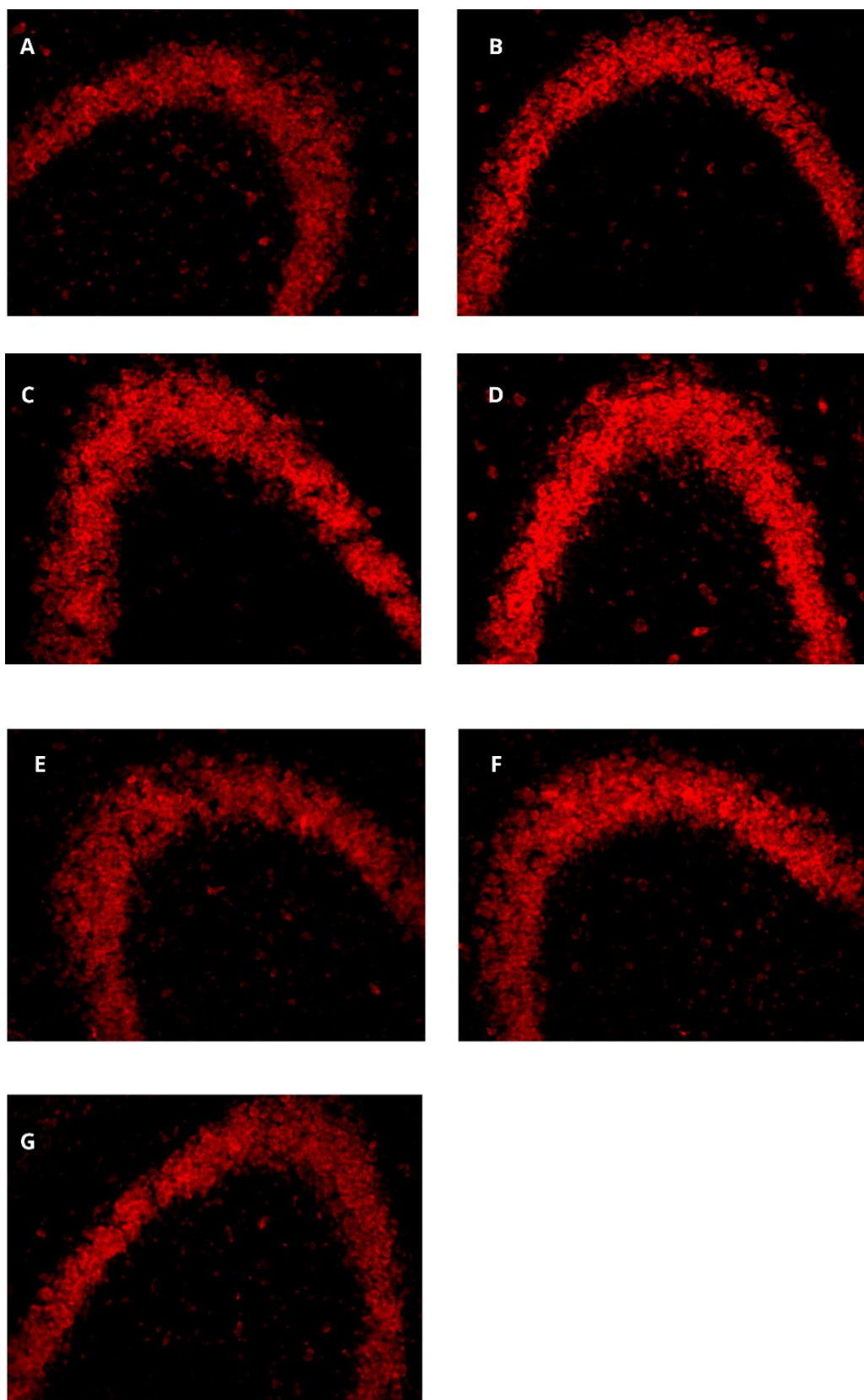
