

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA

GABRIEL SERVILHA MENEZES

**EFEITOS DO CANABIDIOL VEICULADO EM  
NANOEMULSÃO EM RATOS SUBMETIDOS AO  
MODELO QUÍMICO DE *STATUS EPILEPTICUS***

Ribeirão Preto  
2021

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA

GABRIEL SERVILHA MENEZES

**EFEITOS DO CANABIDIOL VEICULADO EM  
NANOEMULSÃO EM RATOS SUBMETIDOS AO  
MODELO QUÍMICO DE *STATUS EPILEPTICUS***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como pré-requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biomédicas, com Ênfase em Ciências Básicas da Saúde.

**Orientador:** Prof. Dr. Norberto Garcia Cairasco

**Coorientador:** Dr. Rui Milton Patrício da Silva Junior

Ribeirão Preto  
2021

Autorizo a reprodução e divulgação total deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

A inclusão deste trabalho foi aprovada pela Comissão Coordenadora do Curso em sua 57ª Sessão Ordinária, realizada em 04/10/2021.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente à minha família, especialmente aos meus pais, Luiz e Rosângela e meu irmão, Daniel, por todo o apoio e amor que recebi durante toda minha vida. Gostaria de agradecer também à Joyce C. Avelino, por sempre ter estado ao meu lado durante todos esses anos e por ter me apoiado em todos os momentos, mesmo nos mais difíceis. À minha tia, Rosimeire, por ter instigado minha curiosidade e meu desejo por conhecimento durante toda minha infância. E à minha avó, Olinda, por seu apoio incondicional e por ter sido um exemplo inigualável de bondade e empatia. Vocês moldaram quem sou, devo a vocês por todas minhas conquistas, passadas e vindouras.

Ao Professor Norberto Garcia Cairasco, pela oportunidade de ser seu aluno e ter desenvolvido esse trabalho e tantos outros sob sua orientação. Agradeço por ter contribuído tanto para minha formação, não somente acadêmica, mas também humana. E agradeço por todo o reconhecimento, companheirismo e amizade.

Ao meu coorientador, Rui Milton Patrício da Silva Júnior, agradeço por tudo que me ensinou, por todas as broncas que tomei, que me ajudaram tanto a prosperar e amadurecer, mas, principalmente, por sua amizade. Sem sua ajuda teria conquistado muito menos do que conquistei.

Ao técnico Flávio Del Vecchio (*Flavião!*), agradeço por todo o conhecimento que adquiri com você e por toda a ajuda que tive, sem você esse projeto não teria sido possível. Agradeço também pela amizade e por todos os papos, risos, histórias e ensinamentos que compartilhou comigo durante os ‘cafezinhos’.

Ao técnico José Antonio Cortes de Oliveira, agradeço por toda a ajuda, direta e indireta, e por todo seu trabalho, que garante que nosso laboratório funcione tão bem. Agradeço também pelas conversas, caronas e pela excelente música.

Aos meus amigos do Laboratório de Neurofisiologia e Neuroetologia Experimental (LNNE) e do Departamento de Fisiologia: Alexandra, Willian, Guilherme, Suélen, Nayara, Adrieli, Samuel, Jordan e Rubinho. Agradeço a vocês pela amizade, colaboração e toda a ajuda.

Ao Prof. Dr. Antonio Claudio Tedesco e seu grupo de pesquisa, em especial à Luandra Aparecida Unten Takahashi, pelo trabalho de desenvolvimento, produção e caracterização da nanoemulsão avaliada neste trabalho.

Agradeço também ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina, a qual esse projeto está vinculado, por fornecer o canabidiol que viabilizou sua execução.

Por fim, agradeço o apoio financeiro oferecido pelas agências de fomento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FAEPA). Com agradecimento especial à FAPESP pela concessão da bolsa de Iniciação Científica.

