

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**MILTON KENNEDY AQUINO JÚNIOR**

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DO CANABIDIOL E SEUS ANÁLOGOS NA  
EPILEPSIA: ABORDAGENS *IN VITRO* E *IN VIVO***

**ALFENAS/MG**

**2024**

**MILTON KENNEDY AQUINO JÚNIOR**

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DO CANABIDIOL E SEUS ANÁLOGOS NA  
EPILEPSIA: ABORDAGENS *IN VITRO* E *IN VIVO***

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título Doutor em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Borges de Araújo Paula

Co-orientadores: Profa. Dra. Marília Gabriella Alves Goulart Pereira e Prof. Dr. Victor Rodrigues Santos.

Colaboradores: Prof. Dr. Claudio Viegas Junior, Dra. Graziella Reis Franco, Profa. Dra. Natália Peixoto, Prof. Dr. Fabricio de Araújo Moreira e Profa. Dra. Cláudia Vianna Maurer Morelli.

**ALFENAS/MG**

**2024**

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas  
Biblioteca Central

Aquino Júnior, Milton Kennedy.

Investigação dos efeitos do canabidiol e seus análogos na epilepsia: abordagens in vitro e in vivo / Milton Kennedy Aquino Júnior. - Alfenas, MG, 2024.

112 f. : il. -

Orientador(a): Fernanda Borges de Araújo Paula.

Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2024.

Bibliografia.

1. Fármacos neuroprotetores. 2. Astrócitos. 3. Comportamento animal. I. Paula, Fernanda Borges de Araújo, orient. II. Título.

Ficha gerada automaticamente com dados fornecidos pelo autor.

**MILTON KENNEDY AQUINO JÚNIOR**

**"INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DO CANABIDIOL E SEUS ANÁLOGOS NA EPILEPSIA:  
ABORDAGENS IN VITRO E IN VIVO"**

O(A) Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas

Aprovada em: 30 de agosto de 2024.

Profa. Dra. Fernanda Borges de Araújo Paula  
Presidente da Banca Examinadora  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Prof. Dr. Edson Galdino do Nascimento Filho  
Instituição: Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais

Profa. Dra. Silvia Graciela Ruginsk Leitão  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Larissa Helena Lobo Torres Pacheco  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Rafaela Figueiredo Rodrigues  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Borges de Araújo Paula, Professor do Magistério Superior**, em 30/08/2024, às 17:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1326770** e o código CRC **63AF8D41**.

---

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de expressar minha profunda gratidão a Deus e à Nossa Senhora Aparecida por terem me iluminado ao longo de toda a trajetória do doutorado. Sua presença constante foi uma fonte de força e inspiração, especialmente nos períodos mais desafiadores, como o início do doutorado durante a pandemia.

À minha esposa, Maria Emília, pelo amor e dedicação incansáveis à nossa família. Por sempre se manter presente nos momentos bons e ruins, pela sua paciência e compreensão, especialmente durante os períodos de estresse e cansaço nos EUA. Você tornou a experiência em um país diferente muito mais fácil, prazerosa e divertida. Obrigado por seu amor.

Aos meus pais, Lucimara e Milton, e à minha irmã, Gabriela, pelo apoio incondicional, tanto nos momentos difíceis quanto nos felizes. Sem o suporte de vocês, a conclusão deste trabalho não teria sido possível.

À Profa. Dra. Marília por toda a paciência e auxílio ao longo da minha jornada. Por acreditar em meu trabalho e pelo contínuo incentivo ao meu crescimento científico. Sou especialmente grato pela oportunidade do doutorado sanduíche e pelas valiosas parcerias que conseguimos estabelecer.

Aos meus colegas e técnicos do Laboratório de Bioquímica — Kris, George, Poliana, Marina, Jéssica, Camila, Otávio e Ana —, meu sincero agradecimento pelo convívio enriquecedor e por tornarem o laboratório um ambiente agradável e estimulante.

Às amigas que o programa me proporcionou, Rodrigo, Rafaela, Mariana, Tássia, Carolina e Thalita, gratidão por toda ajuda e por sempre compartilhar o conhecimento.

Aos alunos de iniciação científica Nathalia, Thais, Kauê, Marina e Nariany, meu agradecimento pelo auxílio fundamental na construção deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Victor Rodrigues e seus alunos, que me acolheram no laboratório de Neurobiologia Conceição Machado em Belo Horizonte e me orientaram nas técnicas do modelo *in vivo* de epilepsia em ratos *Wistar*.

À Profa. Dra. Nathalia Peixoto, sou grato pelo carinho e atenção com que me recebeu em sua casa e laboratório nos EUA. Seu suporte e ajuda foram essenciais para a conclusão do Doutorado Sanduíche.

À Profa. Dra. Claudia Vianna e à Técnica Viviane Cristina, meu sincero agradecimento pela recepção e pela paciência em me ensinar cada detalhe das metodologias aplicadas no laboratório de Zebrafish da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

Ao Prof. Dr. Cláudio Viegas, às discentes Graziella Franco e Mikaela Lucinda, e a todos do PeQuim, minha gratidão pela colaboração e pelo fornecimento dos análogos do canabidiol.

Ao Prof. Dr. Plinio Rodrigues, pelo auxílio e por ceder os materiais necessários para a quantificação do glutamato por HPLC.

Ao laboratório de Fisiologia da UNIFAL, agradeço o fornecimento da estrutura e equipamentos necessários para a obtenção da cultura celular.

Ao meu amigo Maycon Menezes, pelas boas conversas e risadas durante os treinos de bicicleta, aliviando o estresse e a ansiedade.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas e a UNIFAL pela oportunidade de estar realizando este doutorado.

Ao apoio dos órgãos de fomento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – 400865/2019 (bolsa de doutorado), 402481/2022-4 (doutorado sanduíche) e 406727/2021-0 (apoio a projeto de pesquisa); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) - APQ00544-23; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - CEPID BRAINN 2013/07559-3; e Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) - REF. 1735-22 - UNIFAL - COD 01.23.0303.00.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal e Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

## RESUMO

A epilepsia é um distúrbio neurológico caracterizado pela ocorrência periódica de crises imprevisíveis, causadas pela hiperexcitabilidade dos neurônios cerebrais. Os efeitos adversos dos fármacos antiepiléticos tradicionais, bem como sua ineficácia em casos refratários, levaram à busca de tratamentos alternativos para a epilepsia, como o uso do Canabidiol (CBD), principal composto não psicotrópico presente na planta *Cannabis spp.* Acredita-se que alguns de seus análogos sejam igualmente eficazes na mitigação dos sintomas epiléticos, tornando necessários mais estudos na área para melhorar o tratamento da epilepsia. Com o objetivo de elucidar os efeitos do CBD e seus análogos na epilepsia, utilizamos diferentes abordagens e modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*. Para os testes *in vitro* analisamos a viabilidade celular, a quantificação de glutamato, intra e extracelular, por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), análise da atividade elétrica neuronal e a expressão da proteína ácida fibrilar glial (GFAP). Para estudos *in vivo* utilizamos o modelo de indução de epilepsia por pentilenotetrazol (PTZ) em ratos *Wistar* com 11 dias de idade, verificando a latência e duração das crises, e em larvas de Zebrafish com 7 dias após a fertilização, verificando os parâmetros de distância, velocidade, tempo de imobilidade e rotação, assim como a expressão de c-Fos e a interleucina-1beta. Os grupos experimentais foram comparados utilizando o One-way ANOVA (pós-teste de Tukey). No estudo *in vitro* por adição de glutamato 1mM, verificamos que no teste de viabilidade celular o CBD e os compostos 245 e 309 (10 µM) conseguiram reverter a perda de viabilidade provocada pelo glutamato. Ao realizarmos a quantificação de glutamato por HPLC, vimos que os compostos 291 e 309 aumentaram a captação de glutamato intracelular. Quando analisamos a atividade elétrica neuronal, observamos que o glutamato aumentou significativamente a porcentagem média de *spikes/15min*, enquanto o pré-tratamento de 3h e 24h com o CBD e os análogos 302 e 309 normalizaram os *spikes*. O CBD e o composto 302 apresentaram redução significativa na expressão de GFAP. Para os testes *in vivo*, o modelo em ratos *Wistar* não apresentou diferença entre os tratamentos. No entanto, no modelo de Zebrafish, o CBD e seus análogos demonstraram redução dos parâmetros em estudo em comparação com o grupo PTZ. A atividade neuronal avaliada pela quantificação de c-Fos mostrou redução significativa com CBD e análogos 302 e 309 em comparação ao

grupo PTZ. Estas descobertas sugerem que os análogos do CBD são promissores como potenciais tratamentos para a epilepsia.

Palavras-chave: Farmácos neuroprotetores; Astrócitos; Comportamento animal.

## ABSTRACT

Epilepsy is a neurological disorder characterized by the periodic occurrence of unpredictable seizures, caused by the hyperexcitability of brain neurons. The adverse effects of traditional antiepileptic drugs, as well as their ineffectiveness in refractory cases, have led to the exploration of alternative treatments for epilepsy, such as the use of Cannabidiol (CBD), the main non-psychoactive compound found in the *Cannabis spp.* plant. It is believed that some of its analogs may be equally effective in mitigating epileptic symptoms, necessitating further research in the field to improve epilepsy treatment. To elucidate the effects of CBD and its analogs on epilepsy, we employed various experimental approaches and models both *in vitro* and *in vivo*. For *in vitro* tests, we analyzed cell viability, glutamate quantification (intracellular and extracellular) by HPLC, neuronal electrical activity, and the expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP). For *in vivo* studies, we used the pentylenetetrazole (PTZ) epilepsy induction model in 11-day-old Wistar rats, assessing seizure latency and duration, and in 7-day-old Zebrafish larvae, evaluating distance, speed, immobility time, and rotation, as well as the expression of c-Fos and interleukin-1beta. Experimental groups were compared using One-way ANOVA (Tukey's post-test). In the *in vitro* study with 1mM glutamate addition, we found that in the cell viability test, CBD and compounds 245 and 309 (10µM) were able to reverse the loss of viability induced by glutamate. When quantifying glutamate by HPLC, compounds 291 and 309 increased intracellular glutamate uptake. Analysis of neuronal electrical activity showed that glutamate significantly increased the average percentage of *spikes/15* minutes, while pre-treatment for 3 hours and 24 hours with CBD and analogs 302 and 309 normalized the *spikes*. CBD and analog 302 showed a significant reduction in GFAP expression. For *in vivo* tests, the Wistar rat model showed no difference between treatments. However, in the Zebrafish model, CBD and its analogs demonstrated a reduction in the studied parameters compared to the PTZ group. Neuronal activity assessed by c-Fos quantification showed a significant reduction with CBD and analogs 302 and 309 compared to the PTZ group. These findings suggest that CBD analogs are promising as potential treatments for epilepsy.

Keywords: Neuroprotective drugs; Astrocytes; Animal behavior.

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1 - Ciclo glutamato glutamina.....   | 28 |
| Figura 2 - Fases do ciclo de vida do Zebrafish.....   | 35 |
| Figura 3 - Estruturas químicas. ....  | 47 |
| Figura 4 - Esquema para quantificação de glutamato por HPLC .....   | 50 |
| Figura 5 - Delineamento experimental do registro da atividade elétrica neuronal...53  |    |
| Figura 6 - Viabilidade celular de astrócitos expostos ao DMSO.....  | 56 |
| Figura 7 - Comparação do CC <sub>50</sub> entre as 4 séries de compostos. ....  | 58 |
| Figura 8 - Efeito protetivo dos análogos do CBD frente ao estímulo com glutamato.<br>.....  | 59 |
| Figura 9 - Cromatogramas obtidos.....   | 60 |
| Figura 10 - Dosagem de glutamato intra e extracelular.....  | 61 |
| Figura 11 - Placa de microelétrodos.....  | 62 |
| Figura 12 - Validação do algoritmo para classificação de potenciais de ação.....  | 63 |
| Figura 13 - Representação da porcentagem média do número de potenciais de<br>ação (spikes) de neurônios hipocâmpais cultivados em MEAs.<br>Tratamento de 3h.....  | 64 |
| Figura 14 - Representação da porcentagem média do número de potenciais de<br>ação (spikes) de neurônios hipocâmpais cultivados em MEAs.<br>Tratamento de 24h..... | 65 |
| Figura 15 - Marcação de GFAP em Astrócitos.....   | 66 |
| Figura 16 - Resultado da marcação de GFAP.....  | 66 |
| Figura 17 - Avaliação comportamental da crise induzida por PTZ. ....  | 68 |
| Figura 18 - Mapa da trajetória das larvas 7dpf de Zebrafish durante os 20min de<br>teste .....  | 70 |
| Figura 19 - Distância percorrida pelas larvas de Zebrafish .....  | 71 |
| Figura 20 - Velocidade média atingida pelas larvas de Zebrafish .....   | 72 |
| Figura 21 - Tempo de imobilidade apresentado pelas larvas de Zebrafish .....  | 73 |
| Figura 22 - Frequência de rotação apresentada pelas larvas de Zebrafish .....   | 74 |
| Figura 23 - Quantificação da expressão dos genes IL-1B e c-Fos.....   | 76 |

## LISTA DE QUADROS

|  |    |
|--|----|
| Quadro 1 - Apanhado dos resultados <i>in vitro</i> ..... | 77 |
| Quadro 2 - Apanhado dos resultados <i>in vivo</i> .....  | 77 |

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1 - Principais funções dos astrócitos .....   | 23 |
| Tabela 2 - Resultados de CC <sub>50</sub> e CC <sub>90</sub> das 4 séries de compostos derivados do canabidiol ..... | 57 |

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIÇÕES

|                  |   |
|------------------|---|
| 3Rs              | Redução, refinamento e substituição                   |
| 4-AP             | 4-aminopiridina                                       |
| 5-HT1a           | Receptores serotoninérgicos                           |
| Ang II           | Angiotensina II                                       |
| ApoE             | Apoproteína E   |
| AQP <sub>4</sub> | Aquaporina – 4  |
| ATP              | Adenosina trifosfato                                  |
| BDNF             | Fator neurotrófico derivado do cérebro                |
| BHE              | Barreira hematoencefálica                             |
| BSA              | Albumina de soro bovino                               |
| cAMP             | Adenosina monofosfato cíclico                         |
| CB1              | Receptor canabinóide do tipo 1                        |
| CB2              | Receptor canabinóide do tipo 2                        |
| CBD              | Canabidiol  |
| CBVD             | Cannabinodivarin                                      |
| CC <sub>50</sub> | Concentração citotóxica 50%                           |
| CC <sub>90</sub> | Concentração citotóxica 90%                           |
| DEAs             | Fármacos antiepiléticos                               |
| DMEM             | Dulbecco's modified eagle médium                      |
| DMSO             | Dimetilsulfóxido                                      |
| Dpf              | Dias após a fertilização                              |
| EAAT1            | Transportador de aminoácidos excitatórios humanos 1   |
| EAAT2            | Transportador de aminoácidos excitatórios humanos 2   |
| EEF1A1           | Fator de alongamento de tradução eucariótica 1 alfa 1 |
| ELTM             | Epilepsia do lobo temporal mesial                     |
| EPM              | Erro padrão da média                                  |
| EROs             | Espécies Reativas de Oxigênio                         |

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| GABA                            | Ácido gama-aminobutírico                                     |
| GATs                            | Transportadores GABA específicos                             |
| GDNF                            | Fator neurotrófico derivado da glia                          |
| GFAP                            | Proteína ácida fibrilar glial do filamento intermediário     |
| GLAST                           | Transportador de glutamato-aspartado                         |
| GLT-1                           | Transportador de glutamato 1                                 |
| GLUR                            | Receptores ionotrópicos de glutamato                         |
| GPR55                           | Receptor acoplado à proteína G 55                            |
| GS                              | Glutamina sintetase  |
| HBSS                            | Solução salina balanceada de Hank                            |
| Hpf                             | Horas após a fertilização                                    |
| HPLC                            | Cromatografia líquida de alta eficiência                     |
| ILAE                            | Liga internacional contra epilepsia                          |
| IL-1B                           | Interleucina-1beta   |
| K <sub>IR</sub>                 | Canais de K <sup>+</sup> retificadores internos              |
| MCT <sub>1</sub> e <sub>2</sub> | Transportadores de monocarboxilato                           |
| MEAs                            | Matrizes de microelétrodos                                   |
| mGLURs                          | Receptores metabotrópicos de glutamato                       |
| MTT                             | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide |
| OMS                             | Organização Mundial da Saúde                                 |
| P11                             | 11 dias de idade   |
| PBS                             | Tampão fosfato-salino  |
| PC12                            | Linhagem de feocromocitoma de rato                           |
| PeQuiM                          | Laboratório de pesquisa em Química Medicinal                 |
| PK <sub>A</sub>                 | Proteína quinase A   |
| PTZ                             | Pentilenotetrazol  |
| qPCR                            | PCR em tempo real  |
| RNA <sub>m</sub>                | RNA mensageiro   |
| SE                              | Status epilepticus   |

|         |   |
|---------|---|
| SH-SY5Y | Linhagem de células de neuroblastoma humano   |
| SHH     | Sonic hedgehog                                |
| SNC     | Sistema nervoso central                       |
| THC     | Delta 9 tetraidrocanabinol                    |
| TRPA1   | Anquirina potencial do receptor transitório 1 |
| TRPV1   | Receptor de potencial transiente vanilóide 1  |
| TRPV2   | Receptor de potencial transiente vanilóide 2  |
| UFMG    | Universidade Federal de Minas Gerais          |
| UNICAMP | Universidade Estadual de Campinas             |
| UNIFAL  | Universidade Federal de Alfenas               |

## SUMÁRIO

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO .....</b>  | <b>18</b> |
| <b>2</b> | <b>REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>   | <b>20</b> |
| 2.1      | EPILEPSIA .....  | 20        |
| 2.2      | ASTRÓCITOS .....   | 22        |
| 2.3      | PERDA DA FUNÇÃO DOS ASTRÓCITOS RELACIONADAS A EPILEPTOGÊNESE .....         | 23        |
| 2.3.1    | Disfunção na BHE.....  | 24        |
| 2.3.2    | Desequilíbrio da homeostase extracelular do K <sup>+</sup> .....           | 24        |
| 2.3.3    | Regulação de receptores metabotrópicos (mGluRs) e ionotrópicos (GluR)..... | 25        |
| 2.3.4    | Desequilíbrio eletrolítico e osmolalidade .....                            | 26        |
| 2.3.5    | Alterações no transporte do GABA.....                                      | 26        |
| 2.3.6    | Alterações no transporte e metabolismo do Glutamato .....                  | 27        |
| 2.4      | MODELOS EXPERIMENTAIS IN VITRO DE EPILEPSIA .....                          | 29        |
| 2.4.1    | Utilização de fatias de cérebro humano ou de animais.....                  | 29        |
| 2.4.2    | Cultura de células neuronais .....   | 30        |
| 2.5      | MODELOS EXPERIMENTAIS IN VIVO DE EPILEPSIA.....                            | 32        |
| 2.5.1    | Modelo químico.....  | 32        |
| 2.5.2    | Modelo genético.....   | 32        |
| 2.5.3    | Modelo por estimulação elétrica .....                                      | 33        |
| 2.5.4    | Escolha da espécie animal .....  | 33        |
| 2.6      | SISTEMA ENDOCANABINÓIDE .....  | 35        |
| 2.6.1    | CBD .....  | 37        |
| 2.6.2    | CBD x Epilepsia .....  | 38        |
| 2.6.3    | Análogos do CBD .....  | 40        |
| <b>3</b> | <b>JUSTIFICATIVA .....</b>   | <b>42</b> |
| <b>4</b> | <b>OBJETIVOS .....</b>   | <b>43</b> |
| 4.1      | OBJETIVO GERAL.....  | 43        |
| 4.2      | OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....   | 43        |
| <b>5</b> | <b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>  | <b>45</b> |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 5.1      | ANIMAIS .....  | 45        |
| 5.1.1    | <b>Ratos Wistar</b> .....  | 45        |
| 5.1.2    | <b>Peixe Zebra (Zebrafish)</b> .....   | 45        |
| 5.2      | ANÁLOGOS DO CANABIDIOL.....  | 46        |
| 5.3      | CULTURA PRIMÁRIA DE ASTRÓCITOS .....   | 47        |
| 5.4      | AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS COMPOSTOS DERIVADOS DO<br>CANABIDIOL .....                                   | 48        |
| 5.5      | AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETIVO DOS COMPOSTOS DERIVADOS<br>DO CANABIDIOL FRENTE AO ESTÍMULO COM GLUTAMATO..... | 49        |
| 5.6      | ANÁLISE DE GLUTAMATO POR HPLC .....  | 49        |
| 5.6.1    | <b>Condições cromatográficas</b> .....   | 50        |
| 5.7      | IMUNOFLOURESCÊNCIA E ANÁLISE QUANTITATIVA DA EXPRESSÃO<br>DE GFAP .....                                      | 50        |
| 5.8      | CO-CULTURA DE ASTRÓCITOS E NEURÔNIOS HIPOCAMPAIS EM<br>PLACA DE MICROELETRODOS .....                         | 51        |
| 5.9      | REGISTRO E ANÁLISE DA ATIVIDADE ELÉTRICA DOS NEURÔNIOS .....   | 52        |
| 5.10     | MODELO IN VIVO DE EPILEPSIA INDUZIDO POR PTZ EM RATOS<br>WISTAR.....   | 53        |
| 5.11     | MODELO IN VIVO DE EPILEPSIA INDUZIDO POR PTZ EM ZEBRAFISH ..   | 54        |
| 5.11.1   | <b>Teste comportamental</b> .....  | 54        |
| 5.11.2   | <b>PCR quantitativo em tempo real</b> .....  | 54        |
| 5.12     | ANÁLISE ESTATÍSTICA.....   | 55        |
| <b>6</b> | <b>RESULTADOS</b> .....  | <b>56</b> |
| 6.1      | CITOTOXICIDADE DOS COMPOSTOS DERIVADOS DO CANABIDIOL ....  | 56        |
| 6.2      | AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETIVO DOS ANÁLOGOS DO CBD<br>FRENTE AO ESTÍMULO COM GLUTAMATO .....                  | 59        |
| 6.3      | ANÁLISE E QUANTIFICAÇÃO DE GLUTAMATO POR HPLC .....  | 60        |
| 6.4      | CO-CULTURA DE ASTRÓCITOS E NEURÔNIOS HIPOCAMPAIS EM<br>PLACA DE MICROELETRODOS .....                         | 61        |
| 6.5      | REGISTRO E ANÁLISE DA ATIVIDADE ELÉTRICA DOS NEURÔNIOS .....   | 62        |
| 6.6      | IMUNOFLOURESCÊNCIA E ANÁLISE QUANTITATIVA DE GFAP .....  | 65        |
| 6.7      | ANÁLISE COMPORTAMENTAL.....  | 67        |

|       |  |     |
|-------|--|-----|
| 6.7.1 | Modelo in vivo de epilepsia induzido por PTZ em ratos Wistar.....                        | 67  |
| 6.7.2 | Modelo in vivo de epilepsia induzido por PTZ em Zebrafish .....                          | 69  |
| 6.8   | SÍNTESE DOS RESULTADOS .....   | 76  |
| 7     | DISCUSSÃO .....  | 78  |
| 8     | DESAFIOS E LIMITAÇÕES .....  | 87  |
| 9     | CONCLUSÕES .....   | 89  |
|       | REFÊRENCIAS .....  | 91  |
|       | ANEXOS.....  | 106 |
|       | ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS<br>(CEUA-UNIFAL).....             | 106 |
|       | ANEXO B - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS<br>(CEUA-UFMG) .....              | 107 |
|       | ANEXO C - PARECER DO COMITÊ INSTITUCIONAL DE CUIDADO E<br>USO ANIMAL (IACUC – GMU) ..... | 109 |
|       | ANEXO D - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS<br>(CEUA-UNICAMP) .....           | 110 |

## 1 INTRODUÇÃO

A epilepsia é um dos distúrbios neurológicos mais frequentes do mundo, que se caracteriza por apresentar crises convulsivas espontâneas e autolimitadas, podendo ser considerada de origem local, quando afeta uma região específica do cérebro ou de origem generalizada, quando afeta os dois hemisférios (Oblasov *et al.*, 2024). Essas crises podem provocar consequências cognitivas, psicológicas e sociais na vida do indivíduo afetado (Devinsky *et al.*, 2018). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), 50 milhões de pessoas no mundo sofrem com a epilepsia, sendo que 80% delas estão nos países em desenvolvimento (OMS, 2024).

A etiologia das desordens epilépticas é extensa e pode ser considerada desde uma condição transmitida geneticamente até um trauma recente. A epilepsia do lobo temporal mesial (ELTM) é um tipo de epilepsia focal que tem origem em estruturas mesiais do lobo temporal (ex. hipocampo) e tem grande relevância clínica pela alta prevalência e gravidade, especialmente quando ocorre na infância, repercutindo, principalmente em alterações de linguagem e memória (Eid *et al.*, 2019). O tratamento para ELTM geralmente é realizado com o uso de fármacos antiepilépticos, porém 1/3 dos pacientes são resistentes ao tratamento convencional. Além disso, os tratamentos atuais buscam somente combater as crises convulsivas e não possuem efeitos sobre a progressão da epileptogênese neuronal (Green, dos Santos e Fontana, 2021).

O canabidiol (CBD), um dos compostos da classe dos canabinoides encontrado na planta *Cannabis spp.*, tem demonstrado efeitos promissores na atenuação e no controle das crises convulsivas. O mecanismo pelo qual o CBD possui propriedades anticonvulsivantes permanece desconhecido, pois ele é considerado um composto multi-alvo por produzir diferentes ações farmacológicas, modulando vários receptores no sistema nervoso central, como os receptores endocanabinoides (CB1 e CB2), receptor acoplado à proteína G 55 (GPR55), receptores serotoninérgicos (5-HT1a), receptor transitório dos canais vanilóide tipo 1 (TRPV1) e tipo 2 (TRPV2) entre outros (Franco e Perucca, 2019; Ibeas Bih *et al.*, 2015).

Atualmente, há um crescente interesse pelo uso de análogos do CBD para o tratamento de doenças neurológicas, pois, são compostos químicos que são estruturalmente semelhantes a molécula original, mas com modificações em sua composição molecular, preservando a função terapêutica do CBD e melhorando

certas propriedades, como eficácia, segurança ou biodisponibilidade (Ben-Shabat *et al.*, 2006; Fride *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2020).

Portanto, o entendimento de mecanismos epileptogênicos e a busca por novas moléculas com potencial terapêutico, a longo prazo, se torna essencial para a melhora da qualidade de vida dos pacientes com epilepsia. Neste sentido, este projeto tem como objetivo elucidar os efeitos do CBD e alguns de seus análogos na epilepsia, utilizando diferentes abordagens e modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 EPILEPSIA

A epilepsia é um distúrbio neurológico crônico que se caracteriza por crises recorrentes espontâneas que variam desde um breve lapso de atenção (crises de ausência) até graves e prolongadas crises convulsivas (crises tônico-clônicas generalizadas, estado de mal epiléptico ou *Status Epilepticus*) (Devinsky *et al.*, 2018; Oblasov *et al.*, 2024). Essas crises podem envolver uma parte do cérebro (parcial) ou todo cérebro (generalizada), o que acaba provocando consequências cognitivas, psicológicas e sociais para o indivíduo afetado ( Eid *et al.*, 2019; Torres, 2015). Devido aos sintomas que podem ser apresentados, como déficits neuropsicológicos, redução na velocidade de processamento, perda de memória, dificuldade de atenção, esses indivíduos podem demonstrar limitações em realizar interações sociais, o que infelizmente torna essas pessoas alvos de preconceitos (Martinez; Peplow, 2023; Steiger; Jokeit, 2017).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2024), cerca de 50 milhões de pessoas no mundo sofrem com epilepsia, sendo a taxa de ocorrência de pacientes com crises convulsivas recorrentes e com a necessidade de tratamento de 4 a 10 por 1.000 pessoas, com 80% dos casos encontrando-se em países em desenvolvimento, como o Brasil.

Em muitos dos casos, a causa da epilepsia tem origem desconhecida, as convulsões podem originar-se de qualquer lesão ou trauma que afete a função cerebral, como exemplo: causas adquiridas (após acidente vascular cerebral ou lesão cerebral traumática), doenças infecciosas (neurocisticercoses), doenças autoimunes, alterações metabólicas e mutações genéticas (Devinsky *et al.*, 2018). Quando há um acometimento por lesão do tecido cerebral, uma porcentagem de indivíduos apresenta indução de uma reorganização dos circuitos cerebrais, que ao passar do tempo, gera-se um foco epiléptico. Esse processo patológico de transformação do tecido cerebral causando convulsões espontâneas é chamado de epileptogênese (Eid *et al.*, 2019; Silva; Cabral, 2008). Antes, o termo epileptogênese se referia ao período de latência entre o trauma epileptogênico e o aparecimento dos sintomas clínicos. Atualmente, com a atualização realizada pela Liga Internacional contra Epilepsia (ILAE), tem-se

que o processo de epileptogênese pode se apresentar como resultado tanto do desenvolvimento de uma condição epiléptica, quanto da progressão da epilepsia após seu surgimento, tornando-se um processo progressivo, e não somente um período de latência (Devinsky *et al.*, 2018; Pitkänen *et al.*, 2015).

Os estudos para elucidação dos mecanismos que compreendem a epileptogênese estão permanentemente sendo atualizados, muitos são relacionados a mecanismos inibitórios do sistema do ácido gama-aminobutírico (GABA) e também ao aumento da transmissão excitatória, com aumento de glutamato extracelular. Portanto, compreender melhor tais mecanismos é de suma importância para fornecer novas possibilidades terapêuticas para indivíduos afetados por essa patologia (Devinsky *et al.*, 2018; Dudek; Staley, 2010; Pitkänen *et al.*, 2015; Silva; Cabral, 2008). O tratamento anticonvulsivo convencional inclui prevenção e modificação de crises. Por meio dessa terapêutica, pode-se obter a completa inativação do desenvolvimento da epilepsia, ou atrasar e reduzir seu desenvolvimento, gerando convulsões mais brandas e com menor frequência, sendo a cura caracterizada quando se obtêm uma reversão completa e permanente da epilepsia após a retirada do tratamento, o que infelizmente é raro (Pitkänen *et al.*, 2015). A estimativa, segundo a OMS é que cerca de 70% da população pode ficar livre de convulsões com o uso apropriado de medicamentos anti-convulsivos (OMS, 2024). Entretanto, estudos demonstram que aproximadamente 1/3 dos pacientes com epilepsia desenvolvem resistência aos tratamentos convencionais, provocando uma maior administração de medicamentos, submetendo o paciente a efeitos adversos, desenvolvimento de doenças psicológicas e risco de morte (Devinsky *et al.*, 2018; Hu *et al.*, 2018; Urio *et al.*, 2024).

A ELTM é um tipo de epilepsia focal, caracterizada por convulsões espontâneas recorrentes, que geralmente são refratárias a medicamentos. É a forma mais comum de epilepsia, afetando mais de 40 milhões de pessoas em todo o mundo, possuindo origem em estruturas mesiais do lobo temporal (ex. hipocampo), com grande relevância clínica pela alta prevalência e gravidade, especialmente quando ocorre na infância, repercutindo, principalmente, em alterações de linguagem e memória (Coulter; Eid, 2012; Eid *et al.*, 2019; Martinez; Peplow, 2023).

Um dos fatores envolvidos na epileptogênese da ELTM é o aumento da excitabilidade provocada pelo acúmulo de glutamato no meio extracelular. Há pouco tempo as pesquisas sobre os processos de epileptogênese se concentravam no papel

dos neurônios, entretanto, atualmente vem se discutindo sobre a participação importante de outros constituintes do cérebro, como a matriz extracelular, a unidade neurovascular e as células da glia (Eid *et al.*, 2019). Os astrócitos são células gliais do sistema nervoso central (SNC) que segundo evidências recentes, possuem relação com mecanismos referentes ao processo de epileptogênese, demonstrando redução da expressão de transportadores de glutamato e redução da expressão dos canais de K<sup>+</sup> retificadores de influxo, o que pode ocasionar hiperexcitabilidade epiléptica (Çarçak, Onat e Sitnikova, 2023; Devinsky *et al.*, 2013; Gomes, Tortelli e Diniz, 2013).

## 2.2 ASTRÓCITOS

Os astrócitos foram descritos pela primeira vez em 1893 pelo médico húngaro Mihály Lenhossék como sendo células em formato de estrela, observadas em amostras histológicas do cérebro e medula espinhal humana (Gomes, Tortelli e Diniz, 2013). São células não neuronais da glia que constituem metade das células do cérebro humano, sendo um dos componentes mais abundantes do SNC, um único astrócito de roedor pode se associar a múltiplos neurônios e pode estar envolvido com até 100.000 sinapses (Çarçak, Onat e Sitnikova, 2023; Clarke; Barres, 2013). São subdivididos em 3 classes, as quais dependem da sua morfologia e distribuição espacial no SNC, sendo elas: os astrócitos protoplasmáticos, que se localizam na substância cinzenta; astrócitos polarizados, que residem nas camadas profundas do córtex; e astrócitos fibrosos, localizados na substância branca (Gomes, Tortelli e Diniz, 2013; Gorshkov *et al.*, 2018).

Dentre as principais funções (Tabela 1) exercidas atualmente pelos astrócitos estão: manutenção da saúde neuronal e da função da barreira hemato-encefálica (BHE), contribuição para a plasticidade do SNC, manutenção da homeostase neuronal, manutenção dos níveis iônicos do meio extracelular, captação e liberação de diversos neurotransmissores (Binder, Steinhäuser, 2021; Devinsky *et al.*, 2018; Eid *et al.*, 2019; Gomes, Tortelli e Diniz, 2013; Gorshkov *et al.*, 2018).