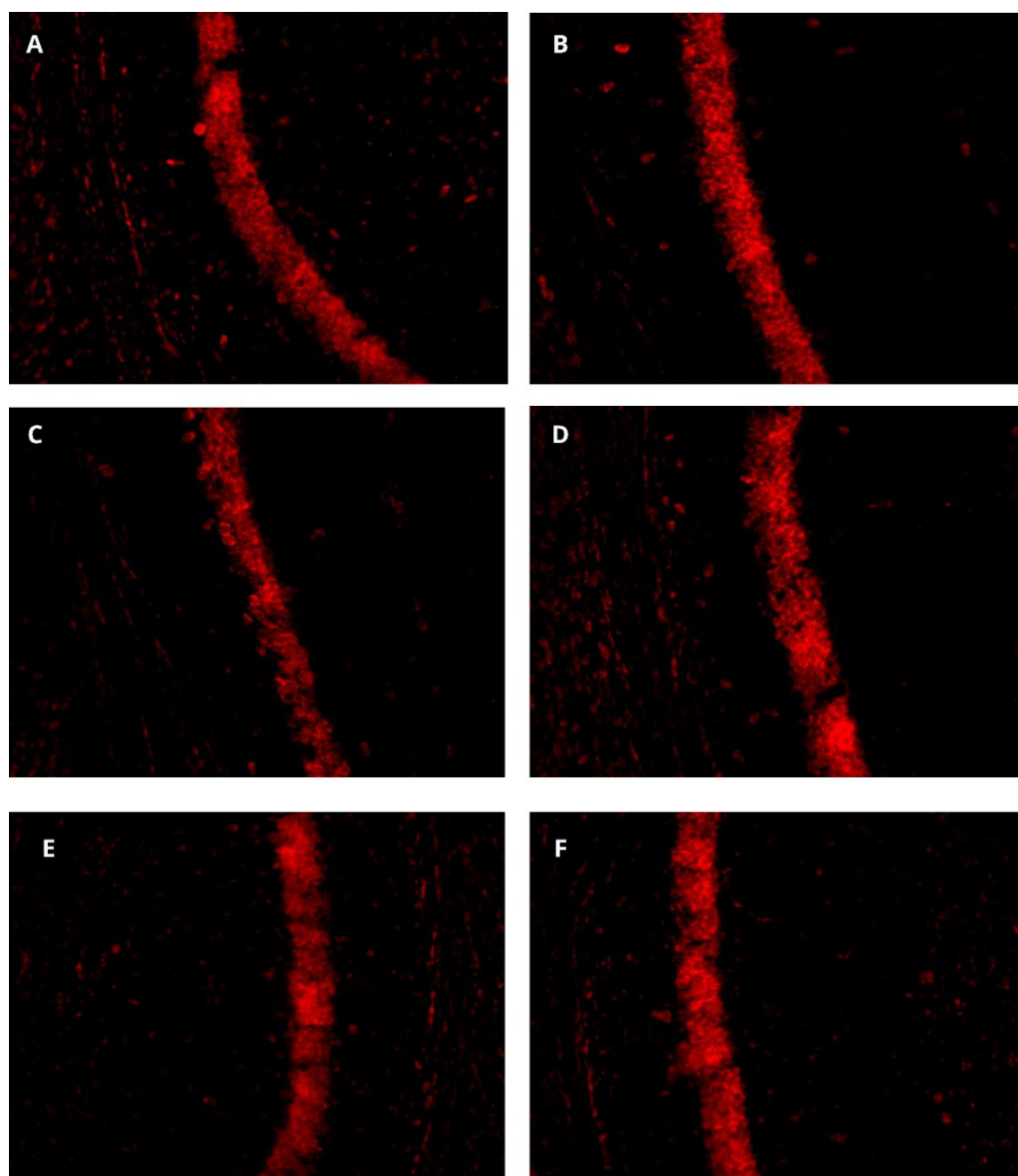