*“Eu... um universo de átomos, um átomo no universo.”*

*Richard Feynman*

## RESUMO

As epilepsias são condições neurológicas graves em que se instaura no cérebro um estado de hiperexcitabilidade neuronal, resultando no surgimento de crises epiléticas. As crises podem envolver ou não automatismos motores e comprometimento cognitivo, afetando diretamente a qualidade de vida do paciente, podendo até mesmo levar à morte. Aproximadamente um terço dos pacientes afetados é resistente ou refratário às drogas antiepiléticas (DAEs) convencionais, enquanto as alternativas cirúrgicas, muitas vezes adotadas para a pequena parcela de pacientes elegíveis, nem sempre são eficientes e podem resultar em sequelas duradouras. É, portanto, necessário o desenvolvimento e aplicação de novas DAEs, bem como de novas formas de veiculação e administração, que otimizem os efeitos e parâmetros farmacocinéticos de DAEs existentes. Nesse sentido, o canabidiol (CBD), uma substância derivada da *Cannabis*, com demonstrada ação anticonvulsivante, surge como uma proposta promissora, no entanto seu perfil farmacocinético limita seu uso. Nesse contexto insere-se a proposta desse trabalho: verificar a eficácia do CBD veiculado em nanoemulsão (CBDne), um novo sistema nanoparticulado, no modelo animal (ratos machos da linhagem Sprague-Dawley) de *Status Epilepticus* (SE) induzido por microinjeção de pilocarpina intra-hipocampal (Pilo-IH). Em suma, demonstramos a eficácia do CBDne na redução do tempo despendido em crise e na modulação da dinâmica de crise, observada pela redução de potência global nos registros ipsilateral e contralateral à microinjeção de PiloIH, entre 60 e 90 minutos após o início das crises. No entanto, não detectamos efeito significativo do CBDne na latência para início de crises e SE, ou na gravidade das crises apresentadas. Foi também apresentada um *script* em linguagem MATLAB®, com um algoritmo capaz de realizar a detecção de crises e extrair informações relevantes do registro eletroencefalográfico, tal como, tempo de início e duração de cada crise, latência para início das crises e SE, potência média de faixas de frequência e gerar gráficos da série temporal e espectrogramas. Foram ainda apresentados resultados da caracterização físico-química do CBDne e demonstração de sua estabilidade.

**Palavras-chave:** Epilepsia; Canabidiol; *Cannabis* medicinal; *Drug Delivery System*; Nanoemulsão; Pilocarpina.

**Apoio Financeiro:** Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP: Proc. 2019/02787-8; Proc. 2019/05957-8; Proc. 2014/50891-1); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq: Proc. 465458/2014-9).

## ABSTRACT

Epilepsies are severe neurological conditions in which a state of neuronal hyperexcitability is established in the brain, resulting in the onset of epileptic seizures. Seizures may involve motor automatisms and cognitive impairment, directly affecting the patient's quality of life, and may even lead to death. Approximately one-third of affected patients are resistant or refractory to conventional antiepileptic drugs (AEDs), while the surgical alternatives, often adopted for the small portion of eligible patients, are not always efficient and can result in long-lasting sequelae. Therefore, it is necessary to develop new AEDs, in addition to new systems of drug delivery and new routes of administration, which optimize the effects and pharmacokinetic parameters of existing AEDs. In this sense, cannabidiol (CBD), a substance derived from *Cannabis* with demonstrated anticonvulsant effect, appears as a promising compound, none the less, its pharmacokinetic profile limits its use. In this context, this work has proposed to verify the effectiveness of CBD vehiculated in nanoemulsion (CBDne), a novel nanoparticulate system, in the animal model (male rats of the Sprague-Dawley strain) of *Status Epilepticus* (SE) induced by intra-hippocampal pilocarpine microinjection. Succinctly, we have demonstrated the effectiveness of CBDne in reducing the time spent in seizures and on the modulation of seizure dynamics, as observed by the reduction in global power between 60 and 90 minutes after seizure onset in the hippocampal recordings, ipsilateral and contralateral to the intra-hippocampal pilocarpine microinjection. Despite these findings, we did not detect a significant effect of CBDne on the time of onset of seizures and SE, or on the severity of the seizures. We have also presented here a MATLAB® *script* containing an algorithm capable of detecting electrographic seizures and extracting relevant information from the electroencephalographic recordings, such as the time of onset and duration of each seizure, latency to onset of seizures and SE, the average power of frequency bands, and generate time-series graphs and spectrograms. Details about the physicochemical characterization of the nanoemulsion and demonstrations of its stability were also demonstrated.

**Keywords:** Epilepsy; Cannabidiol; Medical *Cannabis*; Drug Delivery System; Nanoemulsion; Pilocarpine.

**Financial Support:** São Paulo Research Foundation (FAPESP: Proc. 2019/02787-4; Proc. 2019/05957-8; Proc. 2014/50891-1); National Council for Scientific and Technological Development (CNPq: Proc. 465458/2014-9).