Por expressar funções essenciais para a homeostase neuronal, os astrócitos vêm sendo alvos de pesquisas relacionadas a patologias astrocíticas, que acabam gerando como consequências doenças neurodegenerativas. O acúmulo de estresse oxidativo e neuroinflamação crônica como resultado da ineficiência dos astrócitos

contribui significativamente para a degeneração neuronal, o progresso da perda cognitiva e a incapacidade motora (Kozela, Juknat e Vogel, 2017). As principais alterações astrocíticas envolvidas no processo de epileptogênese são: expressão do transportador aquaporina-4 (AQP4); transportador de glutamato-1 (GLT1) e transportador de glutamato-aspartato (GLAST); canais de K<sup>+</sup> retificadores internos (K<sub>ir</sub>); transportadores de monocarboxilato (MCT1 e MCT2), e perturbações na enzima glutamina sintetase (GS) (Eid *et al.*, 2019; Hubbard *et al.*, 2016).

Tabela 1 - Principais funções dos astrócitos

| <b>Funções</b>                | <b>Processo biológico</b>  |
|-------------------------------|--|
| <b>Desenvolvimento do SNC</b> | Orientar a migração de progenitores neurais e facilitar a formação de sinapses   |
| <b>Funções de barreira</b>    | Na BHE, os astrócitos servem para induzir propriedades de barreira nas células cerebrais e endoteliais   |
| <b>Homeostase</b>             | Os astrócitos possuem canais especializados para regular níveis iônicos e neurotransmissores, como glutamato e o GABA; regulação de moléculas pequenas através de junções de gap |
| <b>Suporte metabólico</b>     | A regulação da glicose é uma das principais funções dos astrócitos no SNC; glicogênio astrocítico ajuda a apoiar os neurônios quando as concentrações de glicose são baixas      |
| <b>Transmissão sináptica</b>  | Os astrócitos liberam moléculas para ativar as sinapses e podem modular a excitabilidade neuronal através de suas concentrações de Ca <sup>2+</sup>                              |
| <b>Suporte neurovascular</b>  | Liberaram segundos mensageiros, como óxido nítrico, prostaglandinas e ácido araquidônico; regula alterações no fluxo sanguíneo em resposta à atividade eletrofisiológica         |

Fonte: adaptado de (Clarke; Barres, 2013; Gorshkov *et al.*, 2018).

### 2.3 PERDA DA FUNÇÃO DOS ASTRÓCITOS RELACIONADAS A EPILEPTOGÊNESE

Alterações em canais, receptores e transportadores distintos da membrana dos astrócitos são associados a mecanismos epileptogênicos. Os tópicos a seguir discutem algumas dessas alterações.

### 2.3.1 Disfunção na BHE

Os astrócitos possuem um papel fundamental na manutenção da BHE, seja por meio de fatores secretados, como o *sonic hedgehog* (SHH), apolipoproteína E (ApoE), angiotensina-II (Ang-II) e o fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) (Heithoff *et al.*, 2021; Hubbard *et al.*, 2016; Robel, 2017); ou por possuírem, em sua estrutura, uma composição fibrosa que permite que eles atuem como uma barreira estreita, devido ao seu formato estrelar e seus processos que envolvem as paredes vasculares (Bonsack *et al.*, 2019; Kimelberg e Nedergaard, 2010).

Quando há algum comprometimento nas funções estabelecidas pelos astrócitos, pode ocorrer rupturas na BHE, provocando a exposição de estruturas cerebrais à albumina sérica. Esse processo causa uma neuroinflamação, na qual as células imunes periféricas, incluindo monócitos, células B e T e neutrófilos, infiltram-se no cérebro e ativam a microglia residente (Çarçak, Onat e Sitnikova, 2023; Friedman, Kaufer e Heinemann, 2009). A ocorrência dessa lesão primária na BHE foi relacionada experimentalmente como um dos mecanismos epiletogênicos (Friedman, Kaufer; Heinemann, 2009; Heinemann, Kaufer e Friedman, 2012).

### 2.3.2 Desequilíbrio da homeostase extracelular do K<sup>+</sup>

Os níveis extracelulares de K<sup>+</sup> são críticos para determinar o potencial de membrana dos neurônios em repouso e normalmente são mantidos em aproximadamente 3 a 5 mM. Durante a atividade neuronal fisiológica ocorre uma elevação de cerca de 1 mM na concentração extracelular de K<sup>+</sup>. Entretanto, pode haver aumentos de 10 a 12 mM quando há atividade neural excessiva devido à estimulação elétrica (Çarçak, Onat e Sitnikova, 2023; Kinboshi, Ikeda e Ohno, 2020).

Por meio de seus canais de K<sup>+</sup> Kir, os astrócitos realizam o controle da hiperexcitabilidade neuronal, desempenhando a recaptação do K<sup>+</sup> excedente no meio extracelular (Çarçak, Onat e Sitnikova, 2023). Os astrócitos possuem principalmente 2 subunidades dos canais Kir, sendo elas: Kir 4.1 e Kir 5.1. Estudos demonstram que o canal mais afetado é o subtipo Kir 4.1, que tem atividade reduzida nos modelos de epilepsia, ocasionando uma hiperexcitabilidade por excesso de K<sup>+</sup> (Bordey e Sontheimer, 1998; Schröder *et al.*, 2000). Outro achado, foi que os canais astrócitarios

Kir 4.1 são moduladores da expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), uma neurotrofina essencial para o desenvolvimento e a função normal do SNC. Porém, a expressão elevada de BDNF é conhecida por estar envolvida na patogênese da epilepsia (Kinboshi, Ikeda e Ohno, 2020). A redução ou inibição dos Canais Kir 4.1 produzem um aumento na expressão do BDNF em astrócitos e neurônios relacionando a epileptogênese (Çarçak, Onat e Sitnikova, 2023).

### **2.3.3 Regulação de receptores metabotrópicos (mGluRs) e ionotrópicos (GluR)**

Os receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs) acoplados à proteína G possuem papel importante na neuromodulação sináptica. Eles são subdivididos em três famílias: grupo 1, grupo 2 e grupo 3 (Peterson e Binder, 2020). Os receptores mGluR3 e mGluR5 pertencentes ao grupo 1, são os subtipos predominantes de receptores metabotrópicos de glutamato expressos pelos astrócitos. Quando há ativação desses receptores, é ativado o segundo mensageiro adenosina monofosfato cíclico (cAMP), que provoca um aumento no  $Ca^{2+}$  intracelular. Esse aumento, por meio de canais iônicos dependentes de  $Ca^{2+}$ , pode induzir a liberação de glutamato pelos astrócitos (Binder e Steinhäuser, 2006). O glutamato liberado pode gerar excitação dos neurônios vizinhos e contribuir para o início de convulsões (Çarçak, Onat e Sitnikova, 2023).

Foi demonstrado que a estimulação aguda dos receptores mGluR5 estão relacionados com o aumento da expressão de GLT-1. Por outro lado, a ativação crônica do mesmo está associada a diminuição da expressão dos transportadores de glutamato, GLT-1 e GLAST (Peterson e Binder, 2020). Com isso, um estudo com pacientes de ELTM demonstrou que o aumento da expressão de mGluR5 está relacionado a frequência de crises convulsivas (de Lanerolle, Lee e Spencer, 2010; Notenboom *et al.*, 2006), enquanto sua diminuição está acompanhada de redução da frequência de crises (Peterson e Binder, 2020).

Em relação aos GluR, os astrócitos expressam receptores AMPA compostos pelos subtipos GluR1 ao GluR4. Alterações nos tipos GluR1 e GluR2 foram observadas no hipocampo de pacientes com ELTM (Binder e Steinhäuser, 2006).

### 2.3.4 Desequilíbrio eletrolítico e osmolalidade

As aquaporinas são uma família de proteínas de membrana que funcionam como canais de água em muitos tipos de células e tecidos nos quais o transporte de fluidos é necessário. Esse transporte ocorre em resposta a gradientes osmóticos. Existem diversos tipos de AQPs, mas a de maior importância para neurociência atualmente é a AQP4, pois é expressa pelas células da glia no cérebro e na medula espinhal, principalmente na membrana e processos astrocíticos (Binder, Nagelhus e Ottersen, 2012; Hubbard *et al.*, 2016).

A redução da atividade de AQP<sub>4</sub> em astrócitos foi observada no hipocampo de animais submetidos ao modelo de epilepsia por ácido kainico. Acredita-se que o canal AQP<sub>4</sub> expresso em astrócitos está intimamente relacionado ao canal Kir4.1 e aos transportadores de glutamato, pois a modulação da homeostase da água, do K<sup>+</sup> e do glutamato podem estar associadas a suscetibilidade a convulsões. Nota-se também que a osmolaridade e o tamanho do espaço extracelular reduzido produz hiperexcitabilidade e maior atividade epileptiforme (Binder, Nagelhus e Ottersen, 2012; Çarçak, Onat e Sitnikova, 2023; Lee *et al.*, 2012).

### 2.3.5 Alterações no transporte do GABA

A ação inibitória mediada pelo GABA exerce papel essencial para o controle da transmissão neuronal excitatória. Entretanto, como todo neurotransmissor, seu excesso deve ser removido da fenda sináptica. Essa remoção é realizada por transportadores GABA específicos (GATs) expressos em neurônios e astrócitos, sendo que os astrócitos expressam principalmente o subtipo GAT3 (Andersen *et al.*, 2020).

A síntese do GABA está relacionada com o metabolismo de glutamato realizado pelos astrócitos, uma vez que, para se sintetizar GABA necessita-se de glutamina secretada pelos astrócitos. Após a síntese e secreção do GABA pelos neurônios, ele é recaptado pelos transportadores GAT3 nos astrócitos, podendo haver uma liberação de GABA pela ação reversa do transportador GAT3 (Andersen *et al.*, 2020; Çarçak, Onat e Sitnikova, 2023). Essa liberação reversa é uma forte ação dos astrócitos para o controle da excitabilidade neuronal durante as crises epiléticas

(Goisis *et al.*, 2022). A baixa ou ausência da captação de GABA pelo GAT1 ou GAT3 está relacionada com casos de epilepsia (Cope *et al.*, 2009; Pavlov e Walker, 2013).

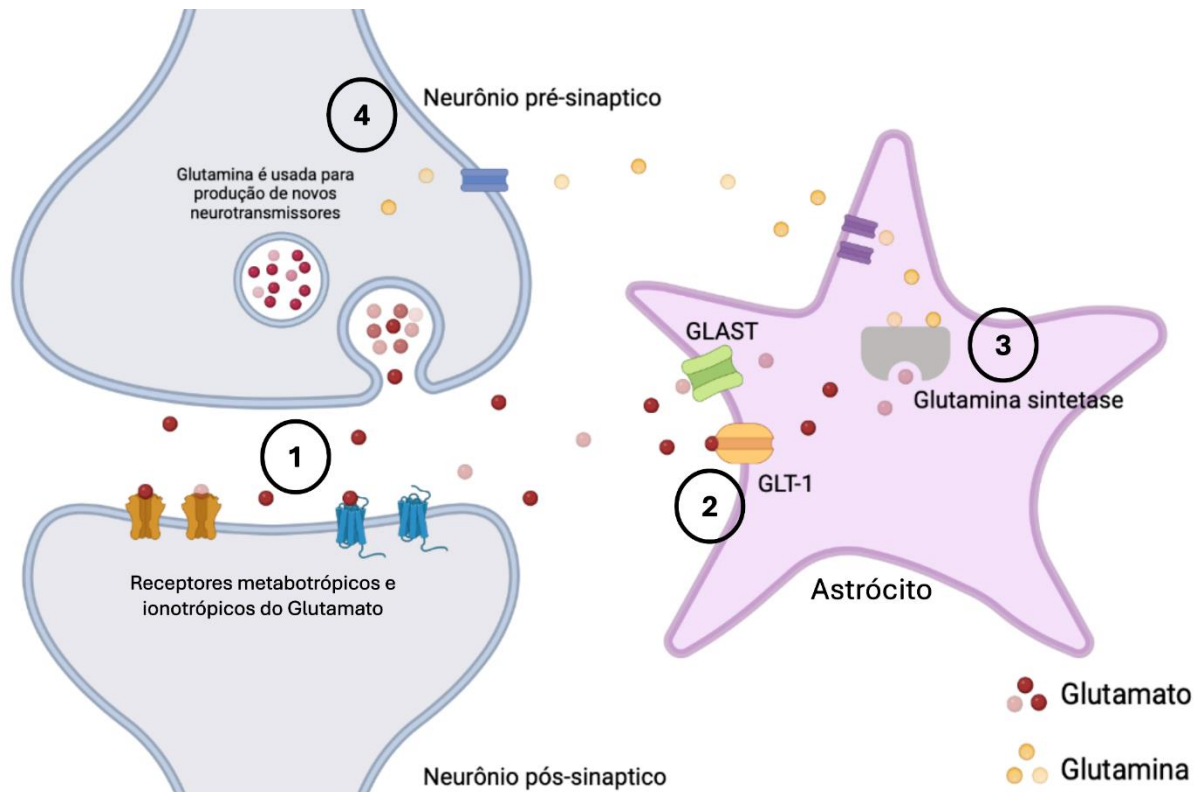
Outro fato é que os astrócitos expressam enzimas essenciais para o metabolismo oxidativo do GABA: GABA-transaminase e semialdeído succinato desidrogenase. Alterações que causem perda de função dessas enzimas estão associadas com epilepsia (Andersen *et al.*, 2020; Malaspina *et al.*, 2016).

### **2.3.6 Alterações no transporte e metabolismo do Glutamato**

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório e de grande abundância no cérebro, possuindo funções importantes, como na plasticidade sináptica, cognição, memória, aprendizado e desenvolvimento do SNC (Karki *et al.*, 2018; Pajarillo *et al.*, 2019). Os astrócitos estão diretamente envolvidos com a síntese, recaptção e eliminação do excesso do glutamato, pois, por se tratar de um neurotransmissor excitatório, as concentrações no meio extracelular devem ser controladas, já que seu excesso pode ocasionar morte neuronal excitotóxica (Çarçak, Onat e Sitnikova, 2023; Gomes, Tortelli e Diniz, 2013; Murphy-Royal *et al.*, 2017). Esse controle é realizado pelos transportadores de glutamato, que são específicos e expressos nas membranas dos astrócitos. São eles: GLT-1, que equivale ao transportador de aminoácidos excitatórios humanos 2 (EAAT2), e o GLAST, que corresponde ao transportador de aminoácidos excitatórios humanos 1 (EAAT1) (Mahmoud *et al.*, 2019; Murphy-Royal *et al.*, 2017; Santos, 2017). Assim, ao ser lançado na fenda sináptica, o glutamato irá se ligar em seus receptores metabotrópicos e ionotrópicos e exercer sua função (Figura 1, etapa 1). O glutamato em excesso na fenda sináptica é transportado para o interior dos astrócitos pelo GLAST e GLT-1 (Figura 1, etapa 2). O GLT-1 é responsável por cerca de 90% da recaptção do glutamato exercida pelos astrócitos (Binder e Steinhäuser, 2021; Çarçak, Onat e Sitnikova, 2023). Uma vez absorvido pelos astrócitos, o glutamato pode sofrer sua conversão em glutamina por meio da GS em uma reação dependente de adenosina trifosfato (ATP) e amônia (Figura 1, etapa 3); a glutamina formada pode ser lançada para o espaço extracelular e ser captada pelos terminais pré-sinápticos dos neurônios, onde será novamente convertida em glutamato pela enzima glutaminase, dando recomeço ao ciclo, chamado de ciclo glutamato glutamina (Figura 1, etapa 4). Esse mecanismo astrocitário é de suma

importância quando há intensa atividade sináptica excitatória, para que os níveis de glutamato possam atingir equilíbrio e não gerar uma excitotoxicidade (Albrecht e Zielińska, 2017; Devinsky *et al.*, 2013; Hubbard *et al.*, 2016; Malerba, 2019).

**Figura 1** - Ciclo glutamato glutamina



Fonte: Autor (2024).

Legenda: Mecanismo do ciclo glutamato glutamina. Glutamato é liberado pelos neurônios pré-sinápticos e se liga aos seus receptores (1); após sua liberação e ação, o glutamato em excesso é captado pelos astrócitos (2); dentro dos astrócitos, o glutamato é convertido em glutamina pela enzima glutamina sintetase (3); A glutamina é transportada de volta para os neurônios e utilizada para formação de novos neurotransmissores, como o glutamato (4).

Apesar dos mecanismos envolvidos em distúrbios neurológicos não estarem bem compreendidos, estudos recentes estão buscando correlacionar a incidência de astrócitos reativos, ou seja, aqueles que perderam a capacidade de exercer corretamente suas funções, com problemas na expressão dos transportadores de glutamato (Devinsky *et al.*, 2013; Eid *et al.*, 2019; Hubbard *et al.*, 2016; Pajarillo *et al.*, 2019) e na expressão da GS (Devinsky *et al.*, 2013; Eid *et al.*, 2019; Pekny *et al.*, 2016). O uso de agentes que bloqueiam GLT-1 e GLAST demonstraram, em modelo *in vitro* de cultura neuronal, o aumento de descargas epileptiformes devido ao acúmulo de glutamato (Sun, Sombati e Delorenzo, 2001). Trabalhos de estudos em pacientes

com ELTM resistentes ao tratamento, apresentam níveis reduzidos de EEAT1 e EEAT2 (de Lanerolle, Lee e Spencer, 2010; Hubbard *et al.*, 2016; SARAC *et al.*, 2009), enquanto em modelo animal de epilepsia por ácido kainico, observou-se um aumento inicial significativo da expressão de GLT1 no hipocampo no 1° dia após *status epilepticus* (SE). Porém, esse aumento foi seguido por uma redução acentuada a partir do 4° e 7° dias após o SE (Hubbard *et al.*, 2016). Camundongos com deficiência na expressão de GLT-1 desenvolveram convulsões letais, já camundongos transgênicos que superexpressam GLT-1 obtiveram um limiar convulsivo mais alto (Peterson; Binder, 2020). Outros achados mostram que a expressão reduzida da GS no hipocampo está relacionada aos casos de ELTM (Devinsky *et al.*, 2013; Eid *et al.*, 2004; Pekny *et al.*, 2016).

Níveis elevados de proteína ácida fibrilar glial do filamento intermediário (GFAP), principal constituinte dos filamentos intermediários dos astrócitos, que quando alterada sinaliza mudanças marcantes na forma e perda de função astrocíticas, foram observados em casos de alteração no ciclo glutamato glutamina (Çarçak, Onat e Sitnikova, 2023; Pekny *et al.*, 2016; Peterson; Binder, 2020; SARAC *et al.*, 2009), fato este, que pode levar ao acúmulo de glutamato no meio extracelular, ocasionando um aumento prejudicial na excitabilidade, uma condição relacionada ao mecanismo de epileptogênese (Devinsky *et al.*, 2013; Hubbard *et al.*, 2016).

## 2.4 MODELOS EXPERIMENTAIS *IN VITRO* DE EPILEPSIA

Atualmente, o uso de técnicas *in vitro* vem conquistando cada vez mais importância no âmbito científico, principalmente por permitir economizar tempo e recursos, minimizando o uso de animais e requisitos éticos, ao mesmo tempo em que permite obter um número maior de repetições, miniaturização ou até mesmo automação (Campos *et al.*, 2018).

Para a epilepsia, existem vários modelos experimentais *in vitro*, geralmente usados para estudar possíveis compostos anticonvulsivantes. Cada modelo possui suas vantagens e limitações.

### 2.4.1 Utilização de fatias de cérebro humano ou de animais

Fatias frescas do tecido cerebral, principalmente do hipocampo de roedores, são coletadas e utilizadas com intuito de estudar a atividade elétrica em condições que mimetizam a epilepsia, como alta concentração de  $K^+$  ou aplicação de fármacos epileptogênicos, como a pilocarpina e o ácido kaínico. Essa técnica apresenta como vantagem a permanência da estrutura mãe do tecido. Entretanto, como limitações, deve se atentar com idade do tecido utilizado, um hipocampo adulto é diferente de um hipocampo pós-natal precoce, e geralmente a vida útil do tecido é inferior (Campos *et al.*, 2018; Oblasov *et al.*, 2024).

Uma alternativa adotada para preservar as características do tecido e aumentar a duração do mesmo, é realizar a cultura celular das fatias coletadas, sendo elas, geralmente transferidas para uma membrana porosa em placas de cultura e nutridas por um meio de cultura específico. Essa técnica permite a conservação da estrutura do tecido por semanas ou até meses, permitindo o estudo de efeitos a longo prazo. Outra vantagem, está na possibilidade de testar compostos e medicamentos que não atravessam a BHE, permitindo o contato direto com o tecido (Noraberg *et al.*, 2005; Oblasov *et al.*, 2024).

#### **2.4.2 Cultura de células neuronais**

Por meio da coleta de tecidos cerebrais, exemplo do hipocampo, são realizadas culturas primárias de neurônios, dissociando o tecido coletado de embriões ou neonatos de roedores, e cultivando em placas de cultura. É necessário o cultivo de células gliais junto aos neurônios para suporte neuronal. Após a maturação neuronal, cerca de 20 a 30 dias de cultivo, a cultura pode ser estimulada por compostos excitatórios, promovendo hiperexcitabilidade neuronal semelhante aos quadros convulsivos na epilepsia (Goshi *et al.*, 2020; Sun, Sombati e Delorenzo, 2001). Como agentes indutores para epilepsia em cultura de células neuronais, geralmente são usados: antagonistas dos receptores  $GABA_A$ , bicuculina e Pentilenotetrazol (PTZ); bloqueador dos canais de potássio; agonista dos receptores NMDA e adição de glutamato. Também é possível induzir a hiperexcitabilidade, alterando o meio em contato com as células, utilizando de altas concentrações de  $K^+$ , provocando a despolarização dos neurônios, ou baixa concentração de  $Mg^{2+}$ , aumentando a

liberação de cálcio pelos receptores NMDA (Albrecht e Zielínska, 2017; Sun, Sombati e Delorenzo, 2001).

Linhagens de cultura imortalizada também podem ser utilizadas, como a linhagem de células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) e a linhagem de feocromocitoma de rato (PC12), que podem ser diferenciadas em neurônios e usadas para estudar a atividade epileptiforme (Avola *et al.*, 2018; Zeng *et al.*, 2023).

A cultura de células neuronais apresenta como vantagens: um ambiente controlado, controle sobre a composição do meio de cultura, a aplicação de drogas e a manipulação das condições experimentais; são técnicas altamente reprodutíveis, com menor variabilidade em comparação com modelos *in vivo*; permite o estudo de mecanismos celulares e moleculares isolados, sem a interferência de fatores sistêmicos presentes em modelos animais; permite o monitoramento em tempo real da atividade neuronal, como mudanças na excitabilidade e conectividade sináptica; permite estudos das interações entre os neurônios e as células da glia; permitem a triagem de novos compostos farmacológicos e a avaliação de efeitos neurotóxicos; e possuem um baixo custo em comparação com a criação e manutenção de modelos animais. (Deshpande *et al.*, 2007; Goshi *et al.*, 2020; Mattson *et al.*, 1995; Miguel Sanz *et al.*, 2023).

Como limitações, os neurônios cultivados por longos períodos podem sofrer mudanças fenotípicas e genéticas; geralmente as culturas são originadas de modelos animais, como roedores, o que pode limitar a correlação para humanos; e os neurônios podem apresentar conexões desordenadas (Oblasov *et al.*, 2024).

Com o avanço da ciência, novas técnicas estão surgindo, dentre elas, está o uso de placas de cultura com microelétrodos, as quais os neurônios são cultivados em uma fina camada acima de uma matriz de microelétrodos (MEAs, do inglês: *microelectrode array*), para registro da atividade elétrica. São inúmeras vantagens frente as citadas anteriormente na cultura de neurônios tradicional. É possível o estímulo da cultura com sequências elétrica transmitidas por meio dos eletrodos da matriz, por se tratar de uma fina monocamada de células, mudanças na morfologia são fáceis de se observar aplicando técnicas de imagem e por fim, as culturas em MEAs tem uma alta sobrevivência, podendo ser cultivadas por mais de um ano (Biswas, 2017; Fan *et al.*, 2019; Hales, Rolston e Potter, 2010; Miguel Sanz *et al.*, 2023).

## 2.5 MODELOS EXPERIMENTAIS *IN VIVO* DE EPILEPSIA

Os modelos experimentais *in vivo* de epilepsia representam ferramentas cruciais para o estudo do mecanismo de epileptogênese e para o desenvolvimento de novos tratamentos. Eles mimetizam melhor as características clínicas da epilepsia humana, proporcionando uma visão mais completa das interações entre diferentes sistemas biológicos, a evolução das crises epiléticas e os efeitos de intervenções terapêuticas (Oblasov *et al.*, 2024).

Existem diversos tipos de modelos de indução para epilepsia, variando de acordo com as características e objetivos dos estudos propostos.

### 2.5.1 Modelo químico

Utilizam de substâncias, geralmente fármacos, que alteram a atividade neuronal de maneira a desencadear crises convulsivas. Possuem como vantagens a praticidade do uso, baixo custo, e induzem crises de forma controlada. Entretanto, não são adequados para estudo crônico, podem gerar altos índices de mortalidade e variabilidade na resposta dos animais. A pilocarpina, o ácido kainico e o PTZ são os agentes químicos mais utilizados (Kandratavicius *et al.*, 2014; Rubio *et al.*, 2010). Atualmente o PTZ, um antagonista não competitivo dos receptores GABA<sub>A</sub>, vem ganhando destaque, pois, diferente dos outros agentes químicos, as concentrações utilizadas para indução das crises convulsivas são bem estabelecidas, permitindo controle sobre a severidade e a duração das crises, crises reprodutíveis e consistentes, e uma baixa mortalidade (Miguel Sanz *et al.*, 2023).

### 2.5.2 Modelo genético

São desenvolvidos a partir de mutações genéticas, espontâneas ou induzidas, de alguns genes específicos associados a formas de epilepsia, como exemplo os genes: SCN1A e CACNA1A. As mutações induzidas podem ocorrer por meio da deleção de um gene específico (*Knockout*) ou a introdução de em um gene no genoma do animal (*Knock-in*). A vantagem do modelo genético está na precisão em reproduzir os fenótipos da epilepsia encontradas em humanos. Já como limitação, é visto que, a

manutenção dos genes possui alto custo e um tempo elevado, especialmente quando se trata de gerar e caracterizar novas linhagens transgênicas (Raol e Brooks-Kayal, 2012).

### **2.5.3 Modelo por estimulação elétrica**

Envolve a aplicação de correntes elétricas em regiões específicas do cérebro, como o hipocampo, a amígdala ou o córtex (Rubio *et al.*, 2010). A intensidade, a frequência e a duração da estimulação podem ser ajustadas de acordo com o objetivo do estudo. Os estímulos repetidos podem levar ao desenvolvimento de um estado epiléptico agudo ou crônico (Kandratavicius *et al.*, 2014). Os estímulos podem ser de alta frequência, capazes de originar crises convulsivas agudas, ou estímulos repetidos de baixa frequência, técnica denominada *kindling*, na qual estímulos subconvulsivos repetidos são aplicados a uma área específica do cérebro. Com o decorrer do tempo, as crises convulsivas espontâneas e generalizadas começam a ocorrer (Miguel Sanz *et al.*, 2023; Raol e Brooks-Kayal, 2012). As vantagens do modelo elétrico são: permite o controle preciso da indução das crises e em casos de estímulos repetidos de baixa frequência, é capaz de reproduzir de forma gradual a transição de um cérebro normal para um estado epiléptico, permitindo o estudo dos estágios iniciais e progressão da epilepsia. As limitações incluem: processo invasivo, geralmente tem que realizar o implante de eletrodos, o que pode ocasionar danos cerebrais severos (Kandratavicius *et al.*, 2014; Rolston *et al.*, 2011; Rubio *et al.*, 2010).

### **2.5.4 Escolha da espécie animal**

A escolha do animal ideal pode variar de acordo com o tipo de epilepsia que se pretende estudar, sendo uma decisão crítica, que pode influenciar significativamente nos resultados e na relevância do estudo (Rubio *et al.*, 2010). Alguns pontos devem ser levados em consideração para escolha correta do modelo animal, como: similaridade fisiológica com humanos; a idade, em termos de anatomia, fisiologia e neuroquímica, há grande diferença entre um cérebro imaturo e um adulto; o tempo de vida e ciclo reprodutivo, geralmente animais com ciclo de vida curto são utilizados para estudos de reprodução e para compreender os efeitos da epilepsia durante todo o período de vida; os deveres éticos, considerar o bem-estar animal e o princípio dos

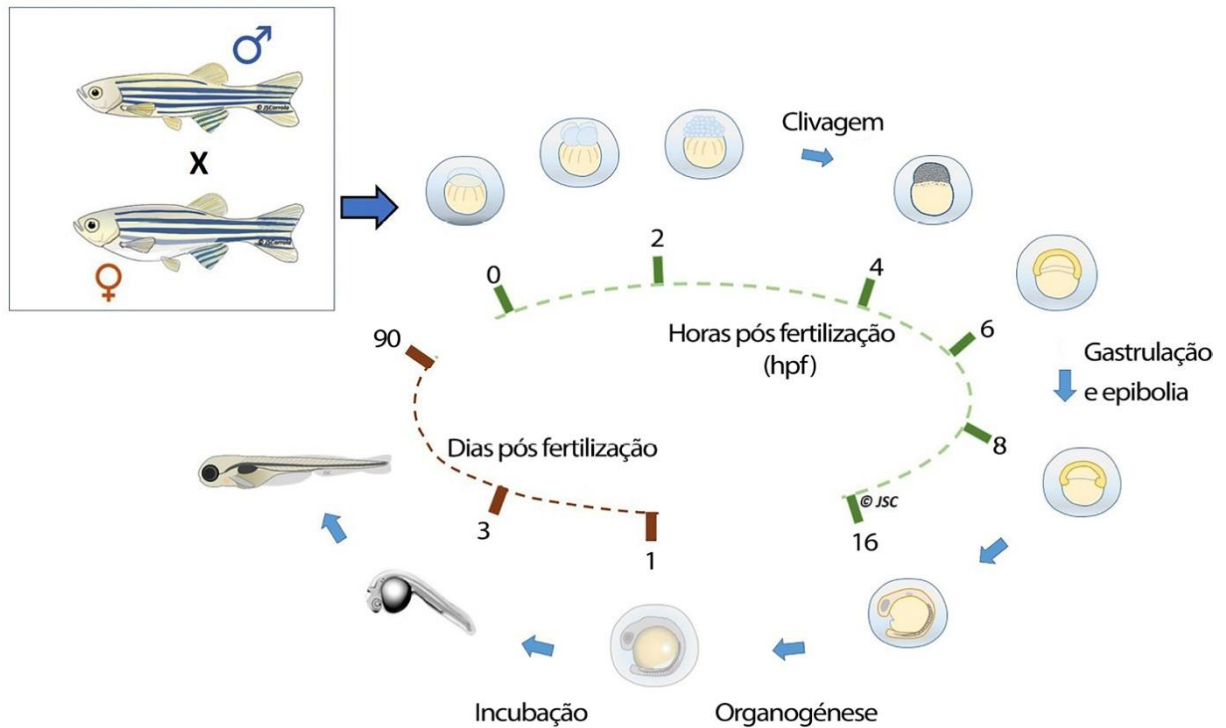
3Rs (redução, refinamento e substituição); a etiologia da epilepsia que se deseja estudar, genética ou por causas adquiridas; e o custo e disponibilidade, para garantir que o estudo seja financeiramente viável (Grone e Baraban, 2015; Raol e Brooks-Kayal, 2012).

Nos primórdios das pesquisas sobre a epilepsia, eram utilizados modelos de convulsões induzidas em gatos, cães, coelhos e primatas não humanos (Grone e Baraban, 2015). Atualmente os modelos animais mais utilizados são os roedores (ratos e camundongos), por apresentarem maior semelhança ao SNC humano. Entretanto, com a crescente conscientização ética e com os custos de manutenção desses animais, novos modelos são recomendados (D'Amora *et al.*, 2023).

O Zebrafish (*Danio rerio*), um pequeno peixe de água doce, originário do sudeste asiático, tem se destacado como um modelo versátil e eficiente para estudos neurobiológicos, incluindo a epilepsia (Miguel Sanz *et al.*, 2023). O primeiro estudo utilizando o modelo de epilepsia em Zebrafish foi desenvolvido em 2005 pelo grupo do pesquisador Baraban, o qual demonstrou que o Zebrafish é um modelo eficaz para estudar a epilepsia, pois houve a presença de comportamentos convulsivos típicos e o aumento da atividade neural (Baraban *et al.*, 2005).

O Zebrafish possui um ciclo de vida curto (Figura 2), possuindo quatro estágios de desenvolvimento: embrião (aproximadamente 72h após a fertilização, hpf); larva (3 a 30 dias após a fertilização, dpf); peixe juvenil (alcançando um padrão completo de escamas e perdendo completamente a dobra da barbatana larval; 1 a 3 meses) e peixe adulto (obtendo capacidade de reprodução) (de Abreu *et al.*, 2020). Os peixes adultos possuem alta taxa de fecundidade, são capazes de produzir centenas de embriões por semana, permitindo a realização de experimentos em larga escala e com múltiplas replicações. Devido ao seu tamanho, são de fácil manuseio e de baixo custeio. Absorvem facilmente pelas brânquias, compostos adicionados a água. Apresentam como característica, a transparência de seus embriões, o que facilita a observação direta do desenvolvimento neuronal e da atividade cerebral em tempo real. Além disso, possui alta semelhança fisiológica com os seres humanos, com mais de 82% dos genes associados à doença em humanos, e adequação com os princípios éticos estabelecidos pelos 3Rs. Todos esses recursos tornam o uso do Zebrafish um candidato ideal para a triagem de compostos anticonvulsivantes (D'Amora *et al.*, 2023; Miguel Sanz *et al.*, 2023; Tomasello e Sive, 2020).