Figura 8 - Região CA3 evidenciando células piramidais coradas com Nissl Vermelho, em um aumento de 200x, mostrando os grupos: (A) Naive; (B) Sadio; (C) Epiléptico; (D) Neurovespina; (E) Diazepam; (F) Nano Branco; (G) Neurovespina nanoencapsulada.

Na Figura 9, apresentando CA1, que é uma região altamente suscetível a danos em condições epiléticas, é possível observar um estreitamento da camada de células piramidais do grupo epilético (C) em comparação aos outros grupos. Essa diferença, não pode ser observada na análise estatística, o que pode revelar uma necessidade de refinar o método de contagem de neurônios utilizando o software ImageJ.



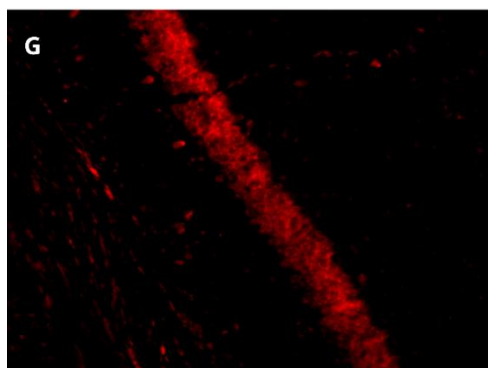


Figura 9 - Região CA1 evidenciando células piramidais coradas com Nissl Vermelho, em um aumento de 200x, mostrando os grupos: (A) Naive; (B) Sadio; (C) Epiléptico; (D) Neurovespina; (E) Diazepam; (F) NanoBranco; (G) Neurovespina nanoencapsulada.

3.2 – Análise da astrogliose em CA1 e GD

A astrogliose, caracterizada por alterações morfológicas e funcionais nos astrócitos em resposta a danos neurais, é uma característica proeminente na epilepsia do lobo temporal (ELT) (Vezzani, 2022). Essa resposta glial pode ser observada em várias regiões do hipocampo, incluindo as camadas do *stratum radiatum* (SR), *stratum lacunosum-moleculare* (SLM) e no *stratum pyramidalis* (SP) na região CA1, bem como nas camadas moleculares e granulares do GD.

A partir dos dados obtidos por meio de análises estatísticas, observou-se que, na região CA1, especificamente na camada piramidal (SP), o grupo tratado com nanopartículas base apresentou diferenças significativas em relação aos grupos naive, sadio e diazepam. No entanto, para as regiões SR e SLM, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas, conforme a Figura 10.

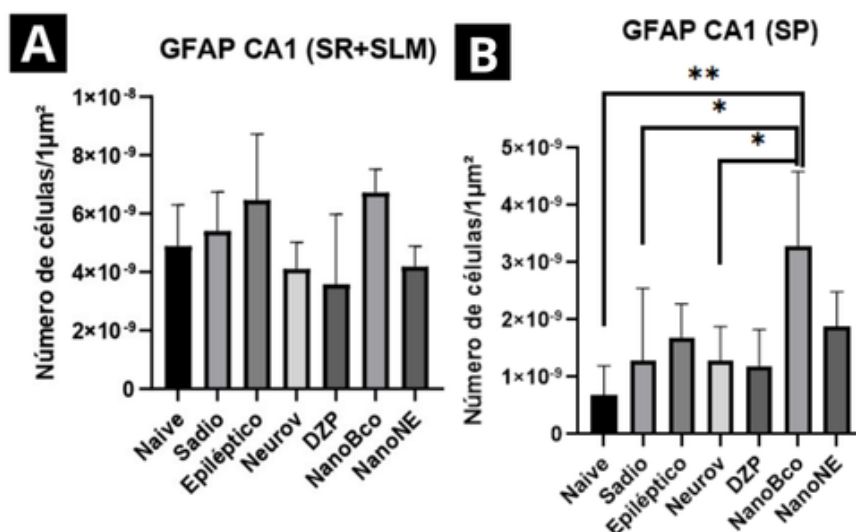


Figura 10 - Densidade de astrócitos em CA1. Em (A) não foi encontrada uma diferença significativamente estatística entre os grupos e em (B) observa-se que o grupo NanoBranco possui uma maior densidade de astrócitos em relação aos grupos neurovespina, sadio e naive.

A densidade de astrócitos foi avaliada no giro denteado, tanto nas camadas granulares quanto nas moleculares. Na camada molecular (Figura 11), não houve diferença significativamente estatística entre os grupos. No entanto, na camada granular, o grupo tratado com nanopartículas base mostrou-se significativamente diferente dos grupos naive, sadio e diazepam.