Figura 2 - Fases do ciclo de vida do Zebrafish



Fonte: (Ribeiro *et al.*, 2022)

## 2.6 SISTEMA ENDOCANABINÓIDE

O sistema endocanabinoide é composto por seus receptores, seus agonistas endógenos e o aparato de enzimas responsáveis por sua biossíntese e degradação (Fraguas-Sánchez e Torres-Suárez, 2018; Saito, Wotjak; Moreira, 2010). Os endocanabinoides conhecidos atualmente são a etanolamina araquidonoil (anandamida), glicerol 2-araquidonoil, dopamina N-araquidonoil, éter glicerol 2-araquidonoil (noladina) e a etanolamina O-araquidonoil (De Caro *et al.*, 2017; Saito, Wotjak e Moreira, 2010), compostos esses, que são sintetizados sob demanda a partir de precursores lipídicos na membrana celular. Devido a sua participação em vários processos fisiológicos do organismo, como balanço energético, estimulação do apetite, pressão arterial, modulação da dor, embriogênese, controle de náuseas e vômitos, memória, aprendizado e resposta imune, atualmente há um grande interesse nessas substâncias como potencial terapêutico para algumas patologias, como a epilepsia (Corrêa *et al.*, 2020; De Caro *et al.*, 2017; Fraguas-Sánchez e Torres-Suárez, 2018; Giacoppo *et al.*, 2014; Laprairie, Bagher e Denovan-Wright, 2017).

Anteriormente, o termo canabinóide era utilizado para caracterizar compostos específicos presentes na *Cannabis spp.*, planta amplamente conhecida por seus efeitos psicoativos e seu uso recreativo. Entretanto, atualmente o termo não inclui apenas fitocanabinoides, mas também endocanabinoides e os análogos sintéticos de ambos os grupos (Fraguas-Sánchez e Torres-Suárez, 2018). A *Cannabis* possui cerca de 100 fitocanabinoides, sendo os principais e mais estudados:  $\Delta^9$ -tetraidrocanabinol (THC) e CBD (Abuhasira, Shbiro e Landschaft, 2018; Giacoppo *et al.*, 2014). Por ser responsável pelos principais sintomas psicoativos a introdução na prática clínica do THC é controversa e fortemente limitada, já o CBD é o principal constituinte não psicoativo e vem sendo avaliado em estudos pré-clínicos e clínicos em várias patologias, incluindo epilepsia (De Caro *et al.*, 2017; Giacoppo *et al.*, 2014; Iseger e Bossong, 2015; Mechoulam e Carlini, 1978).

A descoberta de receptores para os canabinoides, que consistem em receptores acoplados à proteína G foi um grande avanço, pois, anteriormente sugeria-se que sua ação era oriunda primariamente de alteração das características físico-químicas das membranas celulares (Mechoulam e Carlini, 1978; Saito, Wotjak e Moreira, 2010). Os dois principais receptores são o receptor CB1 e CB2, no qual o CB1 encontra-se amplamente distribuído no SNC, equiparando as vias glutamatérgicas, sendo expresso predominantemente em áreas relacionadas à coordenação motora (cerebelo, núcleos da base e substância negra), atenção e funções cognitivas complexas (córtex cerebral), aprendizado, memória e emoções (amígdala e hipocampo), como também presente em células da micróglia, astrócitos e oligodendrócitos, e em tecidos não neuronais, incluindo útero, próstata, testículo, estômago, endotélio vascular e sistema esquelético (De Caro *et al.*, 2017; Fraguas-Sánchez e Torres-Suárez, 2018; Gomes, Tortelli e Diniz, 2013;). Já o CB2, diferente do CB1, não afeta as estruturas motoras e do humor, ele é encontrado principalmente no sistema imunológico, porém foi demonstrado sua presença no SNC nas células da glia, especialmente em circunstâncias de inflamação (Fraguas-Sánchez e Torres-Suárez, 2018; Onaivi *et al.*, 2006; Sickle *et al.*, 2005;).

Os mecanismos de ação dos receptores CB1 e CB2 necessitam de estudos mais aprofundados, entretanto, são sugeridos 3 principais mecanismos: 1) ativação da proteína  $G_{i/o}$ , resultando na inibição da enzima adenilato ciclase, levando a uma diminuição na produção de cAMP. O cAMP é uma molécula de sinalização importante

que regula várias vias celulares. A redução nos níveis de cAMP diminui a atividade da proteína quinase A (PKA), o que por sua vez, pode levar a alterações na expressão gênica e na função celular; 2) por meio da modulação de canais iônicos, por exemplo, a ativação dos receptores CB1 podem promover a abertura de canais de K<sup>+</sup> e o fechamento de canais de Ca<sup>2+</sup>, resultando em uma hiperpolarização da membrana neuronal e na redução da liberação de neurotransmissores, como o glutamato e o GABA; e 3) Ativação de vias de sinalização intracelular, como as vias das MAP quinases (ERK1/2), da fosfolipase C e da proteína quinase B. Essas vias estão envolvidas na regulação de processos celulares como crescimento, sobrevivência e plasticidade neuronal.

Por possuírem efeito modulador na liberação de neurotransmissores, inibindo a liberação de neurotransmissores excitatórios, os receptores CB1 e CB2 contribuem para o controle da excitabilidade neuronal e da plasticidade sináptica, influenciando processos como aprendizado, memória e percepção da dor (Bayewitch *et al.*, 1995; Giacoppo *et al.*, 2014; Gomes, Tortelli e Diniz, 2013; Laprairie, Bagher e Denovan-Wright, 2017; Mackie, 2008; Monory *et al.*, 2006). Como a excitabilidade neuronal está relacionada ao mecanismo de epileptogênese, a ativação do receptor CB1, promove a inibição retrógrada da liberação de glutamato, atuando como um possível alvo para tratamentos anticonvulsivantes (Corrêa *et al.*, 2020; Giacoppo *et al.*, 2014; Monory *et al.*, 2006). A ativação dos receptores CB2 ocorre devido a eventos prejudiciais, como neuro-inflamação e isquemia cerebral. Deste modo, quando ativados, limitam a migração celular e a liberação de estímulos pró-inflamatórios, limitando a resposta inflamatória e modulando a liberação de citocinas (Giacoppo *et al.*, 2014; Laprairie, Bagher e Denovan-Wright, 2017)

### **2.6.1 CBD**

Como descrito no tópico anterior, o CBD é principal constituinte não psicoativo presente na planta *Cannabis spp.* Por apresentar propriedades anticonvulsivantes, analgésicas, ansiolítico, antieméticas, imunomoduladoras, anti-inflamatórias, neuroprotetoras e antitumorigênicas em modelos experimentais, ele vem sendo empregado na busca de novas terapêuticas para doenças neurológicas (Corrêa *et al.*, 2020; Franco e Perucca, 2019).

O mecanismo de ação do CBD ainda não foi completamente esclarecido. Inicialmente, acreditava-se que sua ação era devido à sua interação com receptores CB1 e CB2, porém, atualmente pesquisas demonstram que o CBD tem uma afinidade muito baixa para os receptores CB1 e CB2, sendo improvável que em doses terapêuticas haja essa interação funcional (Leo, Russo e Elia, 2016; Stott *et al.*, 2019). Provavelmente, os efeitos provados pelo CBD sejam por seu perfil multialvo, atuando por diversos mecanismos (Mechoulam e Carlini, 1978; Petr *et al.*, 2015). Atualmente, várias pesquisas buscam correlacionar os mecanismos de ação do CBD com sua atividade anticonvulsivante. A literatura relata que o CBD pode influenciar a hiperexcitabilidade neuronal por: 1) reduzir a liberação sináptica de glutamato como resultado de seu antagonismo no receptor GPR55; 2) ativar os receptores 5-HT<sub>1a</sub>; 3) estimular e dessensibilizar o potencial do receptor transitório do canal de anquirina tipo 1 (TRPA1); 4) estimular e dessensibilizar os canais TRPV1 e 2 TRPV2; 5) inibir a captação sináptica de noradrenalina, GABA, adenosina e dopamina, e 6) estimular a atividade dos receptores de glicina  $\alpha 3$  e  $\alpha 1$  (Franco e Perucca, 2019; Ibeas Bih *et al.*, 2015; Kozela, Juknat e Vogel, 2017; Leo, Russo e Elia, 2016; Mechoulam e Carlini, 1978; Stott *et al.*, 2019). A redução da liberação de glutamato está associada a diminuição no influxo de  $Ca^{2+}$  extracelular, principalmente por causa da dessensibilização dos canais TRPV1 e o antagonismo do receptor GPR55 (Franco e Perucca, 2019; Stott *et al.*, 2019).

Devido ao amplo espectro de ação do CBD, evidências clínicas indicam que ele seja um promissor composto para controlar a epilepsia com convulsões refratárias em adultos e crianças, demonstrando um perfil de efeitos colaterais favorável frente aos tratamentos convencionais (Stott *et al.*, 2019).

### **2.6.2 CBD x Epilepsia**

Atualmente diversos modelos experimentais de epilepsia são empregados em pesquisas, dentre eles está a utilização de PTZ, pilocarpina e ácido kainico. Neste contexto, o CBD vem apresentando resultados promissores nos modelos animais de epilepsia. Jones e colaboradores (2010), utilizando o modelo por PTZ, observaram que um pré-tratamento com CBD (100 mg/Kg; i.p.) foi capaz de diminuir a ocorrência de convulsões, bem como a mortalidade, quando comparado a ratos controle. Para o

modelo de pilocarpina, observaram que o pré-tratamento com CBD (100 mg/Kg; i.p.) diminuiu a ocorrência de convulsões (Jones *et al.*, 2012). Agora, se tratando de um modelo crônico de epilepsia por pilocarpina, o CBD apresentou uma melhora nos comportamentos relacionados à convulsão, tanto na administração única de 100 ng por via intracerebroventricular, quanto na administração repetida de 100ng por 5 dias consecutivos (Hosseinzadeh *et al.*, 2016). No modelo crônico por PTZ, concentrações de CBD (20 e 50 mg/Kg), em ratos, foram capazes de reduzir as convulsões. Além disso, foi observado que o CBD pode aumentar os efeitos anticonvulsivos de fármacos antiepiléticos (DEAs), como a fenitoína, devido sua capacidade de interações farmacocinéticas e farmacodinâmicas (Leo, Russo e Elia, 2016).

Os primeiros ensaios clínicos randomizados utilizando CBD que demonstraram eficácia frente a ELTM refratária aos tratamentos convencionais foram feitos por pesquisadores brasileiros (Cunha *et al.*, 1980; Mechoulam e Carlini, 1978). Dos 15 pacientes selecionados, 8 foram tratados com CBD (200 e 300 mg/Kg por dia). Para 4 dos 8 pacientes tratados não foram observadas convulsões, para 3 pacientes foram observadas melhoras no quadro clínico e para apenas 1 não se relatou diferença com o tratamento (Cunha *et al.*, 1980). Outros estudos controlados foram feitos, relatando efeito benéfico do uso do óleo de CBD frente a diferentes tipos de epilepsia (Ames e Cridland, 1986; Mechoulam e Carlini, 1978). Infelizmente, esses estudos são baseados em dados de baixa qualidade, pois possuem um número pequeno de pacientes em cada ensaio, variando de 9 a 15. Além disso, esses ensaios não esclareceram se o CBD é eficaz por si só ou por meio da combinação de efeitos junto aos DEAs, devido ao fato de os pacientes continuarem com seus tratamentos pré-estabelecidos antes dos ensaios clínicos (Franco e Perucca, 2019; Leo, Russo e Elia, 2016).

Portanto, pela falta de estudos controlados, a maioria das pesquisas na literatura são baseadas principalmente em relatos de casos e estudos epidemiológicos. Neste contexto, diversas pesquisas demonstraram efeito relevante do CBD sobre as convulsões geradas na epilepsia (Devinsky *et al.*, 2016), como o relato de Porter e Jacobson (2013), no qual foi utilizado o extrato da *Cannabis* enriquecido com CBD em crianças com epilepsia resistente ao tratamento. Neste estudo, observou-se a redução da frequência de crises em 84% dos pacientes, obtendo ainda efeitos benéficos como aumento da atenção, melhora do humor e do

sono; e como efeitos colaterais, a sonolência e fadiga. Em outro relato com crianças com síndrome de Dravet, epilepsia infantil que está associada a convulsões resistentes a medicamentos, o uso do CBD proporcionou a redução na frequência das crises convulsivas em cerca de 50% em 43% dos pacientes (Devinsky *et al.*, 2017).

### **2.6.3 Análogos do CBD**

Análogos são compostos químicos que são estruturalmente semelhantes a outro, mas com modificações em sua composição molecular. No contexto de fármacos, um análogo de uma substância ativa (como o CBD) é desenvolvido para preservar a função terapêutica do composto original, mas pode ser modificado para melhorar certas propriedades, como eficácia, segurança ou biodisponibilidade (Wermuth, 2006).

Os análogos do CBD geralmente possuem modificações que preservam a atividade sobre os receptores canabinoides e outros alvos moleculares, como o receptor 5-HT<sub>1A</sub> e o TRPV1. Essas modificações podem incluir alteração de grupos funcionais ou a introdução de novas cadeias laterais que podem alterar a farmacocinética, biodisponibilidade, e perfil de interação com o sistema endocanabinoide (Fride *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2023). De acordo com a localização da molécula do CBD, onde ocorre as modificações, seus análogos podem ser divididos em três categorias: 1) análogos que modificam a parte de terpenos, 2) análogos que modificam o anel benzênico e 3) análogos com modificações simultâneas tanto no anel benzênico quanto na porção de terpeno (Li *et al.*, 2020).

Uma possível vantagem dos análogos no tratamento da epilepsia é a possibilidade de melhorar a eficácia terapêutica. Ao modificar a estrutura química do composto original, é possível otimizar a interação do fármaco com os receptores cerebrais envolvidos na regulação da atividade elétrica, resultando em um controle mais eficaz das crises convulsivas. Análogos do CBD podem ser projetados para se ligar de maneira mais seletiva a receptores canabinoides ou a outros alvos moleculares relevantes, potencializando o efeito anticonvulsivante (Ben-Shabat *et al.*, 2006; Fride *et al.*, 2004).

Além disso, os análogos podem ajudar a reduzir os efeitos colaterais associados ao uso prolongado de DEAs, como sedação, tontura e distúrbios

cognitivos, desenvolvendo medicamentos com perfil de segurança mais favorável, melhorando a qualidade de vida dos pacientes (Li *et al.*, 2020; Wermuth, 2006).

### 3 JUSTIFICATIVA

A ELTM é um tipo de epilepsia focal que tem origem em estruturas mesiais do lobo temporal (ex. hipocampo) e tem grande relevância clínica pela alta prevalência e gravidade, especialmente quando ocorre na infância, repercutindo, principalmente em alterações de linguagem e memória. Apesar da introdução de novos DEAs, a qualidade de vida e a eficácia terapêutica muitas das vezes não são atingidas, sendo que, os tratamentos atuais visam apenas o alívio dos sintomas e não impedem a progressão do dano neuronal. Infelizmente, mesmo com o avanço da medicina, os novos medicamentos não conseguem reduzir satisfatoriamente o número de pacientes refratários, o que, na ELTM, são cerca de 30% dos pacientes. Portanto, o entendimento de mecanismos epileptogênicos e a busca por novas moléculas com potencial terapêutico, em longo prazo, se torna essencial. Novos medicamentos podem reduzir os custos associados ao tratamento da epilepsia, como hospitalizações frequentes e perda de produtividade. Além disso, melhorar a eficácia dos tratamentos pode ajudar os pacientes a ter melhor qualidade de vida, beneficiando a sociedade como um todo. Já se sabe que o CBD e alguns dos seus derivados tem efeitos importantes na diminuição da gravidade e no número de crises convulsivas, principalmente em crianças. Os mecanismos de como isso ocorre ainda estão sendo extensivamente estudados. Neste sentido, diferentes abordagens e modelos experimentais são importantes para esclarecer a eficácia e o mecanismo de ação do CBD e seus análogos.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo geral a elucidação os efeitos do CBD e seus análogos na epilepsia, utilizando diferentes abordagens e modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Primeira fase do projeto (Estudos *in vitro*):

- a) avaliar o efeito citotóxico de 57 compostos análogos do CBD em culturas primárias de astrócitos do hipocampo de ratos *Wistar*, para seleção dos melhores candidatos para os testes *in vitro*;
- b) avaliar os efeitos do CBD e seus análogos no modelo experimental de epilepsia *in vitro*, com excesso de glutamato extracelular, em astrócitos de cultura primária, utilizando os seguintes parâmetros: viabilidade celular frente ao estímulo e quantificação de glutamato intra e extracelular;
- c) avaliar os efeitos do CBD e seus análogos no modelo experimental de epilepsia *in vitro*, com excesso de glutamato extracelular, em cocultura de astrócitos e neurônios, utilizando os seguintes parâmetros: expressão de GFAP e análise da atividade elétrica neuronal.

Segunda fase do projeto (Estudos *in vivo*):

- a) avaliar o efeito do CBD e seus análogos selecionados no modelo *in vivo* de epilepsia induzida por PTZ em ratos *Wistar* com 11 dias de idade (P11). Observando a latência e a duração das crises;
- b) avaliar o efeito do CBD e seus análogos selecionados no modelo *in vivo* de epilepsia induzida por PTZ em larvas de Zebrafish 7dpf, analisando os parâmetros: distância percorrida, velocidade, tempo de imobilidade e frequência de rotação;

- c) Quantificar o RNA mensageiro (RNAm) para c-Fos e Interleucina 1-beta (IL-1B) no modelo *in vivo* de epilepsia induzida por PTZ em larvas de Zebrafish tratadas com o CBD e seus análogos selecionados.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 ANIMAIS

#### 5.1.1 Ratos *Wistar*

Para a realização dos experimentos *in vitro* na Unifal-MG foram utilizados 40 ratos da linhagem *Wistar* neonatos, nascidos a partir de matrizes obtidas do Biotério de Experimentação do Laboratório de Fisiologia da Universidade Federal de Alfenas/MG. Para a realização dos experimentos *in vitro* na George Mason University, por meio da orientação da Profa. Dra. Nathalia Peixoto, foram utilizados 20 ratos da linhagem *Wistar* neonatos, nascidos a partir de matrizes obtidas no '*Animal facility of Krasnow Institute*'. Dois dias após o nascimento, os filhotes foram separados e submetidos ao procedimento para remoção do hipocampo. Os animais foram rapidamente eutanasiados por decapitação e o hipocampo dissecado e mantido em meio apropriado até o momento do processamento. Esses procedimentos foram executados segundo os protocolos de ética CEUA 0004/2021 (Unifal-MG; Anexo A) e 0492 (George Mason University; Anexo C).

Para os experimentos *in vivo*, sob a orientação do Prof. Dr. Victor Rodrigues, foram utilizados 60 ratos *Wistar* machos P11. Esses experimentos foram realizados no Departamento de Farmacologia e Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) sob a aprovação do protocolo CEUA 226/2022 (Anexo B).

#### 5.1.2 Peixe Zebra (Zebrafish)

Os experimentos *in vivo*, utilizando Zebrafish, foram executados no Laboratório de Zebrafish, localizado na Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. Os experimentos foram realizados sob a orientação da Profa. Dra. Claudia Vianna e da técnica Viviane Cristina.

Os peixes foram mantidos em sala climatizada a 23°C, com controle de fotoperíodo, sendo 14 horas de ciclo claro e 10 horas de ciclo escuro. Os animais foram mantidos em aquários de vidro com densidade de 2-4 peixes/litro em água com

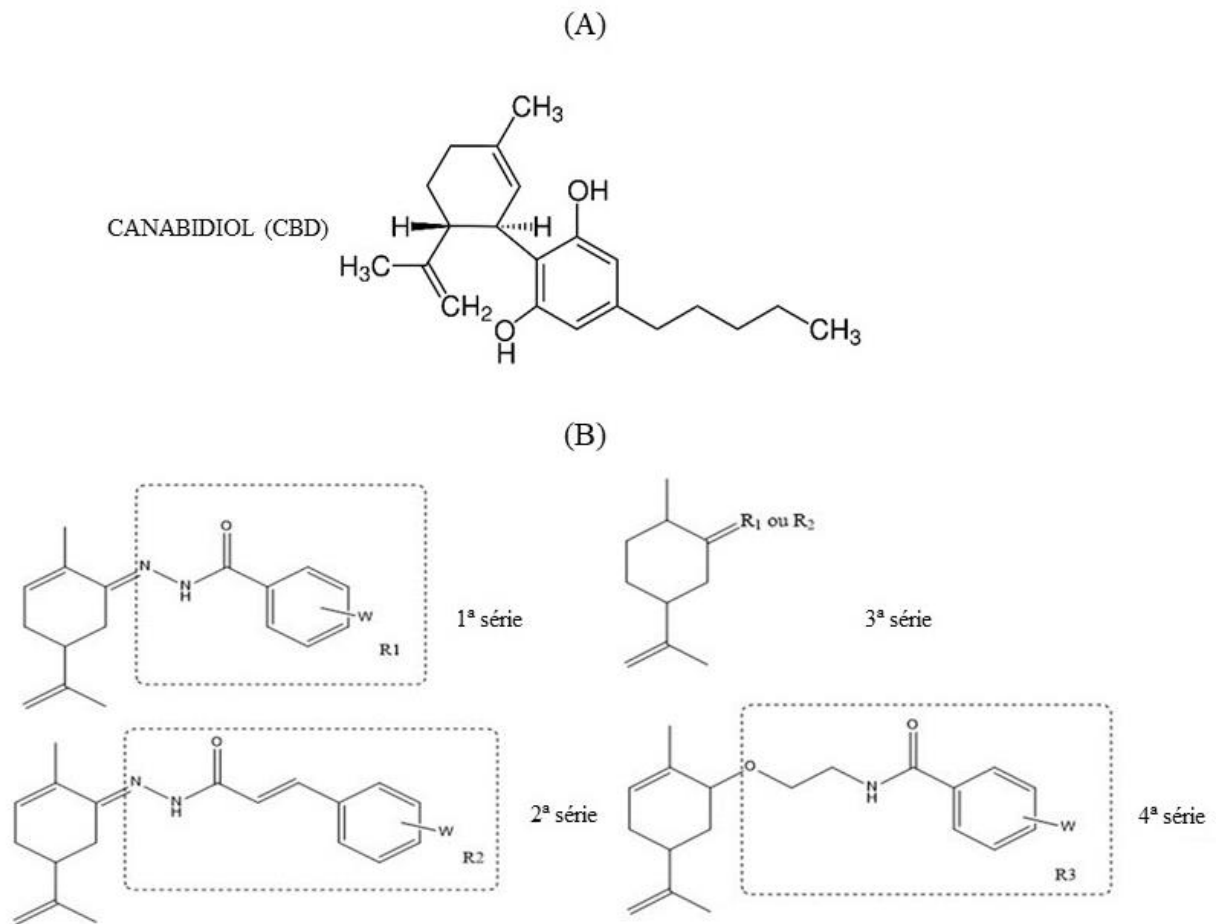
pH entre 7,0 e 8,0 e temperatura de 25 a 28°C (Westerfield, 2000). Adiministrou-se a alimentação flocada TetraMin® três vezes ao dia por meio da dispensação automática, além da suplementação com artêmia uma vez ao dia e paramécio *ad libitum*. Com base no comitê de ética aprovado n°6375-1/2023 (Anexo D), foram utilizadas 467 larvas com 7 dpf. As larvas foram coletadas por acasalamento natural e mantidas em placas de petri em estufa a 26°C com ciclagem de luz 14h claro/10h escuro. A alimentação das larvas foi realizada com paramécio a partir do 5º dia após a fertilização.

Após os experimentos, os animais foram eutanasiados por Crioanestesia com posterior decapitação.

## 5.2 ANÁLOGOS DO CANABIDIOL

Foram utilizados 57 compostos, de 4 séries diferentes, sintetizados no Laboratório de Pesquisa em Química Medicinal da UNIFAL-MG (PeQuiM) pelo Prof. Claudio Viegas Junior e pela Dra. Graziella Reis Franco. Devido à proteção de propriedade intelectual, a reprodução das moléculas não está autorizada, portanto estão disponíveis apenas as estruturas básicas e seus possíveis substituintes (Figura 3). Para os controles experimentais, utilizamos como padrão o CBD fornecido pelos professores Dr. Victor Rodrigues Santos e Dr. Fabricio de Araújo Moreira do laboratório de farmacologia da UFMG.

Figura 3 - Estruturas químicas.



Fonte: CBD, modificado de Perucca et al, 2017 e análogos de canabidiol, Graziella Reis Franco.

Legenda: CBD (A) e estrutura básica de cada uma das séries dos compostos derivados do CBD que foram sintetizados no PeQuim da UNIFAL-MG (B).

### 5.3 CULTURA PRIMÁRIA DE ASTRÓCITOS

A cultura primária de astrócitos foi realizada a partir dos hipocampos coletados de ratos neonatos (2 a 4 dias). As amostras de tecidos foram dissociadas com tripsina 0,05% e as células cultivadas em solução de DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Invitrogen) contendo soro fetal bovino (10%) e 1% de solução de penicilina (10,000 IU/ml) - estreptomicina (10,000 µg/ml) (PS; Mediatech) por um período de 7 a 9 dias. Em seguida, as células foram submetidas à agitação (200 rpm) por um período de 2h a 37°C, para separar os oligodendrócitos e neurônios dos astrócitos. As células em suspensão foram removidas pela troca do meio e lavagem, e as células aderidas

ao frasco (astrócitos) foram novamente tripsinizadas e cultivadas de acordo com o experimento a ser realizado.

#### 5.4 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS COMPOSTOS DERIVADOS DO CANABIDIOL

Os análogos do CBD das 4 séries disponibilizadas foram avaliados quanto à citotoxicidade. Para isso, os astrócitos cultivados foram semeados em microplaca de 96 poços a uma densidade de  $0,5 \times 10^5$  células/poço e incubadas por mais 24h. Após este período, o análogo e o meio de cultura foram adicionados ao primeiro poço da microplaca e posteriormente realizado diluições seriadas. As concentrações utilizadas foram de 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,12  $\mu\text{M}$ . Foi realizado controle de crescimento celular, contendo apenas as células e o meio de cultura; controle negativo, contendo apenas o meio de cultura; controle de solvente, contendo dimetilsulfóxido (DMSO) 1%; e controle de morte celular, contendo DMSO 50%. Incubou-se a microplaca por 48 horas a 37 °C e 5% de  $\text{CO}_2$ . Passado este período, as soluções presentes nos poços foram removidas, os poços foram lavados 2x com tampão fosfato-salino 0,01 M (PBS) e posteriormente foi adicionado 150  $\mu\text{L}$ /poço de solução de 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) (0,5 mg/mL), e as microplacas foram novamente incubadas nas condições supracitadas por 4h. Após este tempo, o sobrenadante foi cuidadosamente removido e adicionou-se 100  $\mu\text{L}$ /poço de DMSO para solubilização dos cristais de formazan. As microplacas foram enroladas em papel laminado e colocadas no agitador durante 10 minutos. A leitura foi realizada em leitor de microplacas (Anthos Zenith 200rt) por meio da absorbância medida a 540 nm. O ensaio foi realizado em quintuplicata. A porcentagem de citotoxicidade foi calculada como  $[(A-B) / A \times 100]$ , onde A e B são as absorbâncias das células controle e tratadas, respectivamente. Os dados foram analisados usando regressão linear para obter valores de concentração citotóxica para 50% das células ( $\text{CC}_{50}$ ) e concentração citotóxica para 90% das células ( $\text{CC}_{90}$ ).

## 5.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETIVO DOS COMPOSTOS DERIVADOS DO CANABIDIOL FRENTE AO ESTÍMULO COM GLUTAMATO

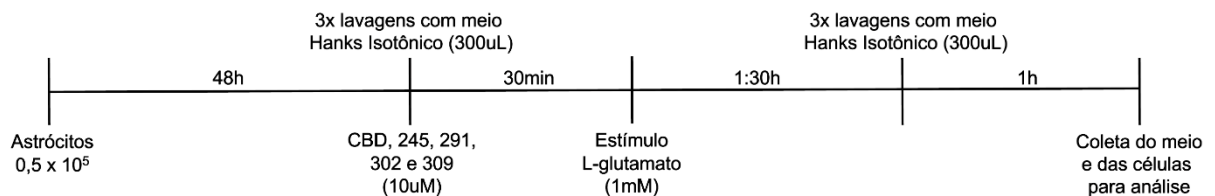
Os astrócitos cultivados foram semeados em microplaca de 96 poços a uma densidade de  $0,5 \times 10^5$  células/poço e incubadas por mais 24 horas. Após este período, os compostos selecionados (245, 291, 302 e 309) na concentração de  $10 \mu\text{M}$  foram adicionados em quintuplicata aos poços da microplaca. Após 30min de incubação a  $37^\circ\text{C}$  foi realizado o estímulo com glutamato  $1 \text{ mM}$ . O estímulo se procedeu por 1:30h. Foi realizado controle de crescimento celular, contendo apenas as células e o meio de cultura e controle negativo, contendo apenas o meio de cultura. Passado o período de estímulo, as soluções presentes nos poços foram removidas, os poços foram lavados 2x com PBS  $0,01 \text{ M}$ , e posteriormente foi adicionado  $150 \mu\text{L}$  de solução de MTT ( $0,5 \text{ mg/mL}$ ) em todos os poços. As microplacas foram novamente incubadas nas condições supracitadas por 4h. Após este tempo, o sobrenadante foi cuidadosamente removido e adicionou-se  $100 \mu\text{L/poço}$  de DMSO para solubilização dos cristais de formazan. As microplacas foram enroladas em papel laminado e colocadas no agitador durante 10 minutos. A leitura foi realizada em leitor de microplacas (Anthos Zenith 200rt) por meio da absorbância medida a  $540 \text{ nm}$ . A porcentagem de citotoxicidade foi calculada como  $[(A-B) / A \times 100]$ , onde A e B são as absorbâncias das células controle e tratadas, respectivamente.

## 5.6 ANÁLISE DE GLUTAMATO POR HPLC

A análise foi adaptada de Skytt e colaboradores (2012), onde os astrócitos cultivados foram semeados em placas de 24 poços em uma densidade de  $0,5 \times 10^5$  células/poço. As culturas foram incubadas em estufa com 5% de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$  durante 48 h, sem troca de meio. Após este período, foi feita 3 vezes a lavagem dos poços com meio Hanks isotônico isento de glutamato. Em seguida adicionado  $300 \mu\text{L}$  de meio Hanks contendo  $10 \mu\text{M}$  das substâncias análogos do CBD, selecionadas com base no teste de citotoxicidade (245, 291, 302 e 309), a placa foi incubada por 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . Após o período de incubação, nos grupos com estímulo, adicionou-se o glutamato  $1 \text{ mM}$  e incubou por mais 1:30h. Após as 1:30h as células foram lavadas 3 vezes em Hanks e em seguida adicionado  $300 \mu\text{L}$  de meio, incubando

novamente por 1h. Após 1 hora o meio foi coletado e armazenado para posterior secagem em secadora a vácuo e análise no HPLC. Os poços contendo as células foram lavados suavemente 3x com meio Hanks para assegurar a remoção completa do meio de incubação. Posteriormente, as células foram extraídas utilizando etanol gelado 70% (v/v) e o conteúdo centrifugado a 10000rpm por 20min para lise celular. O etanol foi seco por meio de secadora a vácuo e o concentrado celular foi armazenado para as análises por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Todo o processo está ilustrado no esquema da Figura 4.

Figura 4 - Esquema para quantificação de glutamato por HPLC



Fonte: Autor (2024)

### 5.6.1 Condições cromatográficas

Foi necessário derivatizar as amostras utilizando uma proporção de 3:4 de o-ftaldialdeído 2min antes da injeção no equipamento. As amostras foram ressuspensas em 200  $\mu$ L de água miliQ e o volume injeção foi 30  $\mu$ L. Utilizou-se uma coluna C18 Agilent Eclipse (4.6  $\times$  150 mm, tamanho das partículas 5  $\mu$ m) e detector de fluorescência (excitação 265 nm e emissão 480 nm). Como fase móvel foi utilizado uma fase A composta por tampão fosfato de sódio (0,2M) e uma fase B composta por uma solução aquosa de 65% de metanol. O fluxo utilizado foi de 0,8 mL/min com uma eluição gradiente. O gradiente iniciou-se com 25% da fase B, aumentou para 60% aos 20min e atingiu 100% aos 30min, promovendo assim, a eluição e separação do glutamato.

### 5.7 IMUNOFLORESCÊNCIA E ANÁLISE QUANTITATIVA DA EXPRESSÃO DE GFAP

Os astrócitos cultivados foram semeados em placas de 24 poços em uma densidade de  $1,0 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>. As culturas foram incubadas em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C durante 48h, sem troca de meio. O CBD e os análogos 302 e 309 [10 µM] foram adicionados 30 minutos antes da adição do glutamato [1 mM]. Após 1:30h da adição do glutamato, as células foram lavadas com PBS 0,01 M por 3 vezes e fixadas em metanol por 3 minutos.

Para iniciar a imunofluorescência, os poços foram incubados com albumina de soro bovino (BSA) 10% em PBS (0,01 M, Triton 0,1%, NaN<sub>3</sub> 0,04%) por 1h. Após esse período, as células foram incubadas (*overnight*) com o anticorpo primário anti-GFAP (rabbit, 1:1000). Posteriormente ao período de incubação com o anticorpo primário, as células foram lavadas (3X) em PBS (0,01M), em sequência realizado a incubação com o anticorpo secundário Cy3 donkey anti-rabbit (1:250, Jackson Immunoresearch) por um período de 2h. Após incubação com o anticorpo secundário, as células foram lavadas 3x com PBS 0,01 M e contracoradas com o marcador nuclear DAPI (stock 15 mM, 1:12500) por 2min. Em seguida, as lamínulas contendo as células foram novamente lavadas e fixadas com meio de montagem sobre uma lâmina gelatinizada para visualização em microscópio NIKON – Eclipse 80i e captura das imagens no programa NIS-Elements BR.

As imagens foram capturadas de 15 campos aleatórios diferentes para cada tratamento, aproximadamente, e foram adquiridas com o mesmo nível de exposição em todos os grupos. A quantificação do sinal fluorescente foi realizada por densitometria óptica utilizando o software Image J.

## 5.8 CO-CULTURA DE ASTRÓCITOS E NEURÔNIOS HIPOCAMPAIS EM PLACA DE MICROELETRODOS

Utilizamos MEAs (Reutlingen, Alemanha), com 60 canais, organizados em uma matriz 8 por 8. Cada eletrodo possui 20 µm de diâmetro e é feito de nitreto de titânio. Os trilhos da matriz são feitos de titânio e a distância entre os eletrodos é de 200 µm. A confecção detalhada e a preparação do conjunto de microeletrodos se encontra no trabalho de Hamilton e colaboradores (2013).

A cultura primária foi realizada a partir dos hipocampus frescos coletados dos ratos neonatos (1-2 dias). As amostras dos tecidos foram mantidas em solução salina balanceada de Hank (HBSS) até o momento da dissociação com tripsina 0,05% +

DNase. Após 15min na incubadora (37°C) foi realizada a trituração mecânica do tecido com o auxílio de pipeta de vidro afunilada e ponteira de 1000 uL. A suspensão celular foi centrifugada a 1000 rpm durante 5min, o sobrenadante foi descartado e o pellet celular foi ressuspensão em meio DMEM + Glutamax suplementado com soro fetal bovino (5%), soro de cavalo (5%), B-27 (2%), penicilina/estreptomicina (1%) e ácido ascórbico 4 mg/mL (0,2%). As células foram contadas em hemocítmetro, e cultivadas em MEAs (aproximadamente  $1,5 \times 10^5$  células/MEA), previamente preparadas com poli-D-lisina e laminina. As placas com as células foram incubadas (37°C; 5% CO<sub>2</sub>) durante 4h, e em seguida foi adicionado 1 mL do meio de cultura supracitado por placa. Após 4 dias, 50% do meio de cultura foi substituído por meio DMEM + Glutamax suplementado com B-27 (2%), penicilina/estreptomicina (1%) e ácido ascórbico 4 mg/mL (0,2%). A troca de 50% do meio foi realizada a cada 4 dias durante 30 dias (Charkhkar *et al.*, 2015, com modificações).

## 5.9 REGISTRO E ANÁLISE DA ATIVIDADE ELÉTRICA DOS NEURÔNIOS

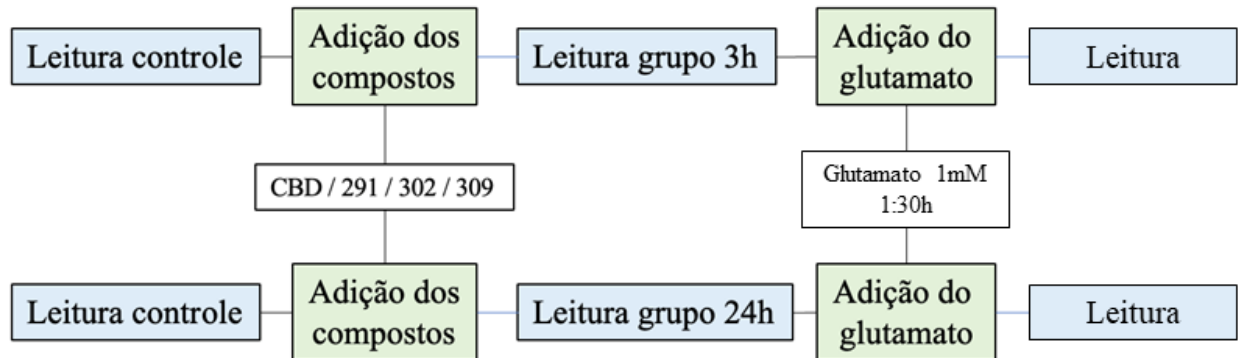
Todos os registros foram realizados após no mínimo 30 dias de cultura *in vitro*, para garantir a maturidade e a consistência de atividade da rede neuronal (CHARKHKAR *et al.*, 2015). Os registros foram adquiridos com um sistema de aquisição de dados OmniPlex (Plexon Inc, Dallas, TX). Cada um dos 60 canais da MEA foi digitalizado em uma frequência de amostragem de 40 KHz, e o tempo de registro para a linha de base, bem como todas as seguintes fases dos experimentos, foi limitado em 15 minutos para cada fase. A temperatura da cultura foi mantida em 37°C durante todo o registro.

Durante as gravações extracelulares das redes neuronais, o nível médio de ruído foi calculado para cada canal individual e foi estabelecido um limite de 5 desvios padrão desta média. A detecção de um pico foi considerada se o sinal ultrapassasse este limite. Os canais foram considerados ativos se a taxa do pico fosse de pelo menos 0,1 Hz. Os picos registrados de cada canal foram classificados *off-line* usando um algoritmo desenvolvido e padronizado a partir do software Matlab, pelo discente Leonardo Trisciuzzi.

A atividade da rede foi registrada por 15min antes e após a administração dos derivados e/ou do estímulo com o glutamato conforme ilustrado no delineamento

experimental (Figura 5). Os dados de *spiking* foram analisados no algoritmo desenvolvido e os resultados expressos em número de porcentagem média de *skipes*/15min.

Figura 5 - Delineamento experimental do registro da atividade elétrica neuronal



Fonte: Autor (2024)

## 5.10 MODELO *IN VIVO* DE EPILEPSIA INDUZIDO POR PTZ EM RATOS *Wistar*

Os animais P11 foram aleatoriamente divididos (n=10 animais/grupo) aos 6 grupos de estudo: controle, PTZ, 245, 291, 302 e 309. Os análogos do CBD foram administrados via intraperitoneal, dose única de 30 mg/kg, em seus respectivos grupos, 1h antes da administração do PTZ. O PTZ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) foi dissolvido em solução salina a 0,9% na concentração de 10 mg/mL e administrado por injeção subcutânea usando a dose de 100 mg/kg. Após a administração do PTZ, com o auxílio de um tripé e uma câmera, a latência e duração das crises foram observadas e registradas por 15 min.

A verificação dos parâmetros avaliados foi feita por meio de análise duplo cego, realizada por colaboradores que desconheciam a divisão dos grupos.

## 5.11 MODELO *IN VIVO* DE EPILEPSIA INDUZIDO POR PTZ EM ZEBRAFISH

### 5.11.1 Teste comportamental

Com o auxílio de uma micropipeta de 100  $\mu$ L, aos 7 dias de vida, as larvas foram transferidas aleatoriamente para placas de 96 poços ( $n=12$  animais/grupo), onde foram organizadas nos grupos de 01 a 15. Os animais do grupo 01 são controle e, portanto, foram manipulados de igual forma aos demais grupos, mas não foram expostos a nenhuma substância. O grupo 02 foi composto pelos animais expostos ao PTZ 15 mM por 20 minutos. No grupo 03 os animais foram expostos ao CBD 100  $\mu$ M. Nos grupos 04, 05 e 06, os animais foram expostos ao análogo 245 nas concentrações 10, 35 e 100  $\mu$ M respectivamente. Nos grupos 07, 08 e 09, os animais foram expostos ao análogo 291 nas concentrações 10, 35 e 100  $\mu$ M respectivamente. Nos grupos 10, 11 e 12, os animais foram expostos ao análogo 302 nas concentrações 10, 35 e 100  $\mu$ M respectivamente. E por fim, nos grupos 13, 14 e 15, os animais foram expostos ao análogo 309 nas concentrações 10, 35 e 100  $\mu$ M respectivamente. Também foram feitas análises com o DMSO 1%, solvente utilizado para solubilizar os análogos. As larvas passaram por um período de ambientação de 30min na placa para evitar interferência no teste. Assim como na análise com os ratos, os tratamentos com o CBD e os análogos foram feitos 1h antes da exposição ao PTZ.

Imediatamente após exposição dos animais ao PTZ, as placas foram levadas para o sistema de gravação de vídeo DanioVision (Noldus, Wageningen, Holanda). Os registros gerados foram analisados por meio do software de rastreamento de locomoção EthoVision XT (Noldus, Wageningen, Holanda), e os parâmetros: velocidade, distância percorrida, rotação, tempo de imobilidade foram analisados e plotados em gráficos.

### 5.11.2 PCR quantitativo em tempo real

O CBD e os seus análogos 302 e 309, na concentração de 100 $\mu$ M, foram selecionados para a análise de PCR quantitativo em tempo real (qPCR), realizada com intuito de verificar os níveis de transcrição dos genes c-Fos, marcador de atividade neuronal, e IL-1b, interleucina pró-inflamatória. Os grupos experimentais foram compostos por um tamanho amostral de 5 amostras, onde cada conjunto

amostral foi composto por 10 cabeças larvais. A exposição ao CBD e aos análogos ocorreu por 1h antes da exposição ao PTZ. Após 20min de exposição ao PTZ os animais foram anestesiados por hipotermia (crioanestesia) e decapitados para a coleta das cabeças. O material coletado foi rapidamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado a  $-80$  para posterior extração.

O RNA total foi extraído utilizando TRIzol<sup>®</sup> (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante, e a qualidade e concentração foram determinadas com auxílio do espectrofotômetro Epoch<sup>TM</sup> (BioTek, Winooski, VT, EUA). A quantidade 1 $\mu$ g de RNA total foi transcrito reversamente em cDNA por meio do sistema de síntese de primeira cadeia de alta capacidade para qPCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Como controle negativo, foram utilizadas reações sem RNA.

A quantificação relativa do mRNA foi realizada usando o sistema ABI 7500 Real Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), TaqMan<sup>®</sup> Universal Master Mix e TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assay (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). As quantificações em triplicata foram normalizadas utilizando o fator de alongamento de tradução eucariótica 1 alfa 1 (EEF1A1). Para avaliar a eficiência da análise, foram realizadas curvas padrão.

## 5.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

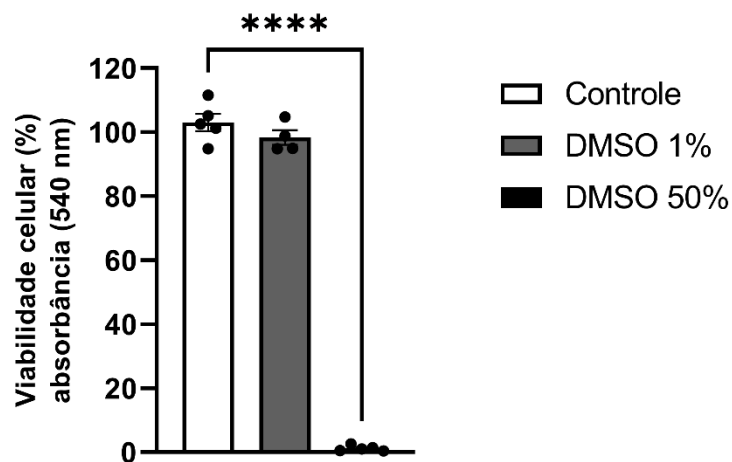
Os valores obtidos com as análises foram plotados e analisados utilizando-se o software Graph-Pad Prism 9 (Graph-Pad, versão 9, San Diego, CA). Os grupos experimentais foram comparados utilizando o One-way ANOVA pós-teste de Tukey. Os valores foram considerados significativamente diferentes entre grupos se  $p < 0,05$  e foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM).

## 6 RESULTADOS

### 6.1 CITOTOXICIDADE DOS COMPOSTOS DERIVADOS DO CANABIDIOL

Conforme descrito no item 5.4, inicialmente foi verificado se o DMSO, solvente utilizado para solubilizar os análogos, alterava a viabilidade celular dos astrócitos. A concentração de 1% de DMSO utilizada, não mostrou interferência na viabilidade celular (Figura 6). Como controle de morte celular, a concentração de 50% de DMSO foi utilizada, provocando perda de 100% da viabilidade celular dos astrócitos.

Figura 6 – Viabilidade celular de astrócitos expostos ao DMSO



Fonte: Autor (2024).

Legenda: Os grupos foram comparados utilizando ANOVA one-way para dados com distribuição normal. n=5/grupo. \*\*\*\* p<0,0001.

Visto que a concentração de 1% de DMSO não interferiu na viabilidade celular, prosseguimos com a realização do teste utilizando os análogos do CBD. A Tabela 2 demonstra os resultados obtidos por meio do cálculo de  $CC_{50}$  e  $CC_{90}$  das 4 séries de análogos disponibilizada pelo Laboratório de Pesquisa em Química Medicinal da UNIFAL-MG.

Tabela 2 - Resultados de CC<sub>50</sub> e CC<sub>90</sub> das 4 séries de compostos derivados do canabidiol

| 1 série  |                  | (μM)             |  |
|----------|------------------|------------------|--|
| Composto | CC <sub>50</sub> | CC <sub>90</sub> |  |
| 242      | 42,82            | 100,50           |  |
| 243      | 24,42            | 97,21            |  |
| 244      | 37,08            | 93,36            |  |
| 245      | 46,94            | 86,44            |  |
| 246      | 34,45            | 108,5            |  |
| 247      | 41,34            | 80,63            |  |
| 248      | 19,07            | 109,30           |  |
| 249      | 58,15            | 64,44            |  |

| 2 série  |                  | (μM)             |  |
|----------|------------------|------------------|--|
| Composto | CC <sub>50</sub> | CC <sub>90</sub> |  |
| 273      | 46,17            | 101,90           |  |
| 274      | --               | --               |  |
| 275      | 3,33             | 407,00           |  |
| 276      | 4,37             | 682,90           |  |
| 290      | 55,06            | 64,39            |  |
| 291      | 55,38            | 76,43            |  |
| 292      | 3,56             | 4,43             |  |
| 293      | 7,79             | --               |  |
| 294      | 1,76             | 231,20           |  |
| 295      | 3,37             | --               |  |
| 300      | 10,37            | 152,40           |  |
| 301      | 2,29             | 63,04            |  |
| 302      | 41,53            | 77,99            |  |
| 303      | 56,59            | 79,37            |  |
| 304      | 6,75             | 250,30           |  |
| 305      | 8,71             | 38,62            |  |
| 306      | 27,71            | 129,90           |  |
| 307      | 11,98            | 95,15            |  |
| 308      | 28,13            | 101,80           |  |
| 309      | 34,64            | 374,80           |  |

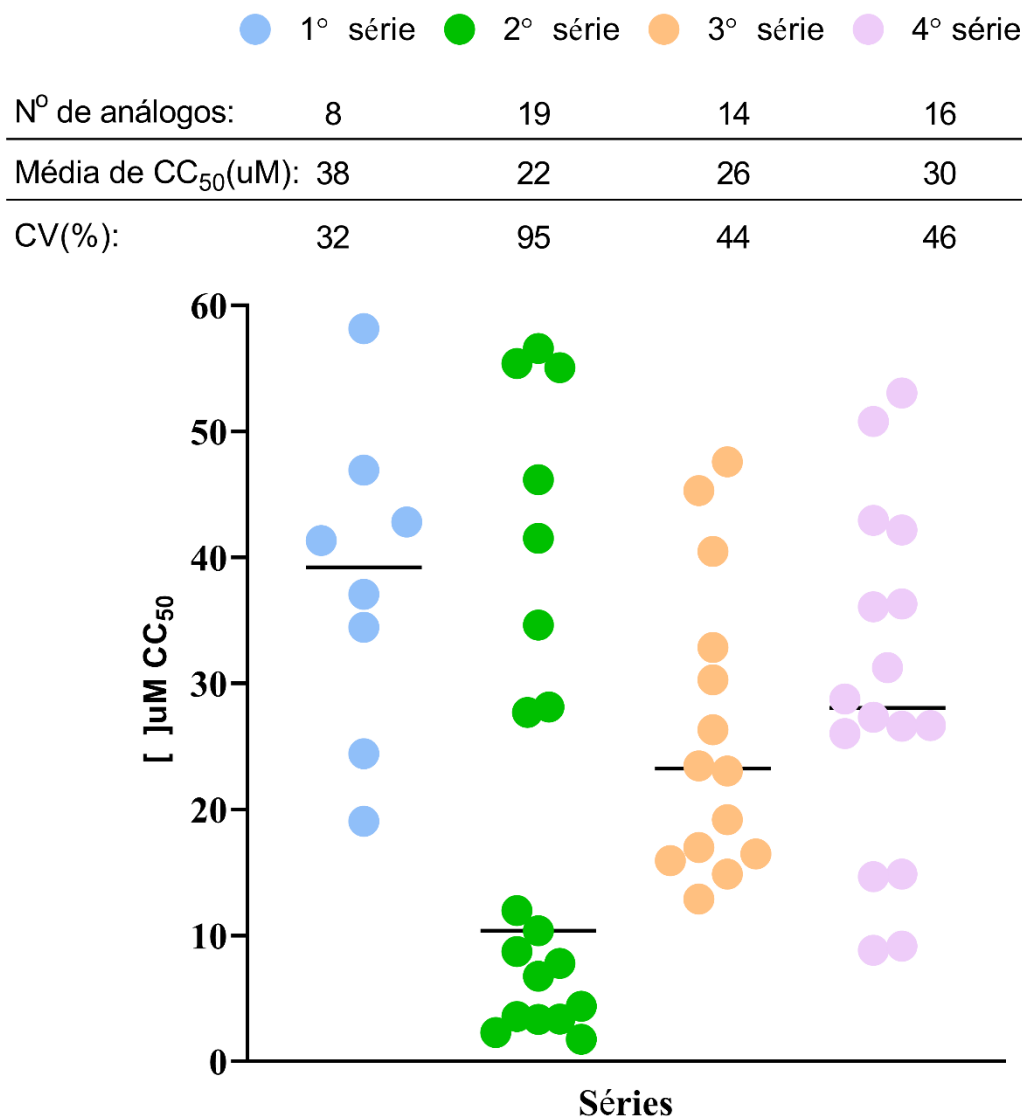
| 3 série  |                  | (μM)             |  |
|----------|------------------|------------------|--|
| Composto | CC <sub>50</sub> | CC <sub>90</sub> |  |
| 337      | 32,85            | 90,04            |  |
| 338      | 19,19            | 114,50           |  |
| 339      | 40,47            | 79,27            |  |
| 340      | 23,03            | 146,30           |  |
| 341      | 16,97            | --               |  |
| 342      | 14,87            | 115,00           |  |
| 343      | 47,60            | 78,86            |  |
| 344      | 45,30            | 96,94            |  |
| 345      | 30,28            | 75,26            |  |
| 346      | 23,45            | 110,70           |  |
| 347      | 26,33            | 166,10           |  |
| 348      | 15,93            | 338,10           |  |
| 349      | 12,90            | 264,90           |  |
| 350      | 16,48            | 118,00           |  |

| 4 série  |                  | (μM)             |  |
|----------|------------------|------------------|--|
| Composto | CC <sub>50</sub> | CC <sub>90</sub> |  |
| 375      | 36,09            | 140,70           |  |
| 376      | 14,87            | 124,30           |  |
| 377      | 53,05            | 70,48            |  |
| 378      | 8,82             | --               |  |
| 379      | 26,67            | 80,87            |  |
| 380      | 31,26            | 87,95            |  |
| 381      | 26,03            | 57,47            |  |
| 382      | 36,31            | 92,41            |  |
| 383      | 42,17            | 99,41            |  |
| 384      | 26,62            | 432,20           |  |
| 385      | 42,93            | 131,60           |  |
| 386      | 9,15             | 587,90           |  |
| 387      | 28,77            | 136,40           |  |
| 388      | 27,33            | 53,94            |  |
| 389      | 50,79            | 54,07            |  |
| 390      | 14,66            | 981,70           |  |

Fonte: Autor (2024)

Comparando o  $CC_{50}$  das 4 séries (Figura 7), nota-se que os resultados apresentaram comportamento variados dentro de uma mesma série. Entretanto, mesmo as séries sendo de tamanhos diferentes, a 1° série apresentou média de seus resultados de  $CC_{50}$  em torno de  $38\mu\text{M}$ , enquanto as demais apresentaram média de resultados inferior, 2° série com média de  $22\mu\text{M}$ , 3° série com média de  $26\mu\text{M}$  e a 4° série com média  $30\mu\text{M}$ . Outro fato, foi que a 2° série apresentou maior diferença de valores entre seus análogos, com coeficiente de variação de 95,24%, oscilando de baixas a altas concentrações de  $CC_{50}$ .

Figura 7 - Comparação do  $CC_{50}$  entre as 4 séries de compostos.



Fonte: Autor (2024)

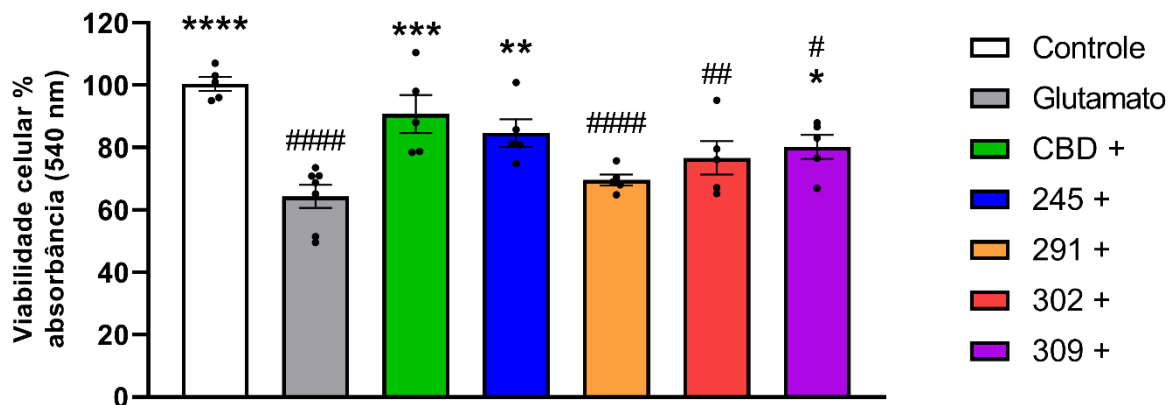
Com base nos resultados apresentados na Tabela 2 e Figura 7, foram selecionados 4 compostos (245, 291, 302 e 309) para prosseguir com os experimentos, levando em consideração a disponibilidade dos compostos, seus resultados de  $CC_{50}$  e a margem de segurança entre o  $CC_{50}$  e  $CC_{90}$ . Estes 4 compostos se encontram destacados na Tabela 2.

## 6.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETIVO DOS ANÁLOGOS DO CBD FRENTE AO ESTÍMULO COM GLUTAMATO

Buscando verificar se os análogos escolhidos (245, 291, 302 e 309) teriam a capacidade de proteger os astrócitos da perda de viabilidade causada pelo estímulo com glutamato 1 mM, foi empregado o pré-tratamento de 30min com a concentração de 10  $\mu$ M dos compostos antes do estímulo.

A Figura 8 demonstra os resultados obtidos. O CBD (90,75 $\pm$ 6,08%) e os análogos 245 (84,67 $\pm$ 4,39%) e 309 (80,21 $\pm$ 3,85%) apresentaram uma melhora na viabilidade comparado ao grupo glutamato (64,33  $\pm$ 3,70%), porém, para o grupo 309 (80,21 $\pm$ 3,85%), a melhora na viabilidade celular não foi suficiente para igualar a viabilidade do grupo controle (100,40 $\pm$ 2,23%). Os análogos 291 (69,60 $\pm$ 1,77%) e 302 (76,66 $\pm$ 5,34%) não influenciaram no efeito do glutamato.

Figura 8 - Efeito protetivo dos análogos do CBD frente ao estímulo com glutamato.



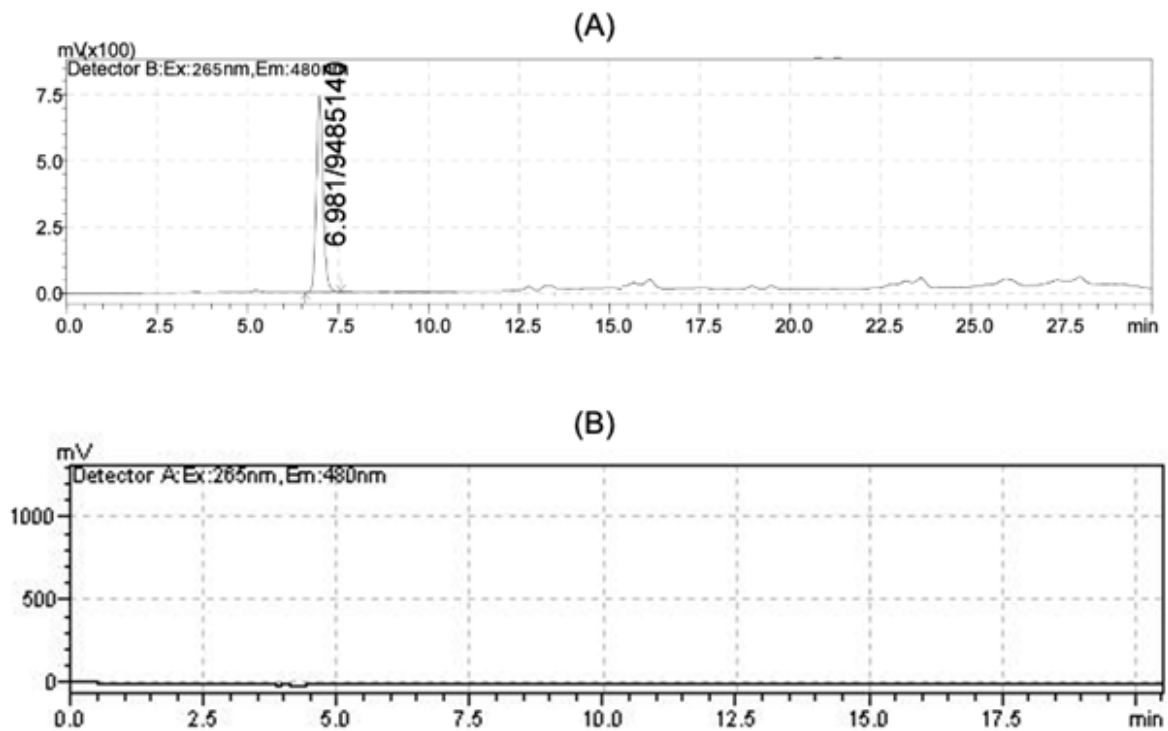
Fonte: Autor (2024).

Legenda: Controle: Água; Glutamato: glutamato (1mM); CBD +: CBD (10 $\mu$ M) + glutamato (1mM); 245 +: análogo 245 (10 $\mu$ M) + glutamato (1mM); 291 +: análogo 291 (10 $\mu$ M) + glutamato (1mM); 302 +: análogo 302 (10 $\mu$ M) + glutamato (1mM); 309 +: análogo 309 (10 $\mu$ M) + glutamato (1mM). Os grupos foram comparados utilizando ANOVA one-way para dados com distribuição normal. n=5/grupo. \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,01 \*\*\*\* p<0,0001 quando comparado com o grupo Glutamato; # p<0,05; ## p<0,01; #### p<0,0001 quando comparado com o grupo Controle.

### 6.3 ANÁLISE E QUANTIFICAÇÃO DE GLUTAMATO POR HPLC

Com base nas condições cromatográficas estabelecidas o cromatograma do padrão de 1 ug/mL de glutamato está representado na Figura 9A. Para descartar interferências presentes no meio e no método aplicado, foi realizado a leitura de um branco contendo apenas a solução derivatizante e meio Hanks isotônico (Figura 9B).

Figura 9 - Cromatogramas obtidos.

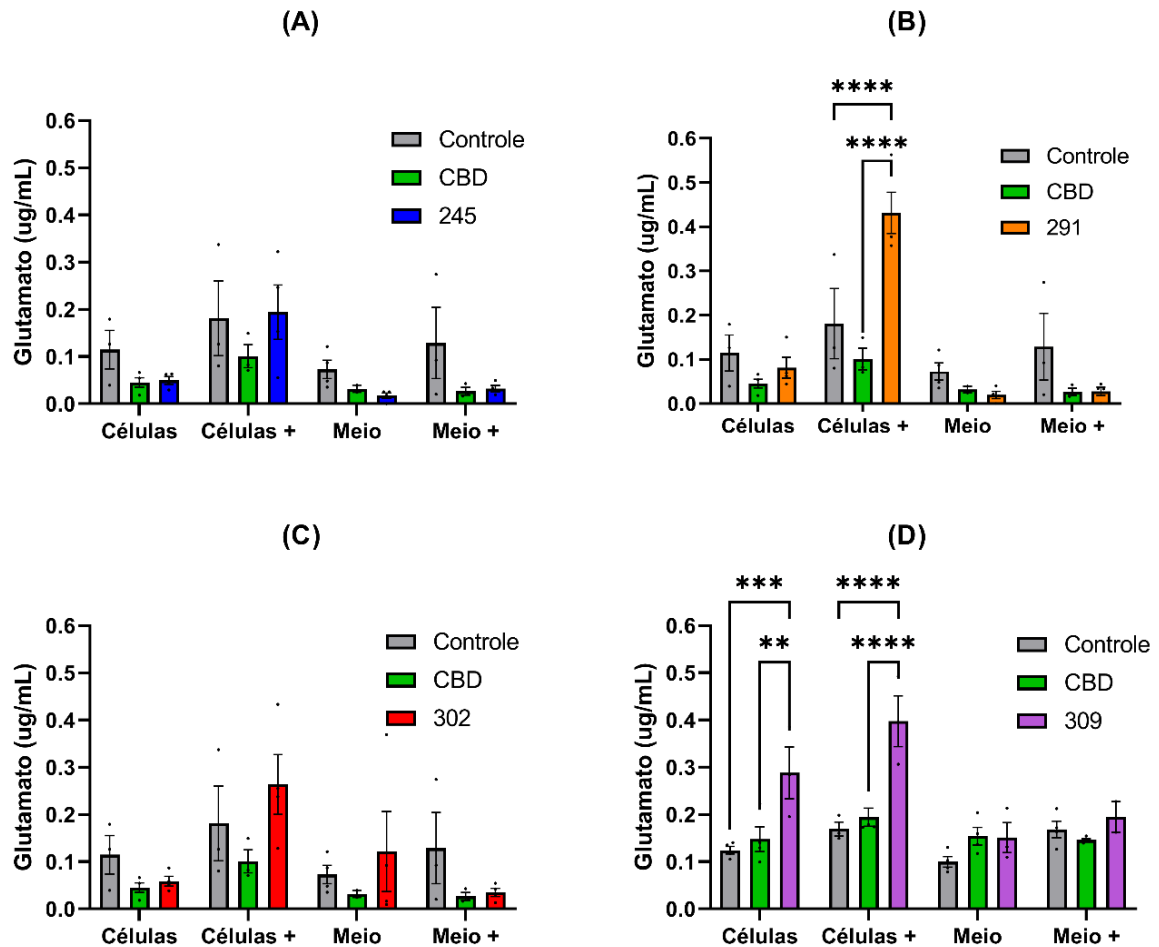


Fonte: Autor (2024)

Legenda: Padrão 1ug/mL de glutamato (A) e análise do meio hanks e o derivatizante utilizado (B).

A Figura 10 mostra os resultados obtidos nas dosagens de glutamato, intra e extracelular, no qual podemos observar que, quando estimulados com glutamato 1mM, os astrócitos tratados com os análogos 291 ( $0,43 \pm 0,05$  ug/mL) e 309 ( $0,40 \pm 0,05$  ug/mL) demonstraram uma maior concentração intracelular do mesmo em comparação com o grupo controle ( $0,17 \pm 0,01$  ug/mL). O grupo 309 ( $0,29 \pm 0,05$  ug/mL) foi capaz de influenciar as concentrações de glutamato intracelular mesmo sem a presença de estímulo. Para os demais grupos, como o CBD, não houve diferença em relação as concentrações fisiológicas do grupo controle.

Figura 10 - Dosagem de glutamato intra e extracelular.



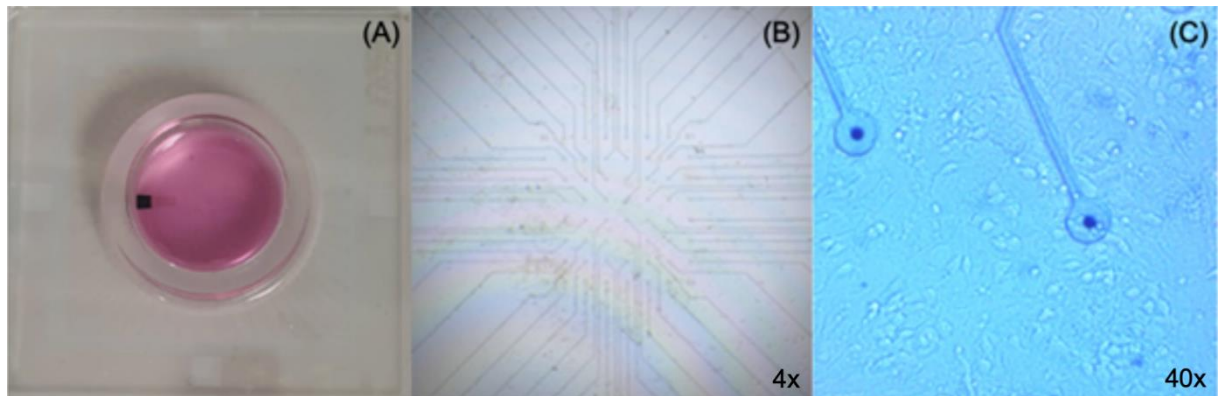
Fonte: Autor (2024)

Legenda: Análogo 245 (A), análogo 291 (B), análogo 302 (C) e análogo 309 (D). Células: sem estímulo; Células +: com estímulo com glutamato (1mM); Meio: sem estímulo e Meio +: com estímulo com glutamato (1mM). Os grupos foram comparados utilizando ANOVA one-way para dados com distribuição normal. \*\* $p > 0,01$ ; \*\*\* $p > 0,001$  e \*\*\*\* $p > 0,000$ .  $n = 4/\text{grupo}$

#### 6.4 CO-CULTURA DE ASTRÓCITOS E NEURÔNIOS HIPOCAMPAIS EM PLACA DE MICROELÉTRÓDOS

Após a seleção dos melhores dispositivos disponíveis no laboratório de bioengenharia da George Mason, realizamos a co-cultura. A Figura 11 exemplifica uma placa de microelétrodos utilizada, onde podemos ver a placa a olho nú (Figura 11 A), seguida do aumento de 4x (Figura 11 B) e com aumento de 40x (Figura 11 C), no qual podemos observar os neurônios e os astrócitos ao redor dos microelétrodos. O processo de maturação neuronal levou 30 dias.