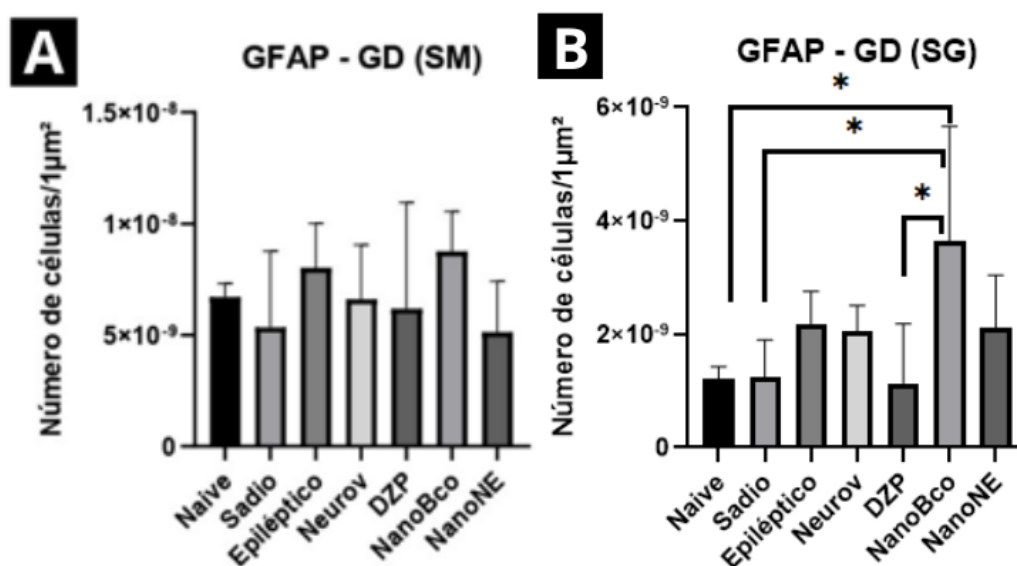


Figura 11 - Expressão de GFAP, um marcador de astrogliose, quantificada em densidade de astrócitos em diferentes camadas do GD do hipocampo de camundongos de diferentes grupos experimentais:

naive, sadio, epiléptico, neurovespina, diazepam , nano branco e nano neurovespina . Em (A) apresenta a quantificação da densidade de astrócitos na camada molecular, onde não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais. E em (B) que é a densidade de astrócitos na camada granular, foi observado um aumento significativo na expressão de GFAP no grupo nano branco em relação ao naive.

Nas Figuras 12 e 13, observa-se a sobreposição das três marcações realizadas neste estudo: Nissl vermelho, GFAP e DAPI, em CA1 e GD, respectivamente. Nessas figuras, é possível notar que o grupo Naive apresentou uma menor densidade de astrócitos em ambas as regiões.

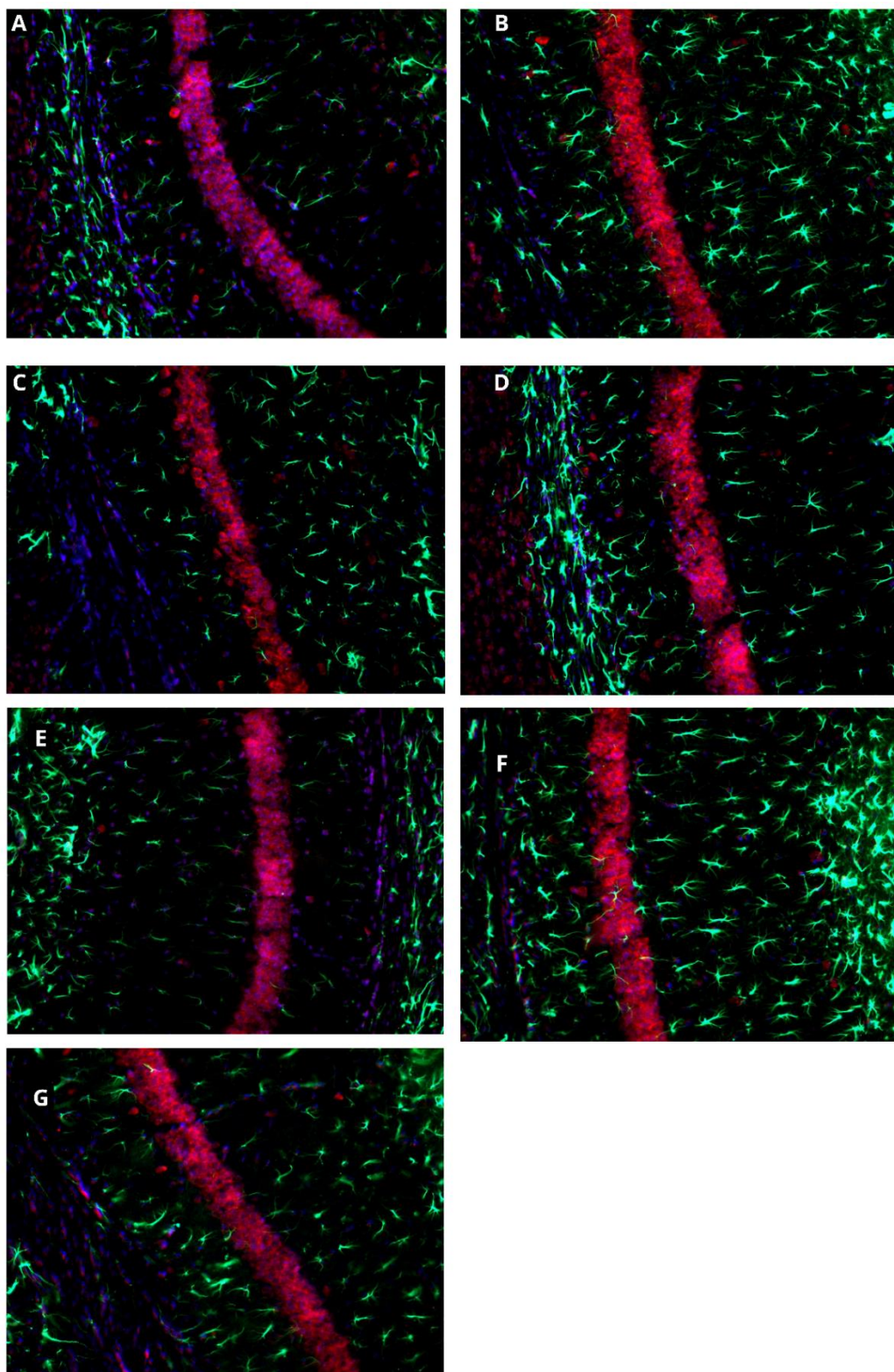


Figura 12- Região CA1 marcada com Nissl (vermelho), GFAP (verde) e DAPI (azul), em um aumento de 200x, mostrando os grupos: (A) Naive; (B) Sadio; (C) Epilético; (D) Neurovespina; (E) Diazepam; (F) Nano Branco; (G) Neurovespina nanoencapsulada. As marcações em vermelho indicam neurônios, pode se observar que essas células compõe a camada de células piramidais da região CA1. As marcações em verde nas imagens, indicam astrócitos, pode-se observar que essas células se

encontram em pequenas quantidade, ou até mesmo ausente em algumas imagens, na região de células piramidais. E em azul foi marcado núcleos celulares.