Figura 11 - Placa de microelétrodos.



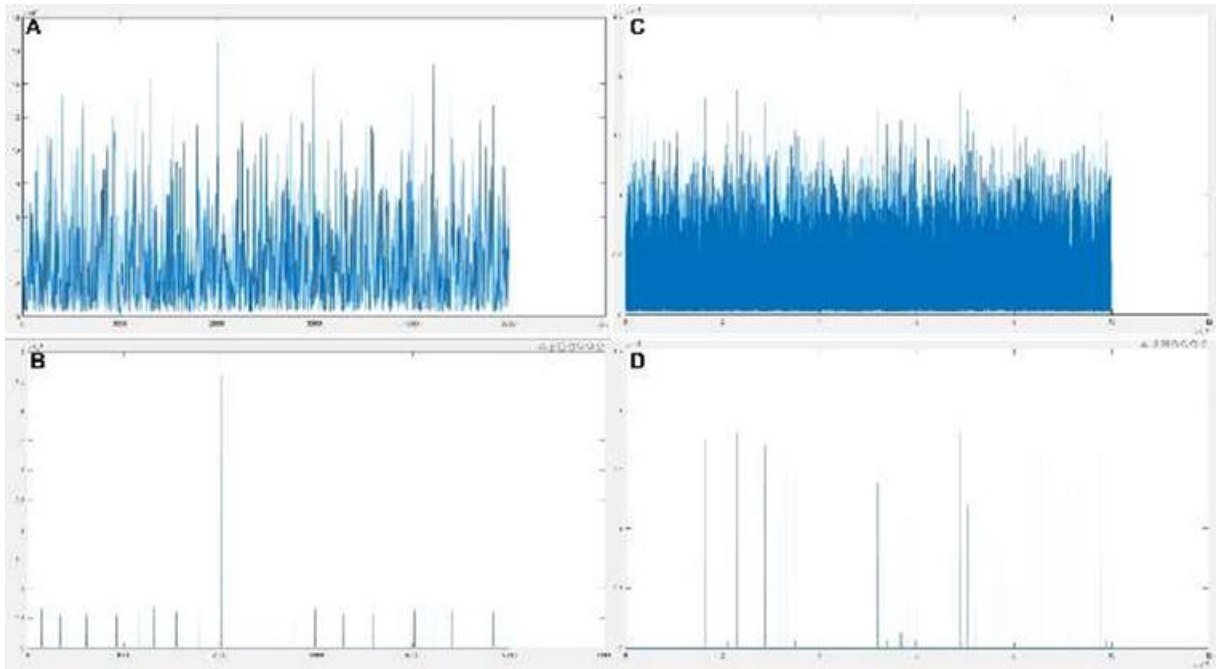
Fonte: Autor (2024)

Legenda: Placa a olho nu (A), aumento 4x (B) aumento 40x (C).

## 6.5 REGISTRO E ANÁLISE DA ATIVIDADE ELÉTRICA DOS NEURÔNIOS

Quando se obtém os resultados brutos do registro da atividade elétrica, uma etapa importante a ser realizada é a classificação dos *spikes*, pois devemos eliminar os ruídos detectados durante as análises, isolando assim, somente o sinal específico de cada neurônio. Esse procedimento é realizado com o auxílio de ferramentas de alto custo e que, na maioria das vezes, dependem de intervenções do usuário. Assim, pensando em uma maneira mais prática, rápida e acessível para a realização das análises, foi desenvolvido pelo nosso grupo, um algoritmo a partir do software MATLAB, que identifica os potenciais de ação de cada eletrodo. Com a validação desse algoritmo, demonstrado na Figura 12, pode-se notar a diferença no número de *spikes* após a filtragem realizada pelo algoritmo.

Figura 12 - Validação do algoritmo para classificação de potenciais de ação.



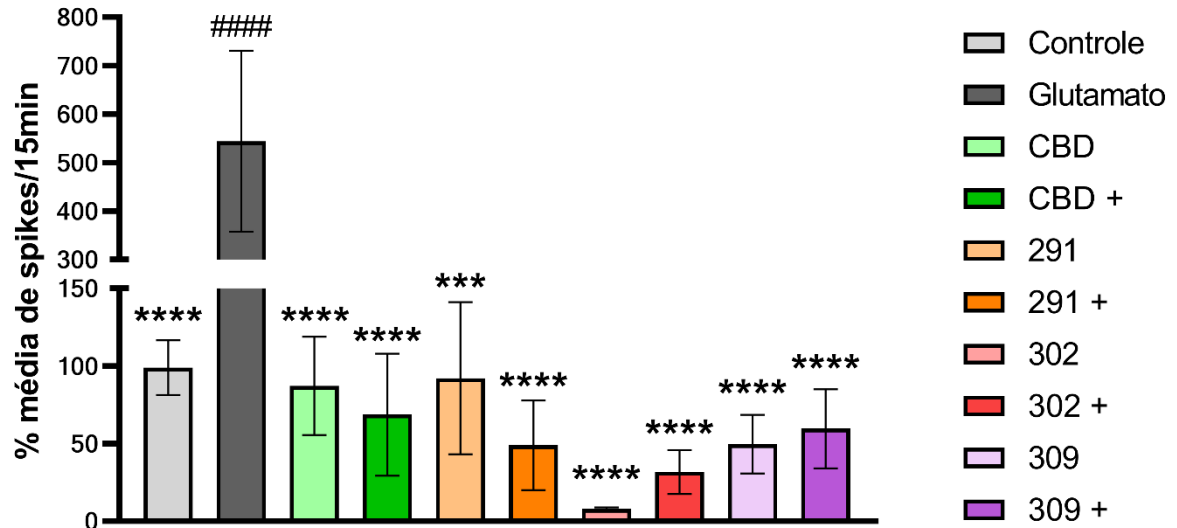
Fonte: Autor (2024).

Legenda: representação do sinal total registrado no grupo controle (A), representação dos *spikes* considerados no grupo controle após a aplicação do algoritmo (B), representação do sinal total registrado no grupo glutamato (C) representação dos *spikes* considerados no grupo glutamato após a aplicação do algoritmo (D).

A partir da análise dos resultados da atividade elétrica de cada grupo em estudo, com seus respectivos controles experimentais, plotamos os resultados em %média de *spikes* por 15 minutos, onde o grupo controle representa o 100%.

É possível observar que o estímulo do glutamato 1mM promoveu um aumento exacerbado da excitabilidade neuronal, cerca de 5x maior do que o grupo controle (Figura 13). Avaliamos 2 tempos de tratamento, 3 horas (Figura 13) e 24 horas (Figura 14). Com base nos resultados obtidos para o estudo de 3h, todos os grupos foram capazes de normalizar os níveis médios de *spikes*, mesmo com o estímulo oferecido pelo excesso de glutamato, mantendo os níveis fisiológicos de atividade elétrica. Agora, quando levamos em consideração o tratamento de 24h, somente o CBD e os análogos 302 e 309 normalizara a atividade elétrica.

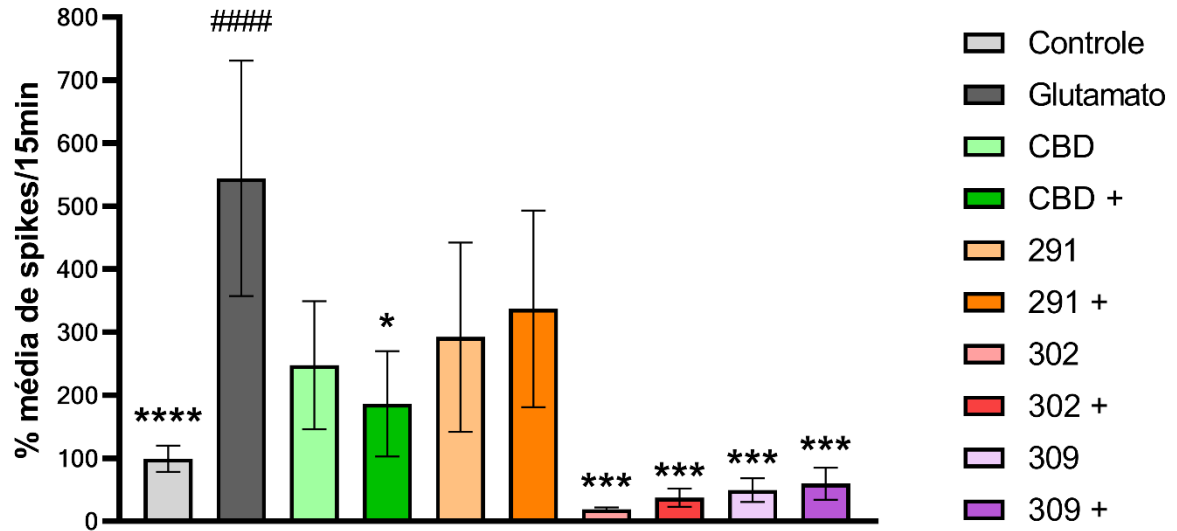
Figura 13 - Representação da porcentagem média do número de potenciais de ação (*spikes*) de neurônios hipocampais cultivados em MEAs. Tratamento de 3h



Fonte: Autor (2024).

Legenda: Controle: Água; Glutamato: glutamato (1mM); CBD: CBD (10 $\mu$ M); CBD +: CBD (10 $\mu$ M) + glutamato (1mM); 291: análogo 291 (10 $\mu$ M); 291 +: análogo 291 (10 $\mu$ M) + glutamato (1mM); 302: análogo 302 (10 $\mu$ M); 302 +: análogo 302 (10 $\mu$ M) + glutamato (1mM); 309: análogo 309 (10 $\mu$ M); 309 +: análogo 309 (10 $\mu$ M) + glutamato (1mM). Os grupos foram comparados utilizando ANOVA one-way para dados com distribuição normal. n=6 placas/grupo. \*\*\* p<0,001; \*\*\*\* p<0,0001 quando comparado com o grupo Glutamato; #### p<0,0001 quando comparado com o grupo Controle.

Figura 14 - Representação da porcentagem média do número de potenciais de ação (*spikes*) de neurônios hipocampais cultivados em MEAs. Tratamento de 24h.



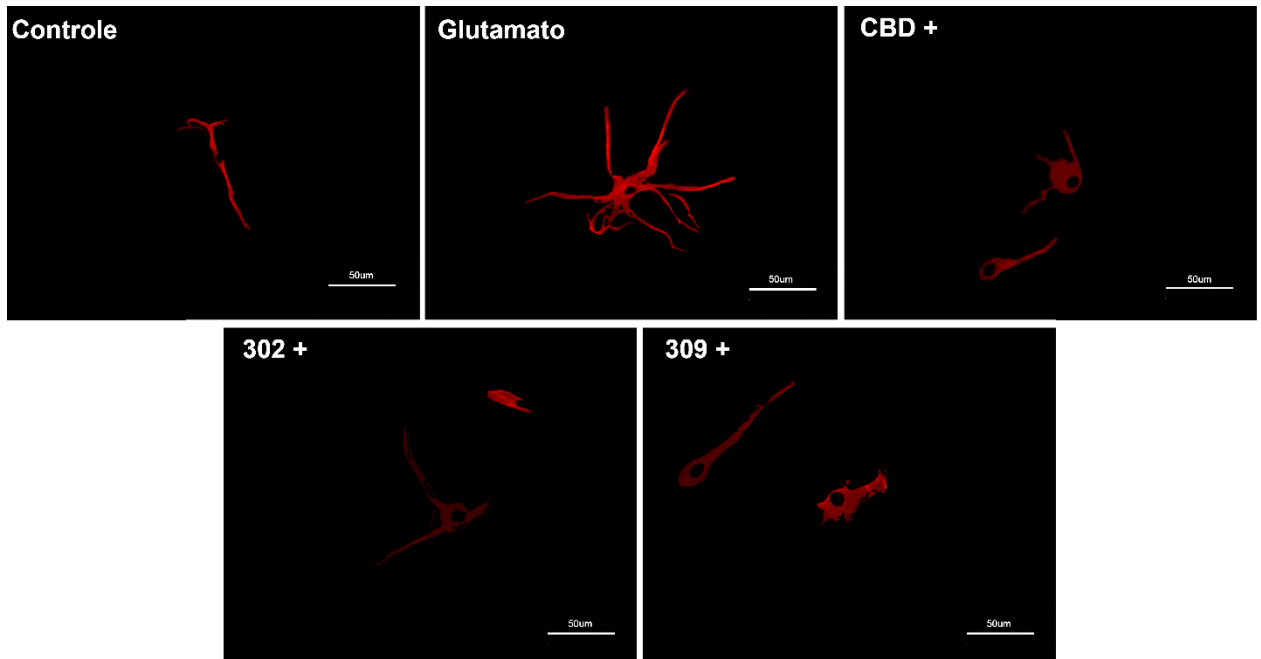
Fonte: Autor (2024).

Legenda: Controle: Água; Glutamato: glutamato (1mM); CBD: CBD (10 $\mu$ M); CBD +: CBD (10 $\mu$ M) + glutamato (1mM); 291: análogo 291 (10 $\mu$ M); 291 +: análogo 291 (10 $\mu$ M) + glutamato (1mM); 302: análogo 302 (10 $\mu$ M); 302 +: análogo 302 (10 $\mu$ M) + glutamato (1mM); 309: análogo 309 (10 $\mu$ M); 309 +: análogo 309 (10 $\mu$ M) + glutamato (1mM). Os grupos foram comparados utilizando ANOVA one-way para dados com distribuição normal. n=6 placas/grupo. \* p<0,05; \*\*\* p<0,001; \*\*\*\* p<0,0001 quando comparado com o grupo Glutamato; #### p<0,0001 quando comparado com o grupo Controle.

## 6.6 IMUNOFLUORESCÊNCIA E ANÁLISE QUANTITATIVA DE GFAP

A Figura 15 demonstra imagens capturadas para quantificação de GFAP nos astrócitos tratados com os análogos do CBD.

Figura 15 - Marcação de GFAP em Astrócitos.

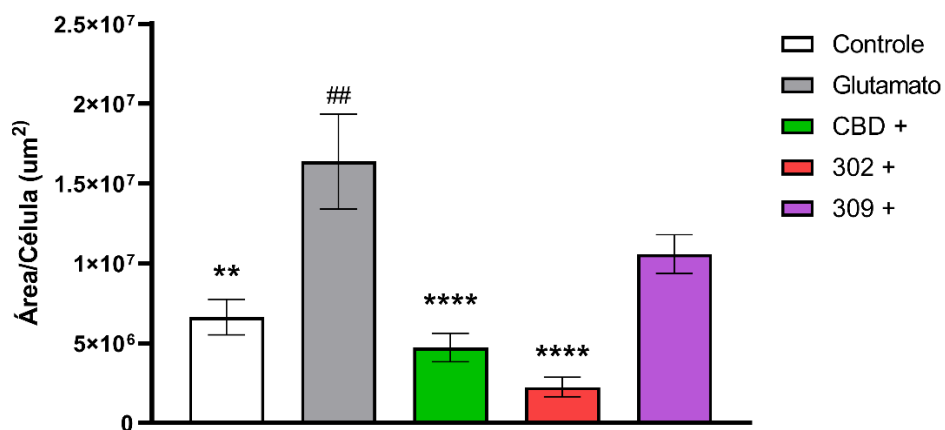


Fonte: Autor (2024)

Legenda: Controle: Água; Glutamato: glutamato (1mM); CBD +: CBD (10 $\mu$ M) + glutamato (1mM); 302 +: análogo 302 (10 $\mu$ M) + glutamato (1mM); 309 +: análogo 309 (10 $\mu$ M) + glutamato (1mM).

A quantificação do sinal fluorescente realizada por densitometria óptica utilizando o software Image J está demonstrada na Figura 16.

Figura 16 - Resultado da marcação de GFAP



Fonte: Autor (2024).

Legenda: Controle: Água; Glutamato: glutamato (1mM); CBD +: CBD (10 $\mu$ M) + glutamato (1mM); 302 +: análogo 302 (10 $\mu$ M) + glutamato (1mM); 309 +: análogo 309 (10 $\mu$ M) + glutamato (1mM). Os grupos foram comparados utilizando ANOVA one-way para dados com distribuição normal. \*\* p<0,01; \*\*\*\* p<0,0001 quando comparado com o grupo Glutamato; ## p<0,0001 quando comparado com o grupo Controle.

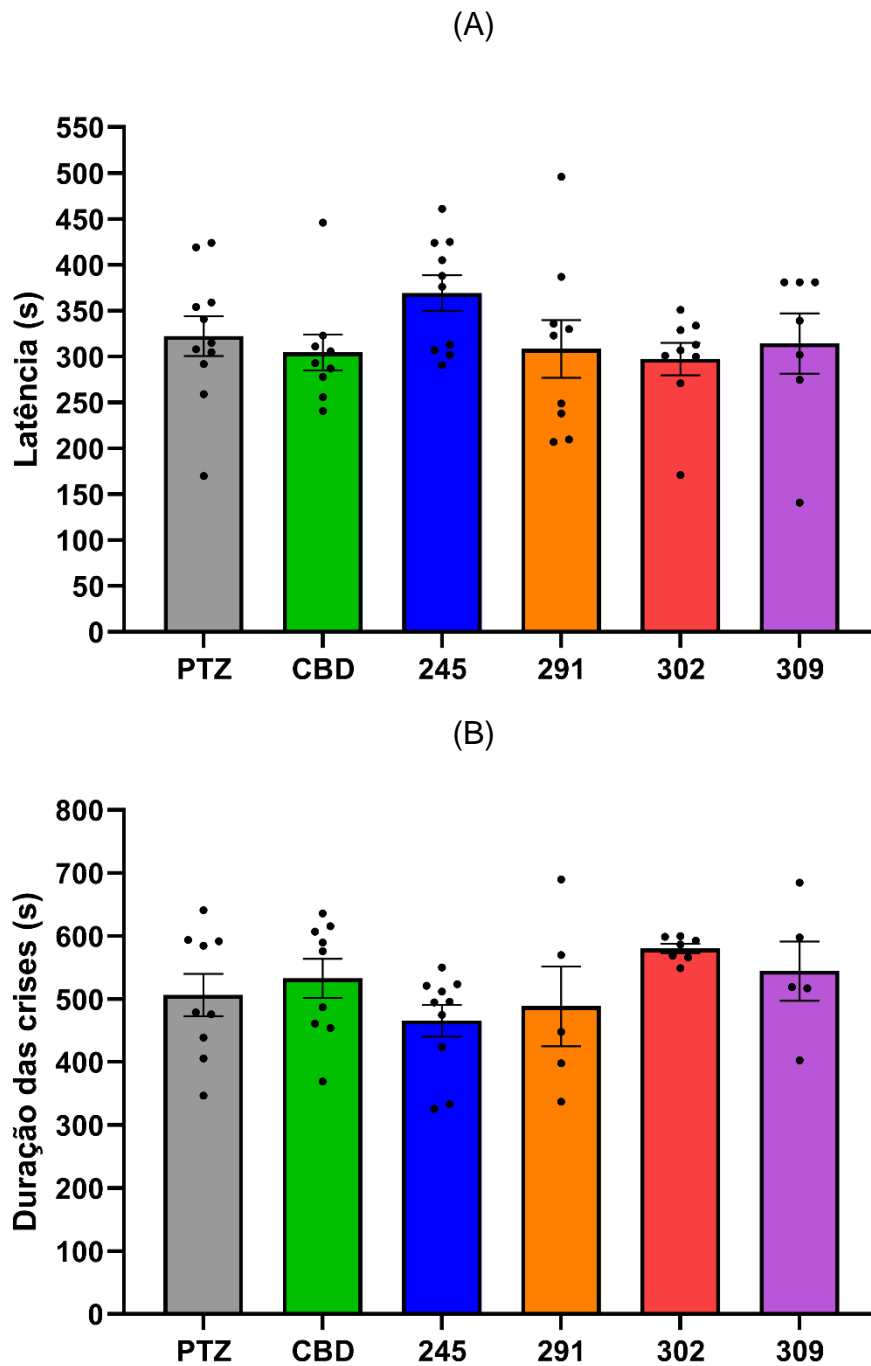
Nota-se que o CBD e o análogo 302 reduziram significativamente a expressão de GFAP, obtendo valores semelhantes ao grupo controle. Por outro lado, apesar do grupo 309 não demonstrar diferença entre o grupo glutamato, o mesmo, também não se mostrou diferente do grupo controle, possuindo uma expressão de GFAP equivalente aos dois grupos.

## 6.7 ANÁLISE COMPORTAMENTAL

### 6.7.1 Modelo *in vivo* de epilepsia induzido por PTZ em ratos *Wistar*

Utilizando uma concentração de 30 mg/Kg de CBD e dos seus análogos, a Figura 17 ilustra o tempo em segundos de latência para as crises convulsivas e a duração das crises, dentro dos 15 minutos dos registros de vídeo.

Figura 17 - Avaliação comportamental da crise induzida por PTZ.



Fonte: Autor (2024)

Legenda: Tempo de latência para as crises (A) e tempo de duração das crises (B). PTZ: PTZ (100mg/kg); CBD: CBD (30mg/kg) + PTZ (100mg/kg); 245: análogo 245 (30mg/kg) + PTZ (100mg/kg); 291: análogo 291 (30mg/kg) + PTZ (100mg/kg); 302: análogo 302 (30mg/kg) + PTZ (100mg/kg); 309: análogo 309 (30mg/kg) + PTZ (100mg/kg). Os grupos foram comparados utilizando ANOVA one-way para dados com distribuição normal.

Não houve diferença entre o grupo PTZ e todos os grupos em estudo, tanto para latência das crises, quanto para a duração das mesmas.

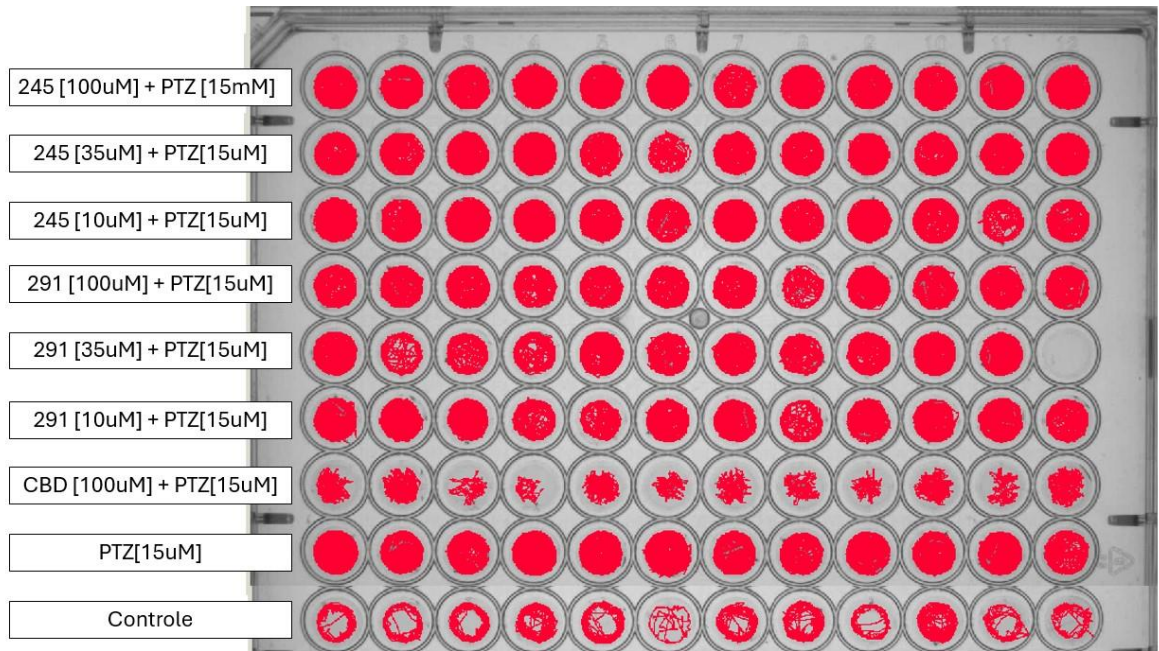
## **6.7.2 Modelo *in vivo* de epilepsia induzido por PTZ em Zebrafish**

### 6.7.2.1 Teste comportamental

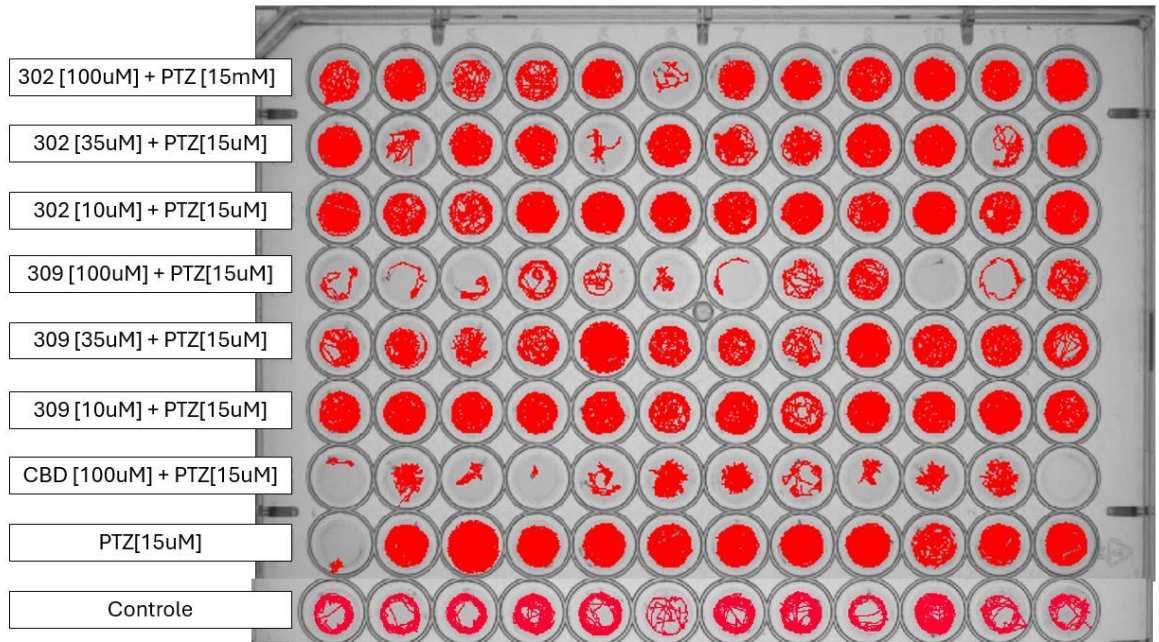
Conforme descrito nos materiais e métodos, os registros gerados durante o teste foram analisados por meio do software de rastreamento de locomoção EthoVision XT (Noldus, Wageningen, Holanda). A Figura 18 ilustra o mapa da trajetória das larvas durante os 20min de teste.

Figura 18 - Mapa da trajetória das larvas 7dpf de Zebrafish durante os 20min de teste

(A)



(B)

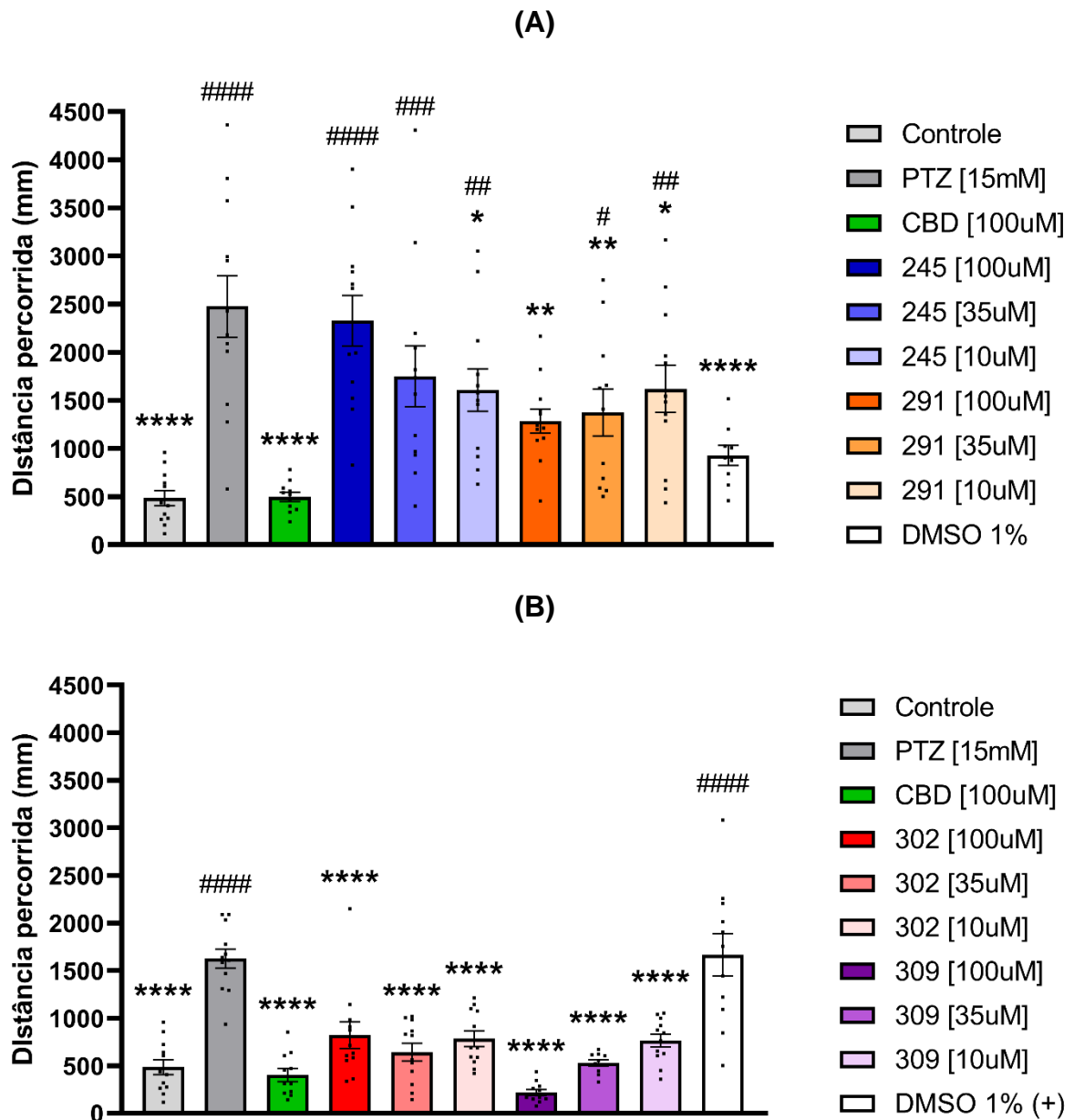


Fonte: Autor (2024)

Legenda: Placa 1 (A) Placa 2 (B).

Os parâmetros avaliados foram: distância percorrida (Figura 19), velocidade (Figura 20), tempo de imobilidade (Figura 21) e frequência de rotação (Figura 22).