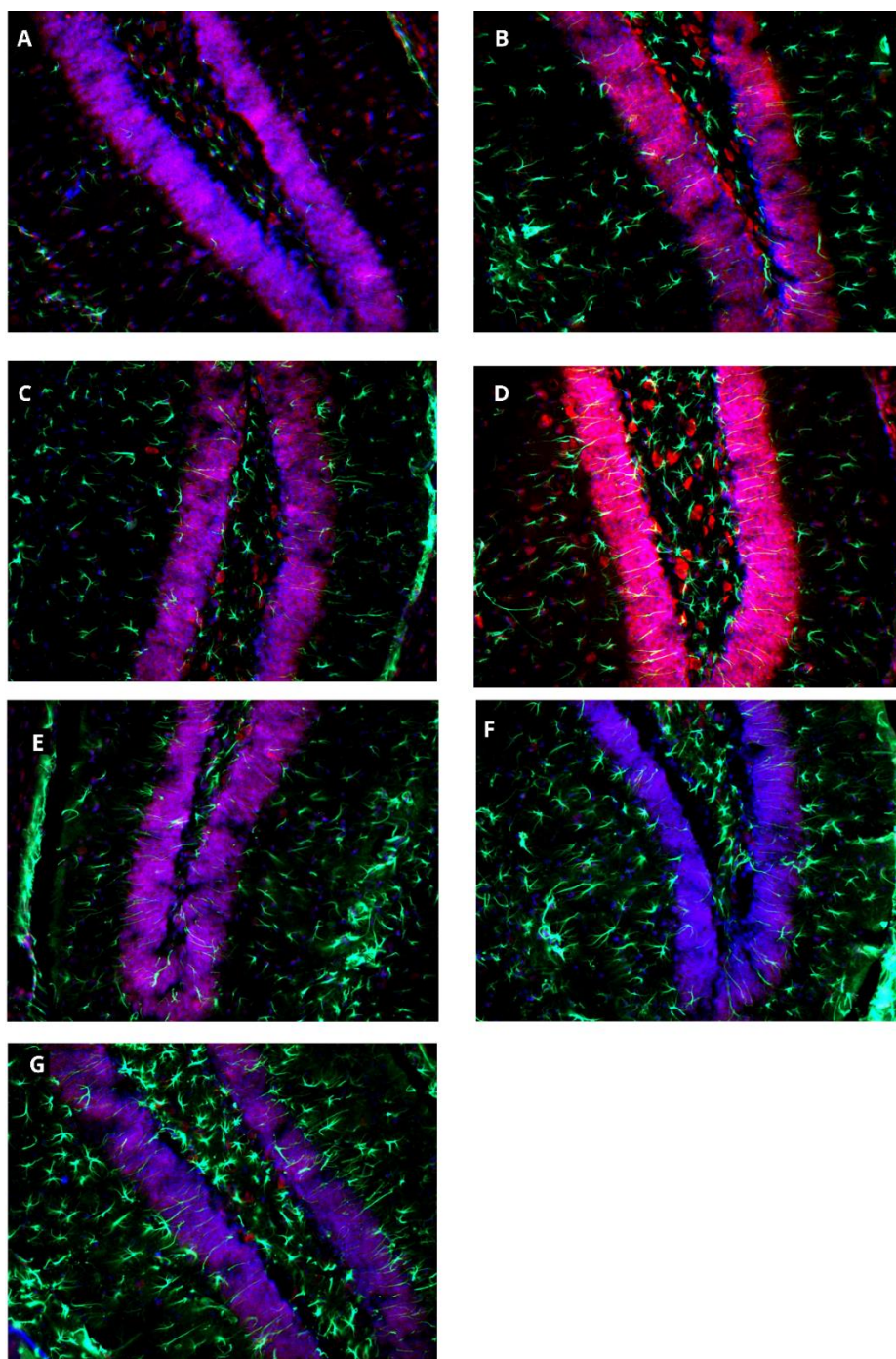


Figura 13 - Região GD marcada com Nissl (vermelho), GFAP (verde) e DAPI (azul), em um aumento de 200x, mostrando os grupos: (A) Naive; (B) Sadio; (C) Epiléptico; (D) Neurovespina; (E) Diazepam; (F) Nano Branco; (G) Neurovespina nanoencapsulada. As marcações em verde indicam astrócitos e agrupamentos de tons que variam do azul, roxo e rosa, indicam a camada granular do GD, essa cor é o resultado da sobreposição da coloração de Nissl (Vermelha) e do DAPI (azul).

Em estudos conduzidos por Sano (2021), foi apontado que a astrogliose reativa desempenha um papel crucial na epileptogênese. O estudo demonstrou que a ativação dos astrócitos é mediada por uma ativação inicial da micróglia, e que essa ativação astrocitária se desenvolve até o período crônico após o SE. Dessa forma, foi evidenciado que a astrogliose não só contribui para a manutenção da epileptogênese, mas também é uma consequência desse processo. Fármacos que atuam tardiamente na regulação dessa atividade astrocitária são considerados alvos farmacológicos importantes.

Em relação a marcadores como GFAP, que é um marcador significativo para astrócitos reativos, é mais interessante realizar a imunocoloração de GFAP juntamente com outros marcadores de astrócitos. Isso se deve ao fato de o GFAP ser um indicador sensível, podendo ser detectado mesmo na ausência de morte neuronal. Além disso, outras análises além da densidade de astrócitos podem ser relevantes para revelar o real impacto do tratamento com a neurovespina, tanto em sua forma livre quanto nanoencapsulada, na astrogliose, como, por exemplo, a análise da hipertrofia dos astrócitos (Escartin *et al.*, 2021).

4 CONCLUSÃO

Com base nos dados obtidos neste estudo, pode-se concluir que a densidade neuronal e a astrogliose apresentam variações entre os diferentes grupos experimentais no modelo de ELT induzida por pilocarpina, tratados com neurovespina, nas formas livre e nanoencapsulada. As análises estatísticas indicam que não houve diferença na densidade neuronal na região do giro dentado, marcada com Nissl. No entanto, a densidade neuronal nas regiões CA3 e CA1 apresentaram diferenças significativas em relação ao tratamento com neurovespina comparado aos outros grupos.