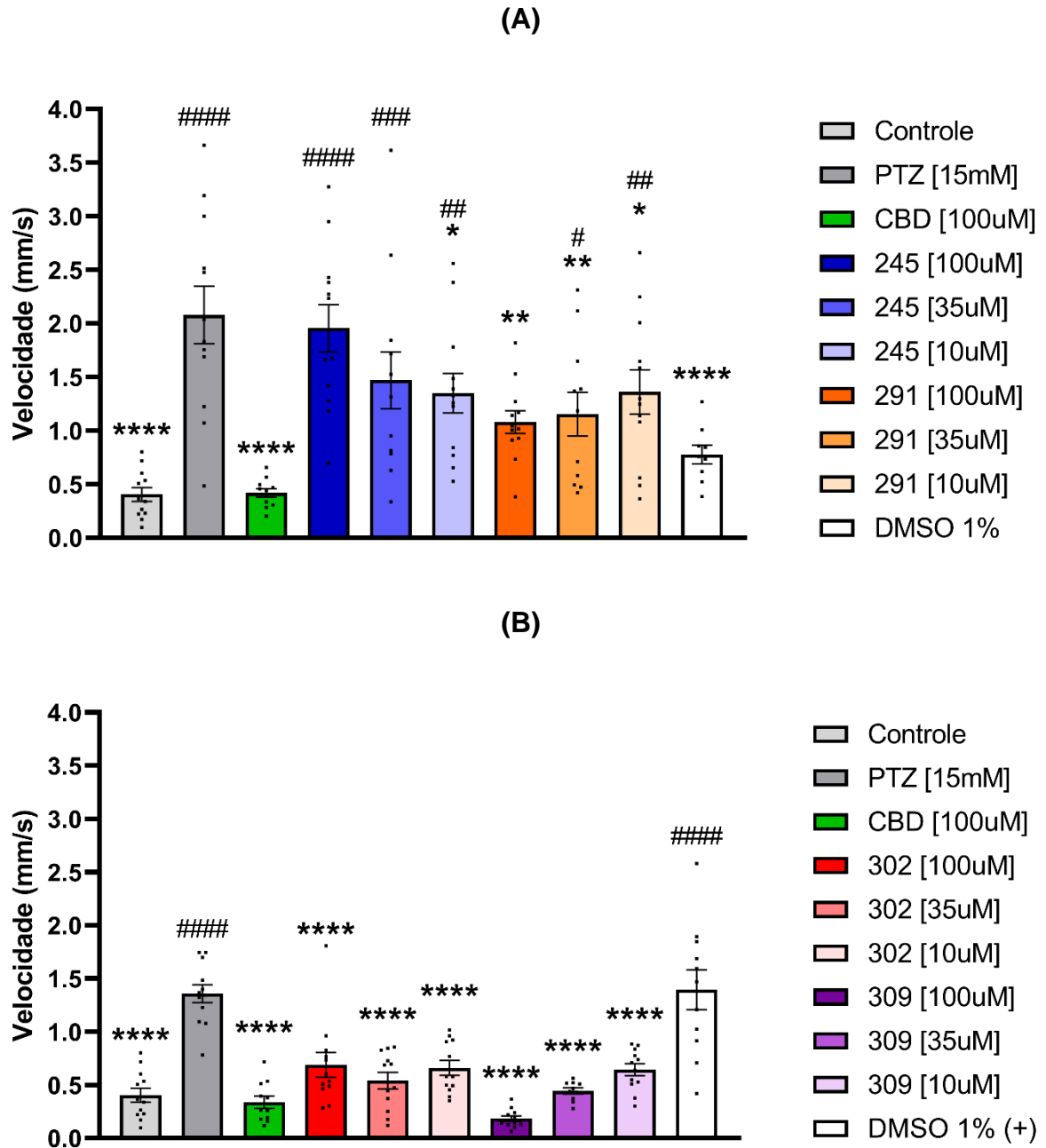
Figura 19 - Distância percorrida pelas larvas de Zebrafish



Fonte: Autor (2024)

Legenda: Placa 1 (A) e placa 2 (B). Os grupos foram comparados utilizando ANOVA one-way para dados com distribuição normal.  $n=12$  animais/grupo. \*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,01$ ; \*\*\*  $p<0,001$ ; \*\*\*\*  $p<0,0001$  quando comparado com o grupo PTZ; #  $p<0,05$ ; ##  $p<0,01$ ; ###  $p<0,001$  e ####  $p<0,0001$  quando comparado com o grupo Controle.

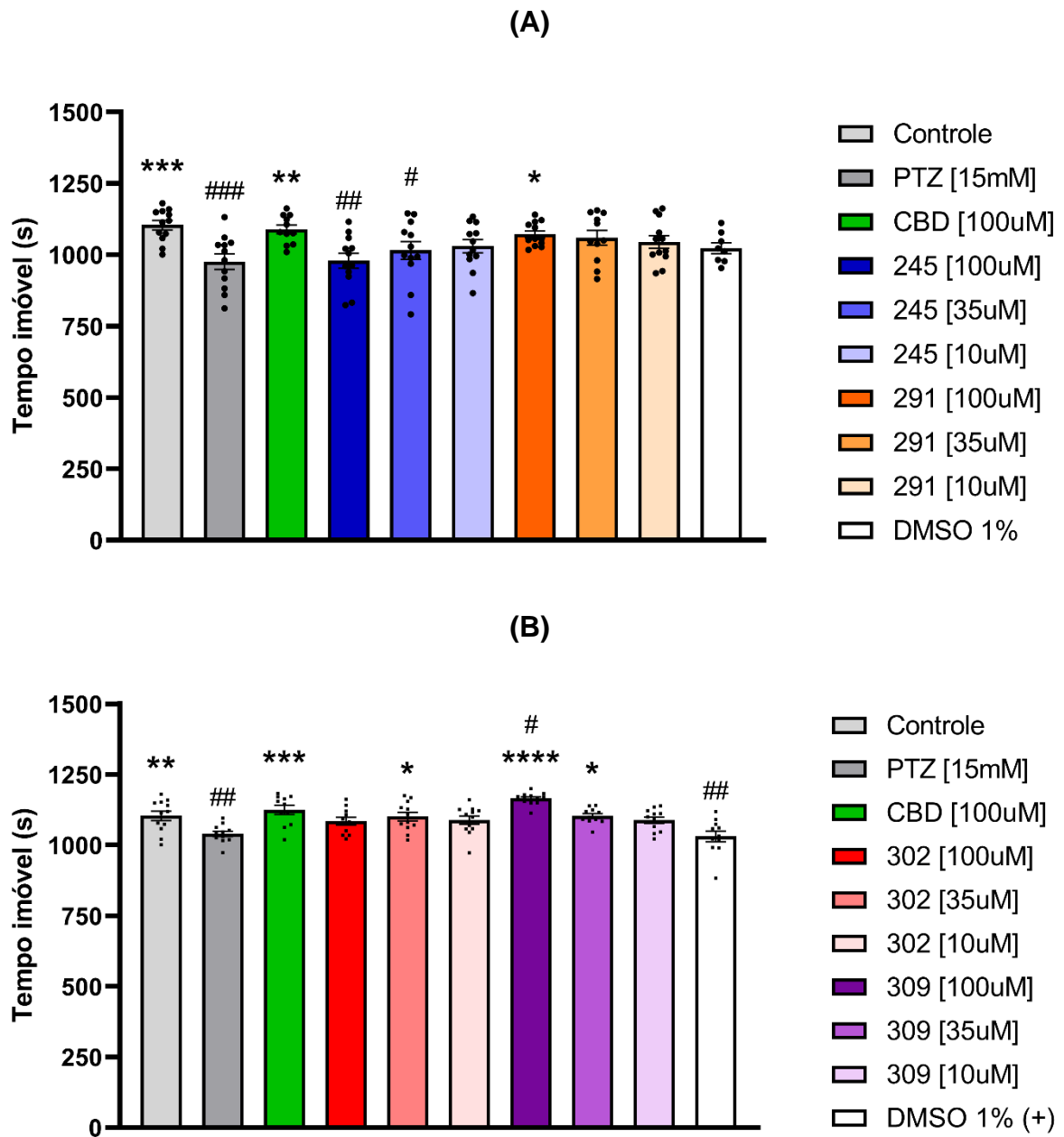
Figura 20 - Velocidade média atingida pelas larvas de Zebrafish



Fonte: Autor (2024)

Legenda: Placa 1 (A) e placa 2 (B). Os grupos foram comparados utilizando ANOVA one-way para dados com distribuição normal.  $n=12$  animais/grupo. \*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,01$ ; \*\*\*  $p<0,001$ ; \*\*\*\*  $p<0,0001$  quando comparado com o grupo PTZ; #  $p<0,05$ ; ##  $p<0,01$ ; ###  $p<0,001$  e ####  $p<0,0001$  quando comparado com o grupo Controle.

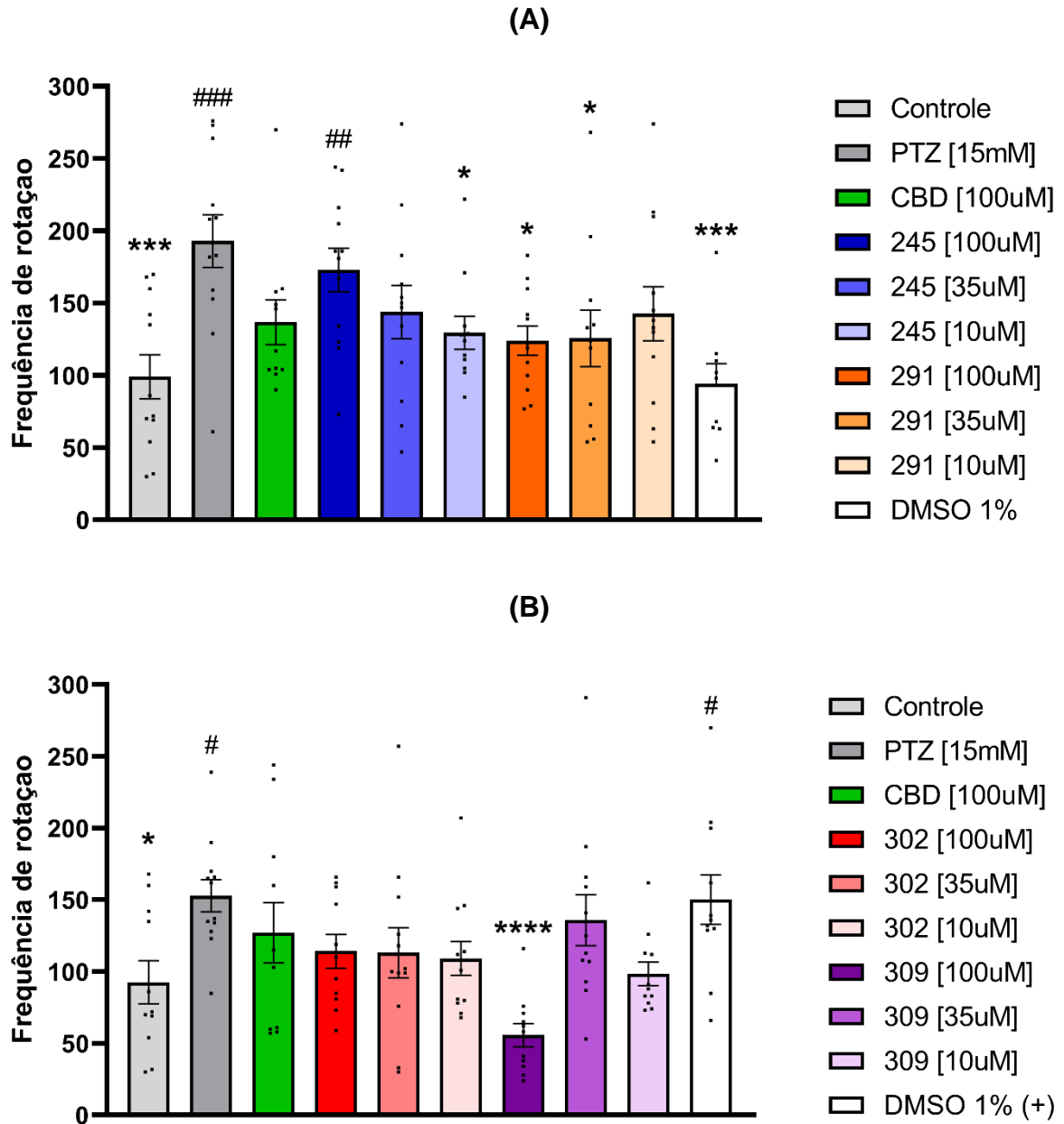
Figura 21 - Tempo de imobilidade apresentado pelas larvas de Zebrafish



Fonte: Autor (2024)

Legenda: Placa 1 (A) e placa 2 (B). Os grupos foram comparados utilizando ANOVA one-way para dados com distribuição normal.  $n=12$  animais/grupo. \*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,01$ ; \*\*\*  $p<0,001$ ; \*\*\*\*  $p<0,0001$  quando comparado com o grupo PTZ; #  $p<0,05$ ; ##  $p<0,01$ ; ###  $p<0,001$  e ####  $p<0,0001$  quando comparado com o grupo Controle.

Figura 22 - Frequência de rotação apresentada pelas larvas de Zebrafish



O grupo PTZ apresentou diferença significativa em todos os parâmetros, comparado ao grupo controle, aumentando a distância percorrida, velocidade, rotação e diminuindo o tempo de imobilidade das larvas. A concentração de 100  $\mu$ M de CBD

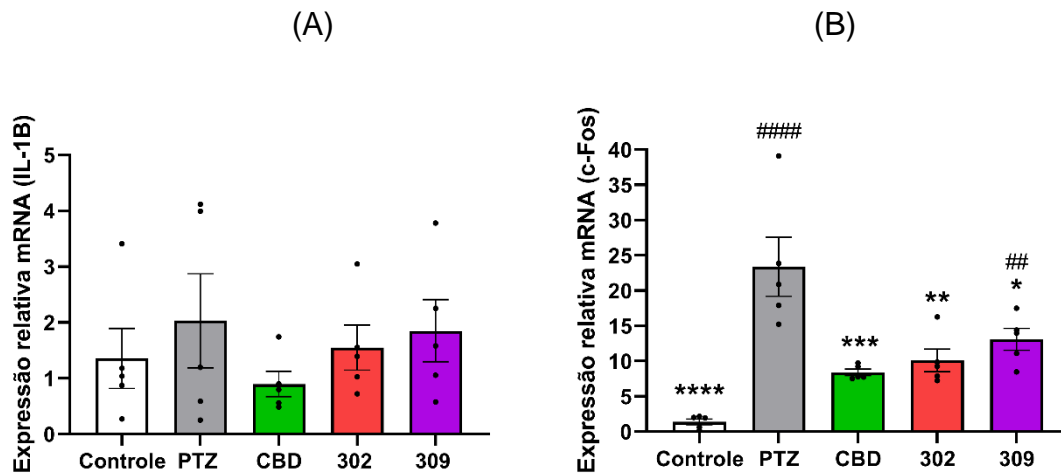
foi eficiente em normalizar os parâmetros de distância percorrida, velocidade e tempo de imobilidade, entretanto, para a frequência de rotação, não foi observada diferença para o grupo PTZ. Em relação aos análogos, nota-se que os análogos 302 e 309 pertencentes a 2ª série obtiveram maior efeito sobre o comportamento das larvas. Eles reduziram a distância percorrida e a velocidade nas 3 concentrações de teste, igualando-se aos valores do grupo controle. Já para os análogos 245 e 291, os efeitos foram de menor intensidade, o análogo 245 não obteve valores semelhantes ao grupo controle para os parâmetros em estudo. Já o análogo 291 na concentração de 100 uM, obteve valores semelhantes ao grupo controle para todos os parâmetros.

Para descartar interferências do solvente utilizado para solubilizar os análogos, avaliamos os parâmetros comportamentais para o grupo tratado somente com DMSO 1% e o grupo tratado com DMSO 1% + PTZ [15mM]. Não houve diferença nos registros do grupo DMSO 1% para o grupo controle. O mesmo em relação ao grupo DMSO 1%(+) e o grupo PTZ.

#### 6.7.2.2 PCR quantitativo em tempo real

Os resultados para quantificação do RNAm para os genes IL-1B e c-Fos estão expressos na Figura 23. Não houve diferença na expressão de IL-1B entre os grupos, por outro lado, para o c-Fos, o grupo PTZ gerou um aumento significativo em sua expressão. O CBD e os análogos 302 e 309 conseguiram reverter esse aumento. Somente para o grupo 309, que a diminuição de c-Fos não foi equivalente ao grupo controle.

Figura 23 - Quantificação da expressão dos genes IL-1B e c-Fos



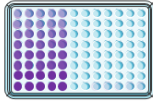

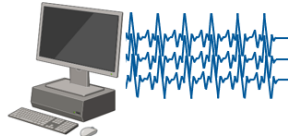

Fonte: Autor (2024)

Legenda: Controle: gene IL-1B (A) e gene c-Fos (B). Água; PTZ: PTZ (15mM); CBD: CBD (100µM) + PTZ (15mM); 302: análogo 302 (100µM) + PTZ (15mM); 309: análogo 309 (100µM) + PTZ (15mM). Os grupos foram comparados utilizando ANOVA one-way para dados com distribuição normal. n=5 /grupo. \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001; \*\*\*\* p< 0,0001 quando comparado com o grupo PTZ; # p<0,01 e ##### p<0,0001 quando comparado com o grupo Controle.

## 6.8 SÍNTESE DOS RESULTADOS

Os quadros 1 e 2 demonstram o apanhado de resultados obtidos para o CBD e os seus análogos 245, 291, 302 e 309 nos modelos em estudo.


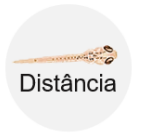




Quadro 1 - Apanhado dos resultados *in vitro*

| <i>In vitro</i> | Viabilidade celular   | Quantificação de glutamato  | Atividade elétrica   | Expressão de GFAP   |
|-----------------|---|---|--|---|
|                 |  |  |  |  |
| CBD             | ✓   | ⊥   | ✓  | ✓   |
| 245             | ✓   | ⊥   | N/A  | N/A   |
| 291             | ✗   | ✓   | ✓  | N/A   |
| 302             | ✗   | ⊥   | ✓  | ✓   |
| 309             | ✓   | ✓   | ✓  | ⊥   |

Fonte: Autor (2024)

Legenda: ✓ = Resultados significativos em relação ao grupo glutamato;  
 ✗ = Resultados não significativos em relação ao grupo glutamato;  
 ⊥ = Resultados não significativos em relação ao grupo controle;  
 N/A = Não foi realizado.

Quadro 2 - Apanhado dos resultados *in vivo*

| <i>In vivo</i> | Ratos Wistar P11  | Larvas de Zebrafish 7dpf  |  |  | RT-PCR para c-Fos   |   |
|----------------|---|---|--|--|---|---|
|                |  |  Distância |  Velocidade |  Imobilidade |  Rotação |  |
| CBD            | ✗   | ✓   | ✓  | ✓  | ✗   | ✓   |
| 245            | ✗   | ✓<br>[10uM]   | ✓<br>[10uM]  | ✗  | ✓<br>[10uM]   | N/A   |
| 291            | ✗   | ✓<br>[100uM]  | ✓<br>[100uM]   | ✓<br>[100uM]   | ✓<br>[35 e 100uM]   | N/A   |
| 302            | ✗   | ✓<br>[10,35 e 100uM]  | ✓<br>[10,35 e 100uM]   | ✓<br>[35 uM]   | ✗   | ✓   |
| 309            | ✗   | ✓<br>[10,35 e 100uM]  | ✓<br>[10,35 e 100uM]   | ✓<br>[35 e 100uM]  | ✓<br>[100uM]  | ✓   |

Fonte: Autor (2024)

Legenda: ✓ = Resultados significativos em relação ao grupo PTZ;  
 ✗ = Resultados não significativos em relação ao grupo PTZ;  
 N/A = Não foi realizado

## 7 DISCUSSÃO

Os tratamentos farmacológicos atuais para epilepsia estão essencialmente focados em aliviar os sintomas, no qual muita das vezes não são eficazes e geram diversos efeitos colaterais indesejáveis. Portanto, a identificação de novos fármacos e estratégias terapêuticas capazes de retardar ou neutralizar os mecanismos de epileptogênese presente na epilepsia é um dos principais desafios atualmente.

Em nossa pesquisa trabalhamos com 2 séries diferentes de compostos análogos do CBD fornecidos pelo PeQuiM. Inicialmente realizamos uma triagem, por meio do teste de viabilidade celular, para selecionarmos alguns dos compostos promissores.

O teste de viabilidade celular em astrócitos por MTT foi feito utilizando 6 concentrações diferentes (100; 50; 25; 12,5; 7,25 e 3,12  $\mu\text{M}$ ), concentrações estas que foram baseadas na literatura, pois geralmente as concentrações utilizadas de CBD em cultura variam de 5 a 30 $\mu\text{M}$  (Jurič *et al.*, 2022; Kim, Yang; Choi, 2023; Lima *et al.*, 2020). Após os resultados obtidos pelo MTT, foi feito o cálculo de  $\text{CC}_{50}$  e  $\text{CC}_{90}$  (Tabela 2). A escolha dos análogos 245, 291, 302 e 309 para prosseguir com os testes no modelo experimental de epilepsia *in vitro*, se deu pelos bons resultados de  $\text{CC}_{50}$  apresentados, sendo outros quesitos levados em consideração, a ampla janela entre as concentrações de  $\text{CC}_{50}$  e  $\text{CC}_{90}$ , e a disponibilidade de síntese pelo PeQuiM. Kim, Yang e Choi (2023), verificaram que o tratamento com CBD (15 e 30  $\mu\text{M}$ ) causou a diminuição da viabilidade celular em culturas de neurônios isolados, enquanto os efeitos neurotóxicos não foram observados em co-cultura de neurônios e astrócitos, fortalecendo o fato que os astrócitos possuem mecanismos neuroprototerres. Em outro trabalho semelhante e dos mesmos autores, o tratamento com CBD 10  $\mu\text{M}$  em co-cultura de astrócitos e neurônios resultou em uma progressão do desenvolvimento neuronal, onde houve uma diminuição nos neurônios do estágio 2, que são neurônios jovens começando a projetar os neuritos, e um aumento nos neurônios do estágio 3 e acima, neurônios maduros que apresentam axônio e dendritos (Kim *et al.*, 2023).

A literatura descreve que em modelos *in vitro*, com cultura primária de neurônios, concentrações de CBD acima de 10  $\mu\text{M}$  mostram efeitos citotóxicos em determinadas condições experimentais, levando à morte celular por apoptose ou necrose (Echeverry *et al.*, 2021; Kim *et al.*, 2021; Romariz *et al.*, 2024). Com base no

CC<sub>50</sub> médio de nossos análogos selecionados, aproximadamente 40 µM, sugere-se que os análogos apresentem menor citotoxicidade que o CBD. Entretanto, como nosso estudo foi feito em cultura primária de astrócitos ou em co-cultura com neurônios, e os trabalhos acima citados utilizaram concentrações de CBD de 5 a 30 µM, optamos por dar continuidade aos experimentos *in vitro* trabalhando com a concentração de 10 µM para o CBD e seus análogos.

Nenhum composto das séries 3 e 4 foram selecionados porque estas séries foram fornecidas ao decorrer do doutorado, segundo semestre de 2022 para 2 série, e recentemente em 2024 para a 4 série. Essas séries foram disponibilizadas pelo PeQuiM especificamente para os testes de viabilidade celular em astrócitos, entretanto, poderão servir de estudo para trabalhos futuros do nosso grupo.

Um teste simples, mas que nos mostrou bom resultado, foi a realização da viabilidade celular dos astrócitos aplicando o pré-tratamento com os análogos 10 µM por 30 minutos frente ao estímulo de glutamato 1 mM. Notamos que os compostos 245 e 309 foram capazes de proteger os astrócitos frente a excitotoxicidade causada pelo glutamato, sendo esse comportamento, também observado para o CBD.

Os mecanismos moleculares envolvidos na excitotoxicidade pelo glutamato são diversos. Dentre o principal, está a ativação excessiva dos receptores NMDA, levando à entrada massiva de Ca<sup>2+</sup> nas células. O excesso de cálcio intracelular resulta em uma série de efeitos prejudiciais, incluindo a ativação de enzimas (proteases, lipases e nucleases), a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), a disfunção mitocondrial e a indução de apoptose (morte celular programada) (Borgonetti *et al.*, 2022; Franco e Perucca, 2019; Mahmoud *et al.*, 2019; Musa *et al.*, 2017).

É visto que o glutamato reduz significativamente a viabilidade celular em cultura de astrócitos, entretanto é observado que os astrócitos possuem uma resistência maior ao glutamato em comparação aos neurônios, onde apenas 20% da morte celular dos astrócitos foi observada, utilizando 200 mM de glutamato, e 90% de morte empregando 300 mM. Já para os neurônios a concentração de 10 mM foi suficiente para gerar morte de 90% das células (Musa *et al.*, 2017). Esse fato nos mostra que os astrócitos têm a capacidade de sobreviver em um ambiente com alta concentração de glutamato devido à sua aptidão de metabolizar o glutamato por meio do ciclo glutamato glutamina (Mahmoud *et al.*, 2019; Pajarillo *et al.*, 2019).

Nosso resultado demonstrou que o CBD obteve uma proteção significativa na viabilidade celular, o que também foi relatado por outros pesquisadores em outros tipos celulares. Foi visto que o CBD melhorou o perfil bioenergético mitocondrial, atenuando a liberação de citocinas pró-inflamatórias e a superprodução de EROs em astrócitos (Ibork *et al.*, 2023). Borgonetti e colaboradores (2022), utilizando extrato não psicotrópico da *Cannabis spp. rico* em CBD, verificaram um perfil de proteção significativa nas células SH-SY5Y estimuladas com excesso de glutamato no teste de viabilidade celular. É difícil elucidar o mecanismo de ação do CBD em cada tipo de célula do SNC, visto que o SNC é formado por um circuito extremamente complexo composto por vários tipos de células que se comunicam entre si, incluindo neurônios e células da glia (Kim *et al.*, 2023).

Sabe-se que os astrócitos desempenham papel essencial durante excitabilidade neuronal provocada pelo excesso de glutamato, captando o glutamato extracelular e metabolizando em glutamina (Andersen *et al.*, 2021). Com intuito de verificar o efeito direto do CBD e os análogos no ciclo glutamato glutamina, realizamos a quantificação do glutamato por HPLC, tanto intracelular, quanto o extracelular. O grupo controle, como esperado, apresentou um aumento intracelular de glutamato perante o estímulo com a concentração de 1 mM. Esse comportamento, sugere o correto funcionamento do ciclo glutamato glutamina nos astrócitos, pois quando estimulado os transportadores específicos (GLT1 e GLAST) realizaram a absorção do glutamato extracelular. Uma vez absorvido pelos astrócitos o glutamato deve sofrer sua conversão em glutamina através da GS (Devinsky *et al.*, 2013; Hubbard *et al.*, 2016; Malerba, 2019). Nossos resultados, mostram uma interação dos compostos 291 e 309 com a captação do glutamato pelos astrócitos, observando um aumento significativo do transporte intracelular após o estímulo. Acreditamos que de alguma forma esses compostos estejam estimulando a entrada de glutamato nos astrócitos. Entretanto, os resultados apresentados pelo CBD não demonstraram diferença em comparação ao grupo controle. Sugerimos que possivelmente o CBD não interaja com o ciclo glutamato glutamina em si, que seu perfil neuroprotetor contra o excesso de glutamato seja por meio da sua capacidade de modulação da liberação desse neurotransmissor, reduzindo a liberação excessiva de glutamato em situações de estresse oxidativo ou inflamação, potencialmente por meio da modulação dos

receptores TRPV1 e antagonismo do receptor GPR55 (Franco e Perucca, 2019; Kim *et al.*, 2023; Stott *et al.*, 2019).

Recentemente, a tecnologia de MEAs surgiu como uma ferramenta poderosa para gravar atividade elétrica neuronal. Por meio dela, é possível obter dados de atividade de disparos espontâneos de neurônios cultivados durante semanas ou até meses (Bryson *et al.*, 2022; McCready *et al.*, 2022). Geissler e Faissner (2012), demonstraram o papel essencial dos astrócitos sobre a saúde e maturação neuronal por meio do uso de MEAs. Nestes estudos, culturas puras de neurônios obtiveram maior taxa de morte celular quando comparadas com co-culturas com astrócitos. Outra pesquisa trabalhando com astrócitos derivados da medula espinhal cultivados com neurônios motores em MEA mostrou que os astrócitos melhoram a maturação eletrofisiológica dos neurônios de forma dependente do tempo, registrando a atividade semanalmente por 30 dias (Taga *et al.*, 2019). A literatura traz que a maturação neuronal é obtida com cerca de 20 a 30 dias de cultivo (Goshi *et al.*, 2020; Sun, Sombati e Delorenzo, 2001). Com base nessas informações e estudos, optamos por trabalhar com o tempo de 30 dias para maturação neuronal.

Em nosso modelo experimental de epilepsia por adição de glutamato foi possível notar um aumento significativo da porcentagem média de *spikes* para o grupo glutamato frente ao controle, o que caracteriza o êxito de nosso modelo para epilepsia, visto que, usando uma matriz de 4096 microeletrodos, Ferres e colaboradores (2012), registraram com sucesso a atividade epileptiforme, observando um aumento de descargas de alta frequência, trabalhando com fatias cerebrais que abrangeram o hipocampo e parte das áreas corticais conectadas. Utilizando como tratamento 4-aminopiridina (4-AP) e hidrobrometo SR-95531 (gabazina), compostos frequentemente utilizados para indução de epilepsia *in vitro*, Ahtiainen e colaboradores (2021), verificaram o aumento de atividade dos neurônios corticais de ratos em dispositivos MEAs. Achado interessante dos mesmos autores, que mais uma vez nos mostra o papel neuroprotetor dos astrócitos, foi que em co-cultura, os astrócitos efetivamente neutralizaram o efeito do 4-AP durante a estimulação. Entretanto para a gabazina, a hiperatividade neuronal não foi combatida. Sendo que a 4-AP é um bloqueador de canais  $K^+$ , o que resulta no aumento  $Ca^+$  (Kasatkina, 2016), e a gabazina é um antagonista competitivo da  $GABA_A$ , portanto, reduz o papel inibitório do GABA (Bradley *et al.*, 2018).

Com base nos resultados para o grupo CBD, novamente sugerimos, que apesar de não ter demonstrado diferença na quantificação de glutamato intracelular nos astrócitos, seu papel no controle da atividade elétrica seja devido a diminuição no influxo de  $\text{Ca}^+$  extracelular, possivelmente por causa da dessensibilização dos canais TRPV1 e o antagonismo do receptor GPR55 (Franco e Perucca, 2019; Stott *et al.*, 2019). Visto que, o CBD foi capaz de normalizar a atividade elétrica dos neurônios para os tratamentos de 3 e 24h horas. O mesmo comportamento foi observado para os análogos 291, 302 e 309 no teste de 3h. Já para o teste de 24h somente os compostos 302 e 309 mantiveram o equilíbrio.

Sabe-se que o GFAP é o primeiro marcador em resposta de mudanças morfológicas e funcionais dos astrócitos, por isso tem sido o marcador astrocítico mais usado em estudos de imunofluorescência (Gomes *et al.*, 2015; Heithoff *et al.*, 2021). Com a oportunidade do doutorado sanduíche na George Mason, realizamos quantificação da expressão de GFAP em resposta a incubação com o CBD e análogos 302 e 309, que apresentaram bons resultados na análise da atividade elétrica, no modelo com estímulo de glutamato.

O aumento de astrócitos reativos por meio da análise de GFAP é um fato bem caracterizado na literatura em modelos experimentais de epilepsia, seja em modelos *in vitro* (Çarçak, Onat e Sitnikova, 2023; Kang *et al.*, 2006) ou modelos *in vivo* (Alese e Mabandla, 2019; Mochol *et al.*, 2023). Isso também foi observado em nosso modelo *in vitro* com excesso de glutamato.

A redução do GFAP encontrada no grupo CBD se correlaciona com o papel protetor verificado no teste de viabilidade celular frente ao estímulo com glutamato. Achados semelhantes foram demonstrados em modelos *in vivo* de epilepsia, como o modelo por pilocarpina, no qual o tratamento com CBD reduziu expressivamente o GFAP dos astrócitos (Lima *et al.*, 2020). Kozela, Juknat e Vogel (2017), correlacionaram o efeito anticonvulsivo encontrado no CBD com a diminuição da hiperplasia de astrócitos, conseqüentemente com a diminuição da expressão de GFAP. O CBD também se mostrou eficaz em reduzir a expressão de GFAP em modelos de outras doenças neurológicas, como em modelo de doença de Parkinson (Giuliano *et al.*, 2021) e dor neuropática crônica (Silva-Cardoso *et al.*, 2023).

Para o grupo 302, apesar desse composto não gerar proteção na viabilidade celular dos astrócitos frente ao glutamato, ele apresentou uma redução significativa

na expressão de GFAP em co-cultura de astrócitos e neurônios. O análogo 309 não apresentou diferença entre o grupo glutamato e o grupo controle, obtendo uma expressão de GFAP estatisticamente semelhante aos 2 grupos. Sabe-se que em sua forma extrema, a astrogliose reativa pode originar a formação de cicatrizes e perda de função dos astrócitos (Alese e Mabandla, 2019), porém, é visto que em formas leves e moderadas, a astrogliose reativa exibe um papel de proteção neuronal, aumentando as funções dos astrócitos, como a captação de glutamato. E que após a resolução do mecanismo desencadeante da astrogliose, nos casos leves, as células retornam a morfologia inicial (Neves, Mestriner e Netto, 2018; Sofroniew, 2009, 2020). Esse fato pode estar relacionado com o comportamento apresentado pelo análogo 309, o qual gerou aumento na captação de glutamato intracelular e um aumento não significativo de GFAP em relação ao grupo controle.

Após o apanhado dos resultados *in vitro* e com intuito de verificar o efeito dos compostos no comportamento de animais, utilizamos o modelo de indução *in vivo* de epilepsia por PTZ.

Atualmente o PTZ é um composto amplamente utilizado para o modelo de epilepsia animal, seja em ratos, camundongos ou peixes como o Zebrafish (Campos-Rodriguez *et al.*, 2020; Taskiran e Taşdemir, 2023; Zavileyskiy *et al.*, 2022). O mecanismo pelo qual PTZ gera crises convulsivas é devido seu antagonismo de receptores GABA<sub>A</sub>, diminuindo a ação inibitória do SNC, podendo ser usado em modelos agudos e crônicos (Çarçak, Onat e Sitnikova, 2023). O modelo de indução de epilepsia por PTZ em ratos *Wistar* é uma ferramenta valiosa, proporcionando o estudo de possíveis compostos anticonvulsivantes em diferentes concentrações (Obay *et al.*, 2007; Şirinyıldız e Ek, 2021).

A epilepsia infantil tem grande relevância clínica, pela alta prevalência e gravidade, provocando alterações de linguagem, memória e desenvolvimento da criança. Cerca de 19% a 30% das crianças com epilepsia apresentam resistência aos tratamentos convencionais (Urio *et al.*, 2024). Com base na literatura, optamos por realizar o estudo utilizando ratos *Wistar* com 11 dias de idade, pois, a idade dos ratos que corresponde à infância em humanos geralmente se situa entre 7 e 14 dias após o nascimento (Ohmura e Kuniyoshi, 2017).