A análise estatística dos dados referentes aos astrócitos revelou uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo tratado com nanopartículas base e os demais grupos experimentais. Esse resultado sugere a hipótese de que os componentes utilizados na formulação das nanopartículas base podem estar associados ao aumento da astrogliose nas regiões do *stratum pyramidale* em CA1 e na camada granular do giro dentado (GD). No entanto, novos estudos são necessários para sustentar essa hipótese.

Finalmente, os resultados evidenciam a necessidade de aprimorar o processo de contagem celular utilizando o software ImageJ, bem como validar essa ferramenta para a análise de imagens. Uma alternativa que pode contribuir para uma contagem mais precisa de neurônios e astrócitos é o aprimoramento do pré-processamento das imagens. Além disso, o uso de plugins específicos no ImageJ, que auxiliam na contagem automatizada e eficiente, pode otimizar a precisão e a velocidade das análises, conforme demonstrado em outros estudos (Ho, et al., 2011; Marques, et al., 2023).

REFERÊNCIAS

ALVAREZ-BUYLLA, Arturo; LING, Chang-Ying; KIRN, John R. **Cresyl violet: a red fluorescent Nissl stain**. *Journal of neuroscience methods*, v. 33, n. 2-3, p. 129-133, 1990.

BABB, Thomas L. *et al.* **Distribution of pyramidal cell density and hyperexcitability in the epileptic human hippocampal formation**. *Epilepsia*, v. 25, n. 6, p. 721-728, 1984.

BELEBONI, Renê de O. *et al.* **Spider and wasp neurotoxins: pharmacological and biochemical aspects**. *European journal of pharmacology*, v. 493, n. 1-3, p. 1-17, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.03.049>.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Epilepsia: conheça a doença e os tratamentos disponíveis no SUS**, 2022. Governo do Brasil. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2022/marco/epilepsia-conheca-a-doenca-e-os-tratamentos-disponiveis-no-sus>. Acesso em: 20 ago. 2024.

CHARUTA, Joshi; KLEIN, Hannah. **Temporal Lobe Epilepsy**. Epilepsy Foundation, 2019. Disponível em: <https://www.epilepsy.com/what-is-epilepsy/syndromes/temporal-lobe-epilepsy>. Acesso em: 11 jun. 2024.

CHAUHAN, Pradip *et al.* **The anatomy of the hippocampus**. Exon Publications, p. 17-30, 2021.

CURIA, Giulia *et al.* **Pathophysiology of mesial temporal lobe epilepsy: is prevention of damage antiepileptogenic?**. *Current medicinal chemistry*, v. 21, n. 6, p. 663-688, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/0929867320666131119152201>.

DAM, Agnete Mouritzen. **Hippocampal neuron loss in epilepsy and after experimental seizures**. *Acta Neurologica Scandinavica*, v. 66, n. 6, p. 601-642, 1982.

DING, Shinghua *et al.* Enhanced astrocytic Ca²⁺ signals contribute to neuronal excitotoxicity after status epilepticus. *Journal of Neuroscience*, v. 27, n. 40, p. 10674-10684, 2007. Disponível em: [10.1523/JNEUROSCI.2001-07.2007](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2001-07.2007).

ESCARTIN, Carole *et al.* **Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions**. *Nature neuroscience*, v. 24, n. 3, p. 312-325, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41593-020-00783-4>.

FERNANDES, Maria José da Silva. **Epilepsia do lobo temporal: mecanismos e perspectivas**. *Estudos avançados*, v. 27, p. 85-98, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-40142013000100007>.

FISHER, Robert 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. 470-472, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.0013-9580.2005.66104.x>.

HENNING, Oliver *et al.* **Temporal lobe epilepsy**. *Tidsskrift for Den norske legeforening*, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.4045/tidsskr.22.0369>.

J. M. S. Pierce, **A DISEASE ONCE SACRED. A HISTORY OF THE MEDICAL UNDERSTANDING OF EPILEPSY**. *Brain*, v 125, n 2, 2002, p. 441–442. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/brain/awf038>.

LÖSCHER, Wolfgang *et al.* **Drug resistance in epilepsy: clinical impact, potential mechanisms, and new innovative treatment options**. *Pharmacological reviews*, v. 72, n. 3, p. 606-638, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1124/pr.120.019539>

LU, Jun *et al.* **Hippocampal neuron loss and astrogliosis in medial temporal lobe epileptic patients with mental disorders**. *Journal of Integrative Neuroscience*, v. 18, n. 2, p. 127-132, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.31083/j.jin.2019.02.16>

Magiorkinis, Emmanouil *et al.* **Highlights in the history of epilepsy: the last 200 years.** *Epilepsy research and treatment*, v. 2014, n. 1, p. 582039, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2014/582039>

Marques, F. V. B. S. (2024) **Desenvolvimento de uma nanoemulsão com o neuropeptídeo neurovespina: avanços na terapia antiepiléptica e neuroprotetora.** 2024. [Manuscrito submetido para publicação]. Tese (Doutorado) – Universidade de Brasília, Brasília.

MARQUES, Sandra I. et al. **A semi-automatic method for the quantification of astrocyte number and branching in bulk immunohistochemistry images.** *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 5, p. 4508, 2023.

MCNAMARA, James O. **Cellular and molecular basis of epilepsy.** *The journal of neuroscience*, v. 14, n. 6, p. 3413, 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms24054508>

MIDDELDORP, Jinte; HOL, E. M. **GFAP in health and disease.** *Progress in neurobiology*, v. 93, n. 3, p. 421-443, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.01.005>

MORTARI, Márcia Renata *et al.* **Anticonvulsant and behavioural effects of the denatured venom of the social wasp *Polybia occidentalis* (Polistinae, Vespidae).** *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, v. 97, n. 5, p. 289-295, 2005.

MORTARI, Márcia Renata. **Atividade neurobiológica e caracterização química da peçonha da vespa social *Polybia occidentalis* (Hymenoptera, Vespidae): identificação de peptídeos antinociceptivos e anticonvulsivantes.** 2007. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

MORTARI, Márcia Renata *et al.* **A new class of peptides from wasp venom: a pathway to antiepileptic/neuroprotective drugs.** *Brain Communications*, v. 5, n. 1, p. fcad016, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/braincomms/fcad016>

MORTARI, M. R.; Carneiro, L.C., 2014. **Peptídeo modificado da peçonha de vespa social e seu uso como antiepiléptico e neuroprotetor**. BR10201400.

NOEBELS, Jeffrey L., *et al.* **'Hippocampal Sclerosis in Temporal Lobe Epilepsy: New Views and Challenges'**, Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies, 5 edn, Contemporary Neurology Series, New York, 2024; online edn, Oxford Academic. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/med/9780197549469.003.0002>

POTTS, E. M., Coppotelli, G., & Ross, J. M. **Histological-based stainings using free-floating tissue sections**. JoVE (Journal of Visualized Experiments), n. 162, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3791/61622>

HO, Shinn-Ying *et al.* NeurphologyJ: an automatic neuronal morphology quantification method and its application in pharmacological discovery. BMC bioinformatics, v. 12, p. 1-18, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-230>

SANO, Fumikazu *et al.* **Reactive astrocyte-driven epileptogenesis is induced by microglia initially activated following status epilepticus**. JCI insight, v. 6, n. 9, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/jci.insight.135391>

SCHEFFER, Ingrid E. *et al.* **ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology**. Epilepsia, v. 58, n. 4, p. 512-521, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/epi.13709>

SCHRÖDER, Hannsjörg; MOSER, Natasha; HUGGENBERGER, Stefan. Neuroanatomy of the mouse: An introduction. Springer Nature, 2020.

VEZZANI, Annamaria *et al.* **Astrocytes in the initiation and progression of epilepsy**. Nature Reviews Neurology, v. 18, n. 12, p. 707-722, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41582-022-00727-5>

WALKER, Matthew Charles. **Hippocampal sclerosis**: causes and prevention. In: Seminars in neurology. Thieme Medical Publishers, 2015. p. 193-200. Disponível em: <https://doi.org/10.1055/s-0035-1552618>

World Health Organization. (2019). **Epilepsy**: a public health imperative: summary. World Health Organization. Disponível em: <https://iris.who.int/handle/10665/325440>