Devido ao complexo processo de síntese dos análogos, o que gera custo financeiro, não tínhamos quantidades suficientes para testar diferentes

concentrações. Decidimos então, avaliar apenas a concentração de 30mg/kg dos análogos. O ideal seria realizarmos uma varredura com diferentes concentrações para analisar o possível efeito dos compostos, visto que utilizando do mesmo modelo de indução de epilepsia por PTZ, Witherspoon; Quinlan e Forcelli (2022), trabalharam com concentrações de 1, 10, 50, 100 e 200 mg/kg de CBD em ratos neonatos com 7 dias, onde apenas as concentrações de 100 e 200 mg/kg foram capazes de reduzir a duração das crises, e apenas a de 200 mg/kg diminuiu o período de latência para as crises. Em um outro trabalho do mesmo grupo, utilizando concentrações de 50, 100, 200 mg/Kg de Cannabinodivarin (CBVD) em ratos com 10 dias de vida, os resultados demonstraram que nenhuma das concentrações utilizadas foi eficaz para reduzir a latência das crises geradas (Huizenga, Sepulveda-Rodriguez e Forcelli, 2019). Com animais um pouco mais velhos de >20 dias, os resultados com o CBD são mais expressivos, observando diminuição da latência e severidade das crises (Jones *et al.*, 2010; Witherspoon, Quinlan e Forcelli, 2022). Sugerimos que este fato possa estar relacionado com a resistência da epilepsia na infância, com a idade de 11 dias, os receptores para o canabidiol e outros fármacos anticonvulsivantes, podem não ter sua significativa expressão.

Com a recente colaboração com a Profa. Dra. Claudia Vianna Maurer Morelli da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, realizamos a investigação dos efeitos do CBD e dos análogos 245, 291, 302 e 309 sobre o modelo de indução de epilepsia por PTZ em larvas de Zebrafish.

Como descrito no referencial teórico, o modelo com Zebrafish é altamente eficiente para triagem de fármacos, graças à similaridade do SNC com os humanos, sua reprodução rápida e custo relativamente baixo (D'Amora *et al.*, 2023). Além disso, por se tratar de um organismo pequeno e de fácil maleabilidade, o modelo em Zebrafish nos proporcionou testar 3 concentrações diferentes de cada análogo (10, 35 e 100 uM), oferecendo uma melhor compreensão dos efeitos dos compostos sobre as convulsões, do que no modelo em ratos *Wistar*.

Baraban e colaboradores (2005), foram os primeiros a descreverem o comportamento de larvas 7dpf de zebrafish estimuladas com PTZ. No estudo, os peixes em crises convulsivas apresentaram um aumento na atividade geral, incluindo movimentos mais intensos e desordenados, como alterações na velocidade e na direção da natação. Após os primeiros registros de convulsão por meio de inspeção

visual, ferramentas de vídeo automáticas e semiautomáticas foram surgindo, e atualmente são amplamente utilizadas, pois, têm demonstrado vantagens significativas em comparação a análises visuais, como rapidez e precisão nos resultados (D'Amora *et al.*, 2023).

Em nosso estudo, por meio de análise automatizada pelo equipamento *DanioVision* e software *Ethovision*, verificamos os comportamentos: distância percorrida, velocidade, tempo de imobilidade e frequência de rotação. O PTZ foi capaz de alterar todos os parâmetros em estudo, provocando um aumento na distância percorrida, velocidade, frequência de rotação e diminuição no tempo de imobilidade. Achados, que corroboram com outros autores que trabalharam com o modelo de epilepsia por PTZ em Zebrafish (Barbalho *et al.*, 2016; Ren *et al.*, 2019 Wang *et al.*, 2018).

A eficácia do CBD, encontrada em nosso estudo, em normalizar os parâmetros de distância e velocidade, ocasionadas pelo PTZ, são dados também relatados por outros pesquisadores (Samarut *et al.*, 2019; Thornton *et al.*, 2020), demonstrando que, por algum mecanismo, o CBD é capaz de inativar a hiper mobilidade presente nas crises em Zebrafish.

Em relação aos seus análogos, o comportamento foi bem variado. Para o 245, observamos que ele pode não seguir um padrão dose-resposta claro, apresentando eficácia em concentrações baixas (10  $\mu$ M), porém, com o aumento da concentração, o efeito não é observado. Para o 291, apesar de mostrar efeito em todos os parâmetros, as diferenças para o grupo PTZ foram discretas, e geralmente não igualaram ao grupo controle. Já os análogos 302 e 309 foram os que apresentaram maiores efeitos, reduzindo a distância e a velocidade nas 3 concentrações testadas, o que sugere um grande potencial em reduzir a hipermovimentação das larvas ao decorrer das crises.

Durante as crises convulsivas ocorre ativação neuronal desorganizada, com a presença de neuroinflamação mediada por citocinas pro-inflamatórias. O estudo da expressão de genes, como c-Fos e IL-1b, podem refletir a ativação neuronal e o processo de inflamação em resposta a estímulos experimentais (Barbalho, Lopes-Cendes e Maurer-Morelli, 2016; Kollipara *et al.*, 2023; Vezzani; Baram, 2007). Como os análogos 302 e 309 apresentaram efeitos promissores nos testes

comportamentais, principalmente na concentração de 100  $\mu$ M, eles foram selecionados para quantificação destes genes.

O aumento de IL-1b foi descrito pelo grupo da Profa. Cláudia em modelos de epilepsia em Zebrafish (Barbalho *et al.*, 2016; Barbalho, Lopes-Cendes; Maurer-Morelli, 2016). Nossos resultados não conseguiram caracterizar o mesmo, visto que, há uma tendência de aumento para IL-1b no grupo PTZ, porém, o n=5 não foi suficiente para constatar essa diferença.

Já para o c-Fos, nota-se em nossos achados que sua expressão relativa foi aumentada para o grupo PTZ, caracterizando ativação neuronal imediata, o que está presente durante as convulsões (Baraban *et al.*, 2005; Barbalho, Lopes-Cendes e Maurer-Morelli, 2016; Kollipara *et al.*, 2023). Tanto o CBD quanto os análogos testados, 302 e 309, obtiveram uma redução expressiva na expressão de c-fos. Entretanto, para o grupo 309, essa expressão não foi similar ao grupo controle.

Estes achados, combinados com os resultados encontrados em nossos estudos *in vitro* e *in vivo*, principalmente no modelo de Zebrafish, sugerem um potencial anticonvulsivo dos análogos do CBD, apresentando efeitos similares ao CBD, ou até mesmo melhores, como o caso da captação de glutamato pelos astrócitos. Os canabinoides sintéticos, como os análogos do CBD, são uma alternativa vantajosa para o tratamento das epilepsias, visto que, podem ser produzidos com uma composição química consistente e controlada, sem utilizar a planta, garantindo que o composto tenha mesma estrutura e eficácia (Wermuth, 2006). Essa consistência é mais difícil de se obter em extratos de plantas, pois, devido às variações naturais, como clima, solo e fertilização, sua composição e estrutura molecular estão sempre em mudança (Datwyler e Weiblen, 2006; Miranda *et al.*, 2020). Outra grande vantagem que os análogos do CBD apresentam, é que por serem sintéticos, não dependem da planta e podem ser mais facilmente regulamentados.

## 8 DESAFIOS E LIMITAÇÕES

Durante o período do doutorado, os dois primeiros anos foram realizados durante a pandemia de COVID-19, o que apresentou desafios significativos. A pandemia resultou no fechamento do biotério devido às políticas de saúde pública, dificultando a obtenção de culturas celulares essenciais para a pesquisa. Além disso, a síntese dos análogos pelo PeQuiM foi interrompida pela impossibilidade de utilizar os laboratórios. Para contornar essas limitações, optamos por trabalhar com os compostos disponíveis e utilizar a linhagem de células imortalizadas SH-SY5Y. No entanto, observamos que essa linhagem apresentava um comportamento significativamente diferente dos astrócitos, levando-nos a decidir descontinuar os testes com SH-SY5Y e retomar os testes com astrócitos assim que o biotério estivesse novamente disponível.

Além desses desafios, enfrentamos limitações financeiras e técnicas que impactaram a execução da imunofluorescência na Unifal. A aquisição de anticorpos específicos e problemas com o microscópio de fluorescência foram obstáculos que não puderam ser superados a tempo. No entanto, a oportunidade de realizar o doutorado sanduíche em 2023 permitiu a realização da imunofluorescência para a expressão de GFAP em astrócitos em co-cultura na George Mason University.

Durante o doutorado sanduíche, enfrentamos diversos desafios adicionais. Um dos principais problemas foi o número limitado de dispositivos MEAs disponíveis no laboratório, cerca de 40 dispositivos, que eram lavados com detergente enzimático tergazyme e preparados com poli-d-lisina para receber as células. Esse processo levava cerca de 5 dias e, devido à reutilização dos dispositivos, muitas vezes a lavagem não era completamente eficiente, resultando em contaminações fúngicas e bacterianas. Como resultado, obtivemos um aproveitamento de aproximadamente 70% das placas, o que nos permitiu utilizar, em média, 3 dispositivos por grupo para cada cultura realizada.

Outro desafio foi o curto período do doutorado sanduíche, com duração de apenas 6 meses. O início em dezembro coincidiu com as férias da universidade, o que atrasou o início dos treinamentos especializados necessários para o manuseio de animais e equipamentos laboratoriais. Os treinamentos só puderam ser realizados em janeiro, e dos 4 meses restantes, conseguimos desenvolver 3 culturas, das quais uma

foi contaminada por bactérias. Portanto, os resultados apresentados correspondem a 2 culturas, ou seja, um total de 6 placas por grupo.

Apesar dos desafios e limitações enfrentados, as diversas parcerias e colaborações estabelecidas ao longo do doutorado foram fundamentais para conclusão deste trabalho. Por meio da realização de experimentos *in vitro* e *in vivo* foi possível obter resultados relevantes que contribuíram para a compreensão dos efeitos de análogos do CBD na epilepsia.

## 9 CONCLUSÕES

### Modelo *in vitro*:

- a) O CBD foi capaz de proteger os astrócitos frente ao glutamato 1 mM, aumentando a viabilidade celular, reduzindo a expressão de GFAP e normalizando os níveis de atividade elétrica neuronal. Entretanto, não alterou os níveis de captação de glutamato pelos astrócitos;
- b) Os análogos em estudo demonstraram comportamento similar ao CBD, destacando o 291 e 309 que aumentaram a captação de glutamato nos astrócitos;
- c) Os análogos 302 e 309 foram os que obtiveram os melhores resultados *in vitro*, principalmente em reduzir a atividade elétrica neuronal.

### Modelo *in vivo*:

- a) A concentração de 30 mg/kg do CBD e de seus análogos não demonstrou diferença no estudo em ratos *Wistar P11*;
- b) No modelo em Zebrafish, o CBD foi capaz de reverter o aumento da distância percorrida, velocidade e tempo de imobilidade apresentados pelo grupo PTZ. Assim como, diminui a ativação neuronal encontrada nas crises, por meio da quantificação de c-Fos;
- c) O análogo 245 apresentou um comportamento de concentração-efeito variado, no qual, a concentração de 10  $\mu$ M foi eficaz para diminuir os parâmetros de distância, velocidade e frequência de rotação, porém, com o aumento da concentração os efeitos não foram observados.
- d) Os análogos 302 e 309 obtiveram uma redução significativa nos parâmetros de distância e velocidade para as 3 concentrações testadas. Na

concentração de 100  $\mu\text{M}$  apresentaram redução na expressão de c-Fos similar ao CBD.

- e) Por fim, concluímos que o uso dos análogos do CBD podem ser uma excelente ferramenta para o tratamento das epilepsias, pois, por meio de uma síntese controlada, é possível obter efeitos similares ou até mesmo melhores que o CBD.

## REFÊRENCIAS

ABUHASIRA, Ran; SHBIRO, Liat; LANDSCHAFT, Yuval. Medical use of cannabis and cannabinoids containing products – Regulations in Europe and North America. **European Journal of Internal Medicine**. [S.l.]. v. 49, n. January, p. 2–6, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2018.01.001>. Acesso em: 10 ago. 2024.

AHTIAINEN, Annika *et al.* Astrocytes exhibit a protective role in neuronal firing patterns under chemically induced seizures in neuron–astrocyte co-cultures. **International Journal of Molecular Sciences**. [S.l.]. v. 22, n. 23, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms222312770>. Acesso em: 22 ago. 2024.

ALBRECHT, Jan; ZIELIŃSKA, Magdalena. Mechanisms of Excessive Extracellular Glutamate Accumulation in Temporal Lobe Epilepsy. **Neurochemical Research**. [S.l.]. v. 42, n. 6, p. 1724–1734, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11064-016-2105-8>. Acesso em: 22 ago. 2024.

ALESE, Oluwole O.; MABANDLA, Musa V. Upregulation of hippocampal synaptophysin, GFAP and mGluR3 in a pilocarpine rat model of epilepsy with history of prolonged febrile seizure. **Journal of Chemical Neuroanatomy**. [S.l.]. v. 100, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2019.101659>. Acesso em: 11 ago. 2024.

AMES, F R; CRIDLAND, S. Anticonvulsant effect of cannabidiol. **South African medical journal = Suid-Afrikaanse tydskrif vir geneeskunde**. Africa do Sul. v. 69, n. 1, p. 14, 1986. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3941934>. Acesso em: 22 ago. 2024.

ANDERSEN, Jens V. *et al.* Extensive astrocyte metabolism of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) sustains glutamine synthesis in the mammalian cerebral cortex. **GLIA**. [S.l.]. v. 68, n. 12, p. 2601–2612, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/glia.23872>. Acesso em: 10 Jul. 2024.

ANDERSEN, Jens V. *et al.* Glutamate metabolism and recycling at the excitatory synapse in health and neurodegeneration. **Neuropharmacology**. [S.l.]. v. 196, n. April, p. 108719, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108719>. Acesso em: 10 Jul. 2024.

AVOLA, Rosanna *et al.* New insights on Parkinson's disease from differentiation of SH-SY5Y into dopaminergic neurons: An involvement of aquaporin4 and 9. **Molecular and Cellular Neuroscience**. [S.l.]. v. 88, p. 212–221, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2018.02.006>. Acesso em: 10 ago. 2024.

BARABAN, S. C. *et al.* Pentylentetrazole induced changes in zebrafish behavior, neural activity and c-fos expression. **Neuroscience**. [S.l.]. v. 131, n. 3, p. 759–768, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.11.031>. Acesso em: 10 ago. 2024.

BARBALHO, Patrícia Gonçalves *et al.* Cyclooxygenase-1 as a potential therapeutic target for seizure suppression: Evidences from zebrafish pentylentetrazole-seizure

model. **Frontiers in Neurology**. [S.l.]. v. 7, n. NOV, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fneur.2016.00200>. Acesso em: 15 maio 2024.

BARBALHO, Patrícia Gonçalves; LOPES-CENDES, Iscia; MAURER-MORELLI, Claudia Vianna. Indomethacin treatment prior to pentylentetrazole-induced seizures downregulates the expression of il1b and cox2 and decreases seizure-like behavior in zebrafish larvae. **BMC Neuroscience**. [S.l.]. v. 17, n. 1, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12868-016-0246-y>. Acesso em: 15 maio 2024.

BAYEWITCH, Michael *et al.* The peripheral cannabinoid receptor: adenylate cyclase inhibition and G protein coupling. **FEBS Letters**. [S.l.]. v. 375, n. 1–2, p. 143–147, 1995. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1016/0014-5793%2895%2901207-U>. Acesso em: 20 jun. 2024.

BEN-SHABAT, Shimon *et al.* New cannabidiol derivatives: Synthesis, binding to cannabinoid receptor, and evaluation of their antiinflammatory activity. **Journal of Medicinal Chemistry**. [S.l.]. v. 49, n. 3, p. 1113–1117, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jm050709m>. Acesso em: 10 jun. 2024.

BINDER, Devin K.; NAGELHUS, Erlend A.; OTTERSEN, Ole Petter. Aquaporin-4 and epilepsy. **Glia**. [S.l.]. v. 60, n. 8, p. 1203–1214, 2012. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/glia.22317>. Acesso em: 6 jan. 2024.

BINDER, Devin K.; STEINHÄUSER, Christian. Astrocytes and Epilepsy. **Neurochemical Research**. [S. l.], v. 46, n. 10, p. 2687–2695, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.nurt.2010.08.002>. Acesso em: 11 jan. 2022.

BINDER, Devin K.; STEINHÄUSER, Christian. **Functional changes in astroglial cells in epilepsy**. [S.l.]. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/glia.20394>. Acesso em: 10 mar. 2020.

BISWAS, Sayan. Extraction of network information - Quality and quantity - From nodes of neuronal network. *In: , 2017. Proceedings - 2016 15th International Conference on Information Technology, ICIT 2016*: Institute of Electrical and Electronics Engineers Inc. India. 2017. p. 118–123. Disponível em: <https://doi.org/10.1109/ICIT.2016.42>. Acesso em: 10 mar. 2020.

BONSACK, Brooke *et al.* Brief overview: Protective roles of astrocyte-derived pentraxin-3 in blood-brain barrier integrity. **Brain Circulation**. [S.l.]. v. 5, n. 3, p. 145, 2019. Disponível em: [https://doi.org/10.4103/bc.bc\\_37\\_19](https://doi.org/10.4103/bc.bc_37_19). Acesso em: 10 mar. 2020.

BORDEY, Angélique; SONTHEIMER, Harald. Properties of human glial cells associated with epileptic seizure foci. *In: , 1998. Epilepsy Research*. [S.l.]. 1998. p. 286–303. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0920-1211\(98\)00059-X](https://doi.org/10.1016/S0920-1211(98)00059-X). Acesso em: 11 maio. 2020.

BORGONETTI, Vittoria *et al.* Investigation on the neuroprotective effect of a cannabidiol-enriched non-psychoactive Cannabis sativa L. extract in an in vitro model of excitotoxicity. **Fitoterapia**. [S.l.]. v. 163, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2022.105315>. Acesso em: 22 abr. 2023.

BRADLEY, Jenifer A. *et al.* In vitro screening for seizure liability using microelectrode

array technology. **Toxicological Sciences**. [S.l.]. v. 163, n. 1, p. 240–253, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy029>. Acesso em: 15 dez. 2022.

BRYSON, Alexander *et al.* Classification of antiseizure drugs in cultured neuronal networks using multielectrode arrays and unsupervised learning. **Epilepsia**. [S.l.]. v. 63, n. 7, p. 1693–1703, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/epi.17268>. Acesso em: 15 dez. 2023.

CAMPOS-RODRIGUEZ, Carolina *et al.* Enantiomeric N-substituted phthalimides with excitatory amino acids protect zebrafish larvae against PTZ-induced seizures. **European Journal of Pharmacology**. [S.l.]. v. 888, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173489>. Acesso em: 18 fev. 2024.

CAMPOS, Gonçalo *et al.* In vitro and in vivo experimental models employed in the discovery and development of antiepileptic drugs for pharmacoresistant epilepsy. **Elsevier B.V.** [S.l.]. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2018.07.008>. Acesso em: 20 mar. 2024.

ÇARÇAK, Nihan; ONAT, Filiz; SITNIKOVA, Evgenia. Astrocytes as a target for therapeutic strategies in epilepsy: current insights. **Frontiers in Molecular Neuroscience**. [S.l.]. v. 16, 2023. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2023.1183775/full>. Acesso em: 10 mar. 2024.

CHARKHKAR, H.; MEYYAPPAN, S.; MATVEEVA, E.; MOLL, J. R.; MCHAIL, D. G.; PEIXOTO, N.; CLIFF, R. O.; PANCRAZIO, J. J. Amyloid beta modulation of neuronal network activity in vitro. **Brain Research**. [S.l.]. v. 1629, p. 1–9, 2015.

CLARKE, Laura E.; BARRES, Ben A. Emerging roles of astrocytes in neural circuit development. **Nature Reviews Neuroscience**. [S.l.]. v. 14, n. 5, p. 311–321, 2013. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1422-0067/18/8/1669>. Acesso em: 10 mar. 2020.

COPE, David W. *et al.* Enhanced tonic GABA A inhibition in typical absence epilepsy. **Nature Medicine**. [S.l.]. v. 15, n. 12, p. 1392–1398, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nm.2058>. Acesso em: 15 dez. 2022.

CORRÊA, L. T. *et al.* Revisão Bibliográfica Sistemática – Sistema de Endocanabinoides Tendências de Uso na Farmacologia. **Brazilian Journal of Forensic Sciences, Medical Law and Bioethics**. Brasil. v. 9, n. 2, p. 146–167, 2020. Disponível em: <http://www.ipebj.com.br/forensicjournal/edicoes?volume=9&numero=2&artigo=373>. Acesso em: 7 mar. 2021.

COULTER, Douglas A.; EID, Tore. Astrocytic regulation of glutamate homeostasis in epilepsy. **Glia**. [S.l.]. v. 60, n. 8, p. 1215–1226, 2012. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/glia.22341>. Acesso em: 7 mar. 2020.

CUNHA, Jomar M. *et al.* Chronic Administration of Cannabidiol to Healthy Volunteers and Epileptic Patients. **Pharmacology**. [S.l.]. v. 21, n. 3, p. 175–185, 1980. Disponível em: <https://www.karger.com/Article/FullText/137430>. Acesso em: 9 mar. 2020.

D'AMORA, Marta *et al.* Zebrafish as an Innovative Tool for Epilepsy Modeling: State of the Art and Potential Future Directions. **Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)**. [S.l.]. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms24097702>. Acesso em: 5 jul. 2024.

DATWYLER, Shannon L.; WEIBLEN, George D. Genetic Variation in Hemp and Marijuana ( *Cannabis sativa* L.) According to Amplified Fragment Length Polymorphisms \*. **Journal of Forensic Sciences**. [S.l.]. v. 51, n. 2, p. 371–375, 2006. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1556-4029.2006.00061.x>. Acesso em: 5 fev. 2022.

DE ABREU, M. S. *et al.* Zebrafish as a Model of Neurodevelopmental Disorders. **Neuroscience**. [S.l.]. v. 445, n. September, p. 3–11, out. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.08.034>. Acesso em: 5 jul. 2024.

DE CARO, Carmen *et al.* The potential role of cannabinoids in epilepsy treatment. **Expert Review of Neurotherapeutics**. [S.l.]. v. 17, n. 11, p. 1069–1079, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14737175.2017.1373019>. Acesso em: 5 fev. 2022.

DE LANEROLLE, Nihal C.; LEE, Tih-Shih; SPENCER, Dennis D. Astrocytes and Epilepsy. **Neurotherapeutics**. [S.l.]. v. 7, n. 4, p. 424–438, 2010. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1878747923002118>. Acesso em: 10 mar. 2020.

DESHPANDE, Laxmikant S. *et al.* In vitro status epilepticus but not spontaneous recurrent seizures cause cell death in cultured hippocampal neurons. **Epilepsy Research**. [S.l.]. v. 75, n. 2–3, p. 171–179, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.eplesyres.2007.05.011>. Acesso em: 21 jul. 2023.

DEVINSKY, Orrin *et al.* Cannabidiol in patients with treatment-resistant epilepsy: an open-label interventional trial. **The Lancet Neurology**. [S.l.]. v. 15, n. 3, p. 270–278, 2016. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)00379-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00379-8). Acesso em: 5 fev. 2022.

DEVINSKY, Orrin *et al.* Epilepsy. **Nature Reviews Disease Primers**. [S.l.]. v. 4, n. 1, p. 18024, 2018. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nrdp201824>. Acesso em: 10 mar. 2020.

DEVINSKY, Orrin *et al.* Glia and epilepsy: excitability and inflammation. **Trends in Neurosciences**. [S.l.]. v. 36, n. 3, p. 174–184, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2012.11.008>. Acesso em: 10 mar. 2020.

DEVINSKY, Orrin *et al.* Trial of Cannabidiol for Drug-Resistant Seizures in the Dravet Syndrome. **New England Journal of Medicine**. [S.l.]. v. 376, n. 21, p. 2011–2020, 2017. Disponível em: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1611618>. Acesso em: 10 mar. 2020.

DUDEK, F. Edward; STALEY, Kevin J. Circuit mechanisms of acquired epileptogenesis. **Epilepsia**. [S.l.]. v. 51, n. SUPPL. 5, p. 38–38, 2010. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1528-1167.2010.02824.x>. Acesso em: 10 mar. 2020.

ECHEVERRY, Carolina *et al.* A Comparative In Vitro Study of the Neuroprotective

Effect Induced by Cannabidiol, Cannabigerol, and Their Respective Acid Forms: Relevance of the 5-HT<sub>1A</sub> Receptors. **Neurotoxicity Research**. [S.l.]. v. 39, n. 2, p. 335–348, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12640-020-00277-y>. Acesso em: 5 fev. 2022.

EID, Tore *et al.* Astrocytes and Glutamine Synthetase in Epileptogenesis. **Journal of Neuroscience Research**. [S.l.]. v. 97, n. 11, p. 1345–1362, 2019. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jnr.24267>. Acesso em: 14 mar. 2020.

EID, T. *et al.* Loss of glutamine synthetase in the human epileptogenic hippocampus: Possible mechanism for raised extracellular glutamate in mesial temporal lobe epilepsy. **Lancet**. [S.l.]. v. 363, n. 9402, p. 28–37, 2004. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)15166-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)15166-5). Acesso em: 14 mar. 2020.

FAN, Jingsong *et al.* Assessing seizure liability using multi-electrode arrays (MEA). **Toxicology in Vitro**. [S.l.]. v. 55, p. 93–100, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.12.001>. Acesso em: 11 dez. 2022.

FERRES, E. *et al.* Large-scale, high-resolution electrophysiological imaging of field potentials in brain slices with microelectronic multielectrode arrays. **Frontiers in Neural Circuits**. [S.l.]. n. NOV, p. 1–14, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fncir.2012.00080>. Acesso em: 12 dez. 2022.

FRAGUAS-SÁNCHEZ, Ana Isabel; TORRES-SUÁREZ, Ana Isabel. Medical Use of Cannabinoids. **Drugs**. [S.l.]. v. 78, n. 16, p. 1665–1703, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40265-018-0996-1>. Acesso em: 6 fev. 2022.

FRANCO, Valentina; PERUCCA, Emilio. Pharmacological and Therapeutic Properties of Cannabidiol for Epilepsy. **Springer International Publishing**. [S.l.]. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40265-019-01171-4>. Acesso em: 6 fev. 2022.

FRIDE, Ester *et al.* (+)-Cannabidiol analogues which bind cannabinoid receptors but exert peripheral activity only. **European Journal of Pharmacology**. [S.l.]. v. 506, n. 2, p. 179–188, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.10.049>. Acesso em: 6 fev. 2022.

FRIEDMAN, Alon; KAUFER, Daniela; HEINEMANN, Uwe. Blood-brain barrier breakdown-inducing astrocytic transformation: Novel targets for the prevention of epilepsy. **Epilepsy Research**. [S.l.]. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.eplesyres.2009.03.005>. Acesso em: 9 mar. 2023.

GEISLER, Maren; FAISSNER, Andreas. A new indirect co-culture set up of mouse hippocampal neurons and cortical astrocytes on microelectrode arrays. **Journal of Neuroscience Methods**. [S.l.]. v. 204, n. 2, p. 262–272, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.JNEUMETH.2011.11.030>. Acesso em: 12 jan. 2023.

GIACOPPO, Sabrina *et al.* Cannabinoids: New Promising Agents in the Treatment of Neurological Diseases. **Molecules**. [S.l.]. v. 19, n. 11, p. 18781–18816, 2014. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1420-3049/19/11/18781>. Acesso em: 5 jan. 2022.

GIULIANO, Claudio *et al.* Neuroprotective and symptomatic effects of cannabidiol in

an animal model of parkinson's disease. **International Journal of Molecular Sciences**. [S.l.]. v. 22, n. 16, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms22168920>. Acesso em: 5 jan. 2022.

GOISIS, Rosa Chiara *et al.* GABA tonic currents and glial cells are altered during epileptogenesis in a mouse model of Dravet syndrome. **Frontiers in Cellular Neuroscience**. [S.l.]. v. 16, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fncel.2022.919493>. Acesso em: 25 mar. 2023.

GOMES, Felipe V. *et al.* Decreased glial reactivity could be involved in the antipsychotic-like effect of cannabidiol. **Schizophrenia Research**. [S.l.]. v. 164, n. 1–3, p. 155–163, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.schres.2015.01.015>. Acesso em: 5 jan. 2022.

GOMES, Flávia Carvalho Alcantara; TORTELLI, Vanessa Pereira; DINIZ, Luan. Glia: dos velhos conceitos às novas funções de hoje e as que ainda virão. **Estudos Avançados**. Brasil. v. 27, n. 77, p. 61–84, 2013. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-40142013000100006&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-40142013000100006&lng=pt&tlng=pt). Acesso em: 18 mar. 2020.

GORSHKOV, Kirill *et al.* Astrocytes as targets for drug discovery. **Drug Discovery Today**. [S.l.]. v. 23, n. 3, p. 673–680, 2018. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359644617304725>. Acesso em: 20 mar. 2020.

GOSHI, Noah *et al.* A primary neural cell culture model to study neuron, astrocyte, and microglia interactions in neuroinflammation. **Journal of Neuroinflammation**. [S.l.]. v. 17, n. 1, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01819-z>. Acesso em: 20 mar. 2020.

GREEN, Jennifer Leigh; DOS SANTOS, Wagner Ferreira; FONTANA, Andréia Cristina Karklin. Role of glutamate excitotoxicity and glutamate transporter EAAT2 in epilepsy: Opportunities for novel therapeutics development. **Elsevier Inc**. [S.l.]. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114786>. Acesso em: 12 nov. 2020.

GRONE, Brian P.; BARABAN, Scott C. Animal models in epilepsy research: Legacies and new directions. **Nature Publishing Group**. [S.l.]. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nn.3934>. Acesso em: 15 jul. 2024.

HALES, Chadwick M.; ROLSTON, John D.; POTTER, Steve M. How to culture, record and stimulate neuronal networks on micro-electrode arrays (MEAs). **Journal of Visualized Experiments**. [S.l.]. n. 39, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.3791/2056>. Acesso em: 15 jul. 2024.

HAMILTON, Franz *et al.* Real-time tracking of neuronal network structure using data assimilation. **Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics**. [S.l.]. v. 88, n. 5, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.88.052715>. Acesso em: 10 mar. 2024.

HEINEMANN, Uwe; KAUFER, Daniela; FRIEDMAN, Alon. Blood-brain barrier dysfunction, TGF $\beta$  signaling, and astrocyte dysfunction in epilepsy. **GLIA**. [S.l.]. v.

60, n. 8, p. 1251–1257, 2012. Disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/glia.22311>. Acesso em: 13 jun. 2022.

HEITHOFF, Benjamin P. *et al.* Astrocytes are necessary for blood–brain barrier maintenance in the adult mouse brain. **GLIA**. [S.l.]. v. 69, n. 2, p. 436–472, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/glia.23908>. Acesso em: 1 jun. 2022.

HOSSEINZADEH, Mahshid *et al.* Cannabidiol Post-Treatment Alleviates Rat Epileptic-Related Behaviors and Activates Hippocampal Cell Autophagy Pathway Along with Antioxidant Defense in Chronic Phase of Pilocarpine-Induced Seizure. **Journal of Molecular Neuroscience**. [S.l.]. v. 58, n. 4, p. 432–440, 2016. Disponível em: <https://doi.org/> Acesso em: 7 maio. 2022.

HU, Qingting *et al.* Efficacy and safety of antiepileptic drugs for refractory partial-onset epilepsy: a network meta-analysis. **Journal of Neurology**. [S.l.]. v. 265, n. 1, p. 1–11, 2018. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00415-017-8621-x>. Acesso em: 11 mar. 2022.

HUBBARD, Jacqueline A. *et al.* Regulation of astrocyte glutamate transporter-1 (GLT1) and aquaporin-4 (AQP4) expression in a model of epilepsy. **Experimental Neurology**. [S.l.]. v. 283, p. 85–96, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2016.05.003>. Acesso em: 1 mar. 2022.

HUIZENGA, Megan N.; SEPULVEDA-RODRIGUEZ, Alberto; FORCELLI, Patrick A. Preclinical safety and efficacy of cannabidivarin for early life seizures. **Neuropharmacology**. [S.l.]. v. 148, p. 189–198, 2019. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0028390818306786>. Acesso em: 17 dez. 2021.

IBEAS BIH, Clementino *et al.* Molecular Targets of Cannabidiol in Neurological Disorders. **Springer New York LLC**. New York. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13311-015-0377-3>. Acesso em: 2 fev. 2022.

IBORK, Hind *et al.* Effect of Cannabidiol in LPS-Induced Toxicity in Astrocytes: Possible Role for Cannabinoid Type-1 Receptors. **Neurotoxicity Research**. [S.l.]. v. 41, n. 6, p. 615–626, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12640-023-00671-2> Acesso em: 7 maio. 2024.

ILAE. **Methodology for Classification and Definition of Epilepsy Syndromes: Report of the ILAE Task Force on Nosology and Definitions**. Estados Unidos. Disponível em: <https://www.ilae.org/files/dmfile/Syndrome-MethodologyFINALMARCH29.pdf>, 2022. Acesso em: 10 maio. 2024.

ISEGER, Tabitha A.; BOSSONG, Matthijs G. A systematic review of the antipsychotic properties of cannabidiol in humans. **Schizophrenia Research**. [S.l.]. v. 162, n. 1–3, p. 153–161, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.schres.2015.01.033>. Acesso em: 24 maio. 2022.

JONES, Nicholas A. *et al.* Cannabidiol displays antiepileptiform and antiseizure properties in vitro and in vivo. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. [S.l.]. v. 332, n. 2, p. 569–577, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1124/jpet.109.159145>. Acesso em: 24 maio. 2022.

- JONES, Nicholas A. *et al.* Cannabidiol exerts anti-convulsant effects in animal models of temporal lobe and partial seizures. **Seizure**. [S.l.]. v. 21, n. 5, p. 344–352, 2012. Disponível em: [10.1016/j.seizure.2012.03.001](https://doi.org/10.1016/j.seizure.2012.03.001). Acesso em: 24 maio. 2022.
- JURIČ, Damijana Mojca *et al.* Cytotoxic Effects of Cannabidiol on Neonatal Rat Cortical Neurons and Astrocytes: Potential Danger to Brain Development. **Toxins**. [S.l.]. v. 14, n. 10, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxins14100720>. Acesso em: 4 dez. 2022.
- KANDRATAVICIUS, Ludmyla *et al.* Animal models of epilepsy: Use and limitations. **Dove Medical Press Ltd**. [S.l.]. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/NDT.S50371>. Acesso em: 11 jun. 2024.
- KANG, Tae Cheon *et al.* Epileptogenic roles of astroglial death and regeneration in the dentate gyrus of experimental temporal lobe epilepsy. **GLIA**. [S.l.]. v. 54, n. 4, p. 258–271, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/glia.20380>. Acesso em: 3 jun. 2021.
- KARKI, Pratap *et al.* Arundic Acid Increases Expression and Function of Astrocytic Glutamate Transporter EAAT1 Via the ERK, Akt, and NF-κB Pathways. **Molecular Neurobiology**. [S.l.]. v. 55, n. 6, p. 5031–5046, 2018. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s12035-017-0709-x>. Acesso em: 5 mar. 2020.
- KASATKINA, Ludmila A. 4-Aminopyridine sequesters intracellular Ca<sup>2+</sup> which triggers exocytosis in excitable and non-excitable cells. **Scientific Reports**. [S.l.]. v. 6, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep34749>. Acesso em: 16 mar. 2022.
- KIM, Jungnam *et al.* In vitro studies on therapeutic effects of cannabidiol in neural cells: Neurons, glia, and neural stem cells. **MDPI**. [S.l.]. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules26196077>. Acesso em: 14 mar. 2022.
- KIM, Jungnam *et al.* Promoting effects of cannabidiol on neurite growth and neuronal development in neuron-astrocyte sandwich coculture. **Bulletin of the Korean Chemical Society**. [S.l.]. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/bkcs.12795>. Acesso em: 25 mar. 2024.
- KIM, Jungnam; YANG, Seoin; CHOI, Insung S. Neutralization of Cannabidiol Neurotoxicity in Neuron-Astrocyte Sandwich Coculture. **Advanced Biology**. [S.l.]. v. 7, n. 10, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/adbi.202300090>. Acesso em: 25 mar. 2024.
- KIMELBERG, Harold K.; NEDERGAARD, Maiken. Functions of Astrocytes and their Potential As Therapeutic Targets. **Neurotherapeutics**. [S.l.]. v. 7, n. 4, p. 338–353, 2010. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S187874792300209X>. Acesso em: 25 mar. 2024.
- KINBOSHI, Masato; IKEDA, Akio; OHNO, Yukihiro. Role of Astrocytic Inwardly Rectifying Potassium (Kir) 4.1 Channels in Epileptogenesis. **Frontiers Media S.A.** [S.l.]. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.626658>. Acesso em: 11 fev. 2021.

KOLLIPARA, Roshni *et al.* Phytocannabinoids Reduce Seizures in Larval Zebrafish and Affect Endocannabinoid Gene Expression. **Biomolecules**. [S.l.]. v. 13, n. 9, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biom13091398>. Acesso em: 25 mar. 2024.

KOZELA, Ewa; JUKNAT, Ana; VOGEL, Zvi. Modulation of astrocyte activity by cannabidiol, a nonpsychoactive cannabinoid. **MDPI AG**. [S.l.]. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms18081669>. Acesso em: 11 fev. 2021.

LAPRAIRIE, Robert B.; BAGHER, Amina M.; DENOVAN-WRIGHT, Eileen M. Cannabinoid receptor ligand bias: implications in the central nervous system. **Current Opinion in Pharmacology**. [S.l.]. v. 32, p. 32–43, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coph.2016.10.005>. Acesso em: 10 set. 2023.

LEE, Darrin J. *et al.* Decreased expression of the glial water channel aquaporin-4 in the intrahippocampal kainic acid model of epileptogenesis. **Experimental Neurology**. [S.l.]. v. 235, n. 1, p. 246–255, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.02.002>. Acesso em: 11 fev. 2021.

LEO, Antonio; RUSSO, Emilio; ELIA, Maurizio. Cannabidiol and epilepsy: Rationale and therapeutic potential. **Academic Press**. [S.l.]. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.03.005>. Acesso em: 24 fev. 2022.

LI, Han *et al.* Overview of cannabidiol (CBD) and its analogues: Structures, biological activities, and neuroprotective mechanisms in epilepsy and Alzheimer's disease. **Elsevier Masson SAS**. [S.l.]. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112163>. Acesso em: 24 fev. 2022.

LIMA, Isabel Vieira de Assis *et al.* Cannabidiol anticonvulsant effect is mediated by the PI3K $\gamma$  pathway. **Neuropharmacology**. [S.l.]. v. 176, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.108156>. Acesso em: 24 fev. 2022.

MACKIE, Ken. Cannabinoid receptors: Where they are and what they do. *In:* , 2008. **Journal of Neuroendocrinology**. [S.l.]. 2008. p. 10–14. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2008.01671.x>. Acesso em: 26 fev. 2022.

MAHMOUD, Shaimaa *et al.* Astrocytes Maintain Glutamate Homeostasis in the CNS by Controlling the Balance between Glutamate Uptake and Release. **Cells**. [S.l.]. v. 8, n. 2, p. 184, 2019. Disponível em: <http://www.mdpi.com/2073-4409/8/2/184>. Acesso em: 27 mar. 2020.

MALASPINA, P. *et al.* Succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency (SSADHD): Pathophysiological complexity and multifactorial trait associations in a rare monogenic disorder of GABA metabolism. **Elsevier Ltd**. [S.l.]. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2016.06.009>. Acesso em: 2 mar. 2024.

MALERBA, Marina de Souza. **Participação de canais iônicos na transdução do sinal osmótico em astrócitos hipotalâmicos em cultura**. Alfenas. 2019. Dissertação de mestrado em biociências aplicada a saúde. 62 f. - Universidade Federal de Alfenas, 2019.

MARTINEZ, Bridget; PELOW, PhilipV. MicroRNAs as potential biomarkers in temporal lobe epilepsy and mesial temporal lobe epilepsy. **Neural Regeneration**

**Research.** [S.l.]. v. 18, n. 4, p. 716, 2023. Disponível em:

<https://journals.lww.com/10.4103/1673-5374.354510>. Acesso em: 2 mar. 2024.

MATTSON, Mark P. *et al.* Chapter 10 Calcium, **Free Radicals, and Excitotoxic Neuronal Death in Primary Cell Culture.** [S.l.]. 1995. p. 187–216. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091679X08619305>. Acesso em: 10 jan. 2021.

MCCREADY, Fraser P. *et al.* Multielectrode Arrays for Functional Phenotyping of Neurons from Induced Pluripotent Stem Cell Models of Neurodevelopmental Disorders. **MDPI.** [S.l.]. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biology11020316>. Acesso em: 21 jan. 2023.

MECHOULAM, R.; CARLINI, E. A. Toward drugs derived from cannabis. **Naturwissenschaften.** [S.l.]. v. 65, n. 4, p. 174–179, 1978. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/BF00450585>. Acesso em: 10 jan. 2021.

MIGUEL SANZ, Claudia *et al.* Toward the use of novel alternative methods in epilepsy modeling and drug discovery. **Frontiers Media SA.** [S.l.]. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fneur.2023.1213969>. Acesso em: 5 jun. 2024.

MIRANDA, Cláudia C. *et al.* hiPSC-Based Model of Prenatal Exposure to Cannabinoids: Effect on Neuronal Differentiation. **Frontiers in Molecular Neuroscience.** [S.l.]. v. 13, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.00119>. Acesso em: 5 jun. 2024.

MOCHOL, Monika *et al.* Serum Markers of Neuronal Damage and Astrocyte Activity in Patients with Chronic Epilepsy: Elevated Levels of Glial Fibrillary Acidic Protein. **Acta Neurologica Scandinavica.** [S.l.]. v. 2023, p. 1–5, 2023. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/ans/2023/7246373/>. Acesso em: 5 jun. 2024.

MONORY, Krisztina *et al.* The Endocannabinoid System Controls Key Epileptogenic Circuits in the Hippocampus. **Neuron.** [S.l.]. v. 51, n. 4, p. 455–466, 2006. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627306005460>. Acesso em: 5 jun. 2024.

MURPHY-ROYAL, Ciaran *et al.* Astroglial glutamate transporters in the brain: Regulating neurotransmitter homeostasis and synaptic transmission. **Journal of Neuroscience Research.** [S.l.]. v. 95, n. 11, p. 2140–2151, 2017. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/jnr.24029>. Acesso em: 5 jun. 2024.

MUSA, Ibrahim *et al.* Effects of oil palm tocotrienol rich fraction on the viability and morphology of astrocytes injured with glutamate. **Food Bioscience.** [S.l.]. v. 20, p. 168–177, 2017. Disponível em: <https://doi.org/> Acesso em: 9 jun. 2024.

NEVES, Juliana Dalibor; MESTRINER, Regis Gemerasca; NETTO, Carlos Alexandre. Astrocytes in the cerebral cortex play a role in the spontaneous motor recovery following experimental striatal hemorrhage. **Wolters Kluwer Medknow Publications.** [S.l.]. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.4103/1673-5374.224372>. Acesso em: 14 jun. 2022.

NORABERG, Jens *et al.* Organotypic Hippocampal Slice Cultures for Studies of Brain Damage. **Neuroprotection and NeurorepairCurrent Drug Targets-CNS &**

**Neurological Disorders.** [S.l.]. 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih>. Acesso em: 14 jun. 2022.

NOTENBOOM, Robbert G.E. *et al.* Up-regulation of hippocampal metabotropic glutamate receptor 5 in temporal lobe epilepsy patients. **Brain.** [S.l.]. v. 129, n. 1, p. 96–107, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/brain/awh673>. Acesso em: 14 jun. 2022.

OBAY, Basra Deniz *et al.* Antiepileptic effects of ghrelin on pentylentetrazole-induced seizures in rats. **Peptides.** [S.l.]. v. 28, n. 6, p. 1214–1219, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2007.04.003>. Acesso em: 25 jun. 2022.

OBLASOV, Ilya *et al.* Cell culture models for epilepsy research and treatment. **Open Exploration Publishing Inc.** [S.l.]. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.37349/emed.2024.00206>. Acesso em: 7 ago. 2024.

OHMURA, Yoshiyuki; KUNIYOSHI, Yasuo. A translational model to determine rodent's age from human foetal age. **Scientific Reports.** [S.l.]. v. 7, n. 1, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17571-z>. Acesso em: 7 ago. 2024.

ONAIWI, E. S *et al.* Discovery of the Presence and Functional Expression of Cannabinoid CB2 Receptors in Brain. **Annals of the New York Academy of Sciences.** New York. v. 1074, n. 1, p. 514–536, 2006. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1196/annals.1369.052>. Acesso em: 3 mar. 2020.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Epilepsia.** 2024. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy>. Acesso em: 10 jul. 2024.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Intersectoral Global Action Plan Epilepsy and Other Neurological Disorders 2022-2031.** 2022. Disponível em: [https://cdn.who.int/media/docs/default-source/brain-health/first-draft-action-plan-on-epilepsy-and-other-neurological-disorders\\_180621\\_en.pdf?sfvrsn=16474e26\\_24&download=true](https://cdn.who.int/media/docs/default-source/brain-health/first-draft-action-plan-on-epilepsy-and-other-neurological-disorders_180621_en.pdf?sfvrsn=16474e26_24&download=true). Acesso em: 10 jul. 2024.

PAJARILLO, Edward *et al.* The role of astrocytic glutamate transporters GLT-1 and GLAST in neurological disorders: Potential targets for neurotherapeutics. **Neuropharmacology.** [S.l.]. v. 161, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.03.002>. Acesso em: 2 mar. 2020.

PAVLOV, Ivan; WALKER, Matthew C. Tonic GABAA receptor-mediated signalling in temporal lobe epilepsy. **Neuropharmacology.** [S.l.]. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.04.003>. Acesso em: 2 mar. 2020.

PEKKNY, Milos *et al.* Astrocytes: a central element in neurological diseases. **Acta Neuropathologica.** [S.l.]. v. 131, n. 3, p. 323–345, 2016. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00401-015-1513-1>. Acesso em: 2 mar. 2020.

PETERSON, Allison R.; BINDER, Devin K. Astrocyte Glutamate Uptake and Signaling as Novel Targets for Antiepileptogenic Therapy. **Frontiers Media S.A.** [S.l.]. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.01006>. Acesso em:

10 mar. 2022.

PETR, G. T. *et al.* Conditional Deletion of the Glutamate Transporter GLT-1 Reveals That Astrocytic GLT-1 Protects against Fatal Epilepsy While Neuronal GLT-1 Contributes Significantly to Glutamate Uptake into Synaptosomes. **Journal of Neuroscience**. [S.l.]. v. 35, n. 13, p. 5187–5201, 2015. Disponível em: <https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.4255-14.2015>. Acesso em: 2 mar. 2020.

PITKÄNEN, Asla *et al.* Epileptogenesis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**. [S.l.]. Cambridge, v. 5, n. 10, p. a022822, 2015. Disponível em: [https://www.cambridge.org/core/product/identifier/CBO9781107415324A009/type/book\\_part](https://www.cambridge.org/core/product/identifier/CBO9781107415324A009/type/book_part). Acesso em: 2 mar. 2020.

PORTER, Brenda E.; JACOBSON, Catherine. Report of a parent survey of cannabidiol-enriched cannabis use in pediatric treatment-resistant epilepsy. **Epilepsy & Behavior**. [S.l.]. v. 29, n. 3, p. 574–577, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yebeh.2013.08.037>. Acesso em: 2 mar. 2020.

RAOL, Yogendra H.; BROOKS-KAYAL, Amy R. Experimental Models of Seizures and Epilepsies. *In*: Progress In Molecular Biology And Translational Science. **Elsevier B.V.** [S.l.]. 2012. v. 105, p. 57–82. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123945969000032>. Acesso em: 3 mar. 2020.

REN, Tianjing *et al.* Piperine-loaded nanoparticles with enhanced dissolution and oral bioavailability for epilepsy control. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. [S.l.]. v. 137, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2019.104988>. Acesso em: 3 mar. 2020.

RIBEIRO, O. M. R. *et al.* O peixe-zebra (*Danio rerio*) como modelo emergente na ecotoxicologia. **Revista de Ciência Elementar**. Brasil. v. 10, n. 2, 30 jun. 2022. Disponível em: <http://rce.casadasciencias.org/art/2022/021>. Acesso em: 10 mar. 2024.

ROBEL, Stefanie. Astroglial scarring and seizures: A cell biological perspective on epilepsy. **SAGE Publications Inc.** [S.l.]. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/1073858416645498>. Acesso em: 10 mar. 2024.

ROLSTON, John D. *et al.* Electrical Stimulation for Epilepsy: Experimental Approaches. **Neurosurgery Clinics of North America**. [S.l.]. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.nec.2011.07.010>. Acesso em: 16 out. 2023.

ROMARIZ, Simone A.A. *et al.* High Concentrations of Cannabidiol Induce Neurotoxicity in Neurosphere Culture System. **Neurotoxicity Research**. [S.l.]. v. 42, n. 1, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12640-024-00692-5>. Acesso em: 10 jul. 2024.

RUBIO, Carmen *et al.* In Vivo Experimental Models of Epilepsy. **Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry**. [S.l.]. v. 10, n. 4, p. 298–309, 2010. Disponível em: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1871->

5249&volume=10&issue=4&spage=298. Acesso em: 10 jul. 2024.

SAITO, Viviane M.; WOTJAK, Carsten T.; MOREIRA, Fabrício A. Exploração farmacológica do sistema endocanabinoide: novas perspectivas para o tratamento de transtornos de ansiedade e depressão?. **Revista Brasileira de Psiquiatria**. Brasil. v. 32, n. suppl 1, p. 57–514, 2010. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-44462010000500004&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-44462010000500004&lng=pt&tlng=pt). Acesso em: 2 mar. 2020.

SAMARUT, Éric *et al.* Single and synergistic effects of cannabidiol and  $\delta$ -9-tetrahydrocannabinol on zebrafish models of neuro-hyperactivity. **Frontiers in Pharmacology**. [S.l.]. v. 10, n. mar, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00226>. Acesso em: 2 mar. 2020.

SANTOS, Camila Leite. **Caracterização morfofuncional de culturas de astrócitos hipotalâmicos durante o envelhecimento**. Brasil. Tese de doutorado. 2017. 93 f. Universidade Federal do Rio grande do sul, 2017.

SARAC, SINAN *et al.* Excitatory amino acid transporters EAAT-1 and EAAT-2 in temporal lobe and hippocampus in intractable temporal lobe epilepsy. **APMIS**. [S.l.]. v. 117, n. 4, p. 291–301, 2009. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0463.2009.02443.x>. Acesso em: 2 mar. 2020.

SCHRÖDER, Wolfgang *et al.* Functional and Molecular Properties of Human Astrocytes in Acute Hippocampal Slices Obtained from Patients with Temporal Lobe Epilepsy. **Epilepsia**. [S.l.]. v. 41, n. s6, 2000. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1528-1157.2000.tb01578.x>. Acesso em: 16 mar. 2020.

SICKLE, Marja D. Van *et al.* Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. **American Association for the Advancement of Science**. [S.l.]. v. 310, n. 5746, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1115740>. Acesso em: 16 mar. 2020.

SILVA-CARDOSO, Gleice K. *et al.* Cannabidiol modulates chronic neuropathic pain aversion behavior by attenuation of neuroinflammation markers and neuronal activity in the corticolimbic circuit in male Wistar rats. **Behavioural Brain Research**. [S.l.]. v. 452, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2023.114588>. Acesso em: 10 jul. 2024.

SILVA, Alexandre Valotta da; CABRAL, Francisco Romero. Ictogênese, epileptogênese e mecanismo de ação das drogas na profilaxia e tratamento da epilepsia. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**. [S.l.]. v. 14, n. SUPPL. 2, p. 39–45, 2008. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1676-26492008000600007&lng=pt&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-26492008000600007&lng=pt&nrm=iso&tlng=en). Acesso em: 10 jul. 2024.

ŞIRINYILDIZ, Ferhat; EK, Rauf Onur. Effects of Melatonin at Different Doses on Experimental Epilepsy Model Induced By Pentylentetrazole. **Meandros Medical and Dental Journal**. [S.l.]. v. 22, n. 2, p. 177–186, 2021. Disponível em: [http://cms.galenos.com.tr/Uploads/Article\\_47400/MMDJ-22-177-En.pdf](http://cms.galenos.com.tr/Uploads/Article_47400/MMDJ-22-177-En.pdf). Acesso em: 14 fev. 2022.

SKYTT, Dorte M. *et al.* siRNA knock down of glutamate dehydrogenase in astrocytes affects glutamate metabolism leading to extensive accumulation of the neuroactive amino acids glutamate and aspartate. **Neurochemistry International**. [S.l.]. v. 61, n. 4, p. 490–497, 2012. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0197018612001453>. Acesso em: 14 fev. 2022.

SOFRONIEW, Michael V. Astrocyte Reactivity: Subtypes, States, and Functions in CNS Innate Immunity. **Trends in Immunology**. [S.l.]. v. 41, n. 9, p. 758–770, 2020.

Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471490620301538>. Acesso em: 14 fev. 2022.

SOFRONIEW, Michael V. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. **Trends in Neurosciences**. [S.l.]. v. 32, n. 12, p. 638–647, 2009.

Disponível em: [https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/69988/FT\\_69988.html](https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/69988/FT_69988.html). Acesso em: 14 fev. 2022.

STEIGER, Bettina K.; JOKEIT, Hennric. Why epilepsy challenges social life. **Seizure**. [S.l.]. v. 44, p. 194–198, 2017. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.seizure.2016.09.008>. Acesso em: 16 mar. 2020.

STOTT, Colin G. *et al.* The Proposed Multimodal Mechanism of Action of Cannabidiol (CBD) in Epilepsy: Modulation of Intracellular Calcium and Adenosine-mediated Signalling. **Epilepsy & Behavior**. [S.l.]. v. 101, p. 106734, 2019. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1525505019309345>. Acesso em: 14 fev. 2022.

SUN, David A; SOMBATI, Sompong; DELORENZO, Robert J. Glutamate Injury-Induced Epileptogenesis in Hippocampal Neurons An In Vitro Model of Stroke-Induced “Epilepsy”. **Stroke**. [S.l.]. 2001. Disponível em: <http://ahajournals.org>.

Acesso em: 16 mar. 2020.

TAGA, A.; DASTGHEYB, R.; HABELA, C.; JOSEPH, J.; RICHARD, J. P.; GROSS, S. K.; LAURIA, G.; LEE, G.; HAUGHEY, N.; MARAGAKIS, N. J. Role of Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Spinal Cord Astrocytes in the Functional Maturation of Motor Neurons in a Multielectrode Array System. **Stem Cells Translational Medicine**. [S.l.]. v. 8, n. 12, p. 1272–1285, 1 dez. 2019. Disponível em:

<https://doi.org/10.1002/sctm.19-0147>. Acesso em: 4 dez. 2022.

TASKIRAN, Mehmet; TAŞDEMİR, Abdulkadir. An involvement of COX and 5-LOX pathways in the penicillin- and pentylenetetrazole (PTZ)-induced epilepsy models. **Fundamental and Clinical Pharmacology**. [S.l.]. v. 37, n. 1, p. 85–93, 2023.

Disponível em: <https://doi.org/10.1111/fcp.12822>. Acesso em: 10 jul. 2024.

THORNTON, Cammi *et al.* Cannabis constituents reduce seizure behavior in chemically-induced and scn1a-mutant zebrafish. **Epilepsy and Behavior**. [S.l.]. v. 110, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2020.107152>. Acesso em:

10 jul. 2024.

TOMASELLO, Danielle L.; SIVE, Hazel. Noninvasive multielectrode array for brain and spinal cord local field potential recordings from live zebrafish larvae. **Zebrafish**. [S.l.]. v. 17, n. 4, p. 271–277, 2020. Disponível em:

<https://doi.org/10.1089/zeb.2020.1874>. Acesso em: 10 jul. 2024.

TORRES, C. Viteri. Epilepsia. **Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado**. [S.l.]. v. 11, n. 73, p. 4364–4373, 2015. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304541215000141>. Acesso em: 16 jul. 2020.

URIO, Obrey H. *et al.* Drug resistant epilepsy and associated factors among children with epilepsies in tanzania: a cross-sectional study. **BMC Neurology**. [S.l.]. v. 24, n. 1, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12883-023-03508-9>. Acesso em: 12 jun. 2024.

VEZZANI, Annamaria; BARAM, Tallie Z. New Roles for Interleukin-1 Beta in the Mechanisms of Epilepsy. **Epilepsy Currents**. [S.l.]. v. 7, n. 2, p. 45–50, 2007. Disponível em: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1111/j.1535-7511.2007.00165.x>. Acesso em: 6 maio. 2024.

WANG, Xiuli *et al.* An overview on synthetic and biological activities of cannabidiol (CBD) and its derivatives. **Academic Press Inc**. [S.l.]. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2023.106810>. Acesso em: 12 jun. 2024.

WANG, Keling *et al.* Embryonic exposure to ethanol increases the susceptibility of larval zebrafish to chemically induced seizures. **Scientific Reports**. [S.l.]. v. 8, n. 1, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20288-2>. Acesso em: 12 jun. 2024.

WERMUTH, Camille G. Similarity in drugs: reflections on analogue design. **Drug Discovery Today**. [S.l.]. 2006. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359644606000079>. Acesso em: 12 jun. 2024.

WITHERSPOON, Eric; QUINLAN, Sean; FORCELLI, Patrick A. Preclinical efficacy of cannabidiol for the treatment of early-life seizures. **Pharmacological Reports**. [S.l.]. v. 74, n. 5, p. 1092–1098, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s43440-022-00413-9>. Acesso em: 16 jun. 2023.

ZAVILEYSKIY, Lev G. *et al.* The Brain Protein Acylation System Responds to Seizures in the Rat Model of PTZ-Induced Epilepsy. **International Journal of Molecular Sciences**. [S.l.]. v. 23, n. 20, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms232012302>. Acesso em: 16 jun. 2023.

ZENG, Chunmei *et al.* Parvalbumin in the metabolic pathway of glutamate and  $\gamma$ -aminobutyric acid: Influence on expression of GAD65 and GAD67. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. [S.l.]. v. 734, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2022.109499>. Acesso em: 10 mar. 2024.

## ANEXOS

## ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL)

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
 Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG  
 Lei nº 11.154, de 29 de julho de 2005

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UNIFAL-MG

# Certificado

Certificamos que a proposta intitulada **Estudo da regulação do ciclo glutamato-glutamina hipocampal em modelos experimentais de epilepsia**, registrada com o nº **0004/2021**, sob a responsabilidade de **Marília Gabriella Alves Goulart Pereira**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de **pesquisa científica**, com vigência de **04/02/2021 a 03/02/2023**, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

| Espécie/linhagem/raça | Total de animais | Total de machos | Total de fêmeas | Origem   |
|-----------------------|------------------|-----------------|-----------------|--|
| Roedor / Wistar       | 144              | 72              | 72              | Biotério do laboratório de fisiologia e biotério central |
| Roedor / Rato wistar  | 12               | 3               | 9               | Biotério do laboratório de fisiologia e biotério central |

Alfenas, 03 de Agosto de 2021

**Prof(a). Dr(a). Pollyanna Francielli de Oliveira**

Coordenador(a) do CEUA/UNIFAL - MG

## ANEXO B - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UFMG)



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**CEUA**

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### **CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado "Efeitos de diferentes dosagens do Canabidiol (CBD) durante o desenvolvimento: uma análise da morfologia e mortalidade de neurônios no cérebro imaturo", protocolo do CEUA: 226/2022 sob a responsabilidade de Victor Rodrigues Santos 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) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 10/10/2022.

|                          |                            |
|--------------------------|----------------------------|
| Vigência da Autorização  | 10/10/2022 a 09/10/2027    |
| Finalidade               | Pesquisa                   |
| <b>*Espécie/linhagem</b> | Rato heterogênico / Wistar |
| Nº de animais            | 14                         |
| Peso/Idade               | 20g / 7(dias)              |
| Sexo                     | indiferente                |
| Origem                   | CEBIO                      |
| <b>*Espécie/linhagem</b> | Rato heterogênico / Wistar |
| Nº de animais            | 14                         |
| Peso/Idade               | 20g / 7(dias)              |
| Sexo                     | indiferente                |
| Origem                   | CEBIO                      |
| <b>*Espécie/linhagem</b> | Rato heterogênico / Wistar |
| Nº de animais            | 14                         |
| Peso/Idade               | 20g / 7(dias)              |
| Sexo                     | indiferente                |
| Origem                   | CEBIO                      |
| <b>*Espécie/linhagem</b> | Rato heterogênico / Wistar |
| Nº de animais            | 14                         |
| Peso/Idade               | 20g / 10(dias)             |
| Sexo                     | indiferente                |
| Origem                   | CEBIO                      |

|  |                            |
|--|----------------------------|
| <b>Dados dos animais agrupados (uso do biotério)</b> |                            |
| <b>*Espécie/linhagem</b>                             | Rato heterogênico / Wistar |
| Nº de animais  | 42                         |
| Idade  | 7(dias)                    |
| Sexo   | indiferente                |
| Origem   | CEBIO                      |
| <b>*Espécie/linhagem</b>                             | Rato heterogênico / Wistar |

|               |             |
|---------------|-------------|
| Nº de animais | 14          |
| Idade         | 10(dias)    |
| Sexo          | indiferente |
| Origem        | CEBIO       |

**Considerações posteriores:**

|            |   |
|------------|---|
| 10/10/2022 | Aprovado na reunião ordinária on-line do dia 10/10/2022. Validade: 10/10/2022 à 09/10/2027. |
|------------|---|

Belo Horizonte, 12/06/2023.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG  
[https://aplicativos.ufmg.br/solicite\\_ceua/](https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/)

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
Telefone: (31) 3409-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/ceua](http://www.ufmg.br/bioetica/ceua) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)

**ANEXO C - PARECER DO COMITÉ INSTITUCIONAL DE CUIDADO E USO ANIMAL  
(IACUC – GMU)**



**Office of Research Integrity and Assurance**

Research Hall, 4400 University Drive, MS 605, Fairfax, Virginia 22030  
Phone: 703-993-5445, Fax: 703-993-9590

DATE: October 26, 2021

TO: Nathalia Peixoto

FROM: George Mason University IACUC

PROJECT TITLE: [1794053-1] Experimental models of epilepsy

REFERENCE #: 0492

SUBMISSION TYPE: New Project

ACTION: APPROVED

APPROVAL DATE: October 26, 2021

EXPIRATION DATE: October 25, 2024

REVIEW TYPE: Designated Member Review

Thank you for your submission of New Project materials for this project. The George Mason University IACUC has APPROVED your submission. This submission has received Designated Member Review based on applicable federal regulations. All research must be conducted in accordance with this approved submission.

It is the responsibility of the Principal Investigator to notify the IACUC of any proposed changes regarding the work described within this protocol. The Principal Investigator agrees that no such changes will be implemented until approved by the IACUC, except where absolutely necessary to eliminate apparent immediate hazards to person(s) and/or animal(s).

All UNANTICIPATED PROBLEMS involving risks to subjects and SERIOUS and UNEXPECTED adverse events must be reported promptly to this office. Please use the appropriate reporting forms for this procedure. All FDA and sponsor reporting requirements should also be followed (if applicable).

All NON-COMPLIANCE issues or COMPLAINTS regarding this project must be reported promptly to ORIA.

To continue this research beyond the three year approval period, a new protocol submission is required. To avoid a lapse in IACUC approval, it is essential that the completed renewal protocol be submitted and approved by the IACUC prior to its expiration date.

Federal regulations do not permit the IACUC to extend any approval periods. Your documentation for renewal must be received with sufficient time for review and continued approval before the expiration date of October 25, 2024. You may not conduct any research beyond that date without GMU IACUC approval. Prior to the anniversary date, a reminder regarding renewal will be sent. It is the responsibility of the Principal Investigator for submitting all required documentation on time for review prior to the anniversary date.

## ANEXO D - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNICAMP)

CERTIFICADO CEUA nº 294/2023



### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Investigação dos efeitos do canabidiol e seus derivados sobre as crises epiléticas em modelo de zebrafish**, registrada com o nº **6375-1/2023**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Claudia Vianna Maurer Morelli e Viviane Fais, Milton Kennedy Aquino Júnior**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em reunião de **13/12/2023**.

|   |   |
|---|---|
| <b>Finalidade:</b>                                      | <input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica |
| <b>Vigência do projeto:</b>                             | 01/02/2024 a 30/06/2024   |
| <b>Vigência da autorização para manipulação animal:</b> | 13/12/2023 a 30/06/2024   |
| <b>Espécie / linhagem/ raça:</b>                        | Peixe** / Danio rerio   |
| <b>No. de animais:</b>                                  | 12  |
| <b>Idade/Peso:</b>                                      | 7.00 Dias / 1.00 Gramas   |
| <b>Sexo:</b>  | 12 Machos   |
| <b>Espécie / linhagem/ raça:</b>                        | Peixe** / Danio rerio   |
| <b>No. de animais:</b>                                  | 12  |
| <b>Idade/Peso:</b>                                      | 7.00 Dias / 1.00 Gramas   |
| <b>Sexo:</b>  | 12 Machos   |
| <b>Espécie / linhagem/ raça:</b>                        | Peixe** / Danio rerio   |
| <b>No. de animais:</b>                                  | 24  |
| <b>Idade/Peso:</b>                                      | 7.00 Dias / 1.00 Gramas   |
| <b>Sexo:</b>  | 24 Machos   |
| <b>Espécie / linhagem/ raça:</b>                        | Peixe** / Danio rerio   |
| <b>No. de animais:</b>                                  | 12  |
| <b>Idade/Peso:</b>                                      | 7.00 Dias / 1.00 Gramas   |
| <b>Sexo:</b>  | 12 Machos   |
| <b>Espécie / linhagem/ raça:</b>                        | Peixe** / Danio rerio   |
| <b>No. de animais:</b>                                  | 12  |
| <b>Idade/Peso:</b>                                      | 7.00 Dias / 1.00 Gramas   |
| <b>Sexo:</b>  | 12 Machos   |
| <b>Espécie / linhagem/ raça:</b>                        | Peixe** / Danio rerio   |
| <b>No. de animais:</b>                                  | 12  |



CERTIFICADO CEUA nº 294/2023

|   |  |
|---|--|
| <b>Idade/Peso:</b>                              | 7.00 Dias / 1.00 Gramas                              |
| <b>Sexo:</b>                                    | 55 Machos  |
| <b>Espécie / linhagem/ raça:</b>                | Peixe** / Danio rerio                                |
| <b>No. de animais:</b>                          | 55   |
| <b>Idade/Peso:</b>                              | 7.00 Dias / 1.00 Gramas                              |
| <b>Sexo:</b>                                    | 55 Machos  |
| <b>Espécie / linhagem/ raça:</b>                | Peixe** / Danio rerio                                |
| <b>No. de animais:</b>                          | 55   |
| <b>Idade/Peso:</b>                              | 7.00 Dias / 1.00 Gramas                              |
| <b>Sexo:</b>                                    | 55 Machos  |
| <b>Espécie / linhagem/ raça:</b>                | Peixe** / Danio rerio                                |
| <b>No. de animais:</b>                          | 55   |
| <b>Idade/Peso:</b>                              | 7.00 Dias / 1.00 Gramas                              |
| <b>Sexo:</b>                                    | 55 Machos  |
| <b>Origem:</b>                                  | Laboratório e Biotério Zebrafish                     |
| <b>Biotério onde serão mantidos os animais:</b> | Biotério do Laboratório de Zebrafish,<br>FCM/UNICAMP |

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização a junto ao **IBAMA, SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, **21 de dezembro de 2023**.

\_\_\_\_\_  
 Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud  
 Presidente da CEUA/Unicamp

\_\_\_\_\_  
 Eduardo Villaverde Haszler  
 Secretário Executivo

**IMPORTANTE!** Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.