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	2
1.1. Epilepsia.....	2
1.2. Epilepsias Farmacorresistentes: Alternativas e Mecanismos .....	5
1.3. <i>Cannabis spp.</i> , Sistema Endocanabinoide e Canabidiol: novas alternativas para o tratamento das epilepsias farmacorresistentes .....	8
1.3.1. <i>Cannabis spp.</i> .....	8
1.3.2. Sistema Endocanabinoide .....	9
1.3.3. Canabidiol .....	12
1.3.4. Uso Terapêutico do Canabidiol: Desafios e Perspectivas.....	17
1.4. Modelo de <i>Status Epilepticus</i> induzido por pilocarpina intrahipocampal .....	20
2. OBJETIVOS.....	23
2.1. Objetivo Gerais .....	23
2.2. Objetivos Específicos .....	23
3. MATERIAS E MÉTODOS .....	25
3.1. Animais.....	25
3.2. Cirurgia estereotáxica para implante de quimitrodo e eletrodo.....	26
3.3. Administração de CBDne ou neØ e indução de SE.....	29
3.4. Registro de vídeo-EEG .....	29
3.5. Perfusão e coleta de tecido.....	30
3.6. Rotina MATLAB® para análise eletroencefalográfica .....	30
3.8. Parâmetros de detecção de crises epilépticas e SE. ....	32
3.9 Critérios de análise do vídeo-EEG.....	33
3.10. Estudo de incorporação do CBD em nanoemulsão.....	34
3.10.1. Curva analítica padrão de CBD em solvente orgânico por espectroscopia de absorção no UV-Vis.....	34
3.10.2. Quantificação da CBDne.....	34
3.10.3. Caracterização físico-química das nanoemulsões e acompanhamento da estabilidade.....	34
3.11. Delineamento experimental .....	35
4. RESULTADOS .....	37
4.1. Análise de Registro Eletroencefalográfico .....	37
4.1.1. Análise de Série-temporal .....	37
4.1.2. Latências para início de crises epilépticas e SE .....	40
4.1.3. Fração de tempo em crise.....	43

4.1.4. Análise espectral .....	43
4.2. Análise de Vídeo-EEG.....	49
4.3. Caracterização Físico-química da Nanoemulsão .....	52
5. DISCUSSÃO .....	56
6. CONCLUSÃO.....	61
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	63
ANEXO I.....	73

## **INTRODUÇÃO**

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Epilepsia

O sistema nervoso é formado por uma complexa rede de células excitáveis denominadas neurônios, bem como de células não neurais (neuroglia), que participam de seu suporte, nutrição e modulação. Ainda que os neurônios sejam considerados a unidade funcional do sistema nervoso, somente em conjunto com outros neurônios e as células da glia, são capazes de exercer sua função. Estabelecendo milhares de conexões entre si, os neurônios formam redes e circuitos, tornando possível o processamento de aferências sensoriais e a elaboração de respostas apropriadas, bem como o surgimento de propriedades emergentes, como as funções cognitivas e a consciência (HUDSPETH, 2013). Para que o sistema nervoso funcione de forma adequada é necessário que o tenuous equilíbrio estabelecido entre excitação e inibição seja mantido (SCHARFMAN, 2007). Eventos como, febre, inflamação, ou alterações metabólicas e eletrolíticas, que perturbem esse equilíbrio, podem resultar na ictogênese, i.e., o surgimento de crises epiléticas (SILVA & CABRAL, 2008). Ainda que a realidade seja muito mais complexa, o desbalanço entre excitação e inibição é o modelo proposto como mecanismo de ação de grande parte das drogas antiepiléticas (DAEs) utilizadas na clínica (e.g., Clonazepam, Fenobarbital, Diazepam, Ácido Valpróico e Felbamato), que atuam, de forma direta ou indireta, reduzindo a excitação pelo bloqueio de potenciais pós-sinápticos excitatórios (EPSPs; do inglês *Excitatory Postsynaptic Potentials*) ou pela facilitação de potenciais pós-sinápticos inibitórios (IPSPs; do inglês *Inhibitory Postsynaptic Potentials*). Esse modelo também ajuda a explicar a ação pró-convulsivante de certas substâncias (e.g., Pilocarpina, Ácido Caínico (KA), 4-Aminopiridina (4-AP), Bicuculina e Muscimol) que, de forma oposta, bloqueiam a inibição ou aumentam a excitação, promovendo o surgimento de crises epiléticas. As crises epiléticas podem ser definidas como “uma ocorrência transitória de sinais e/ou sintomas, devido a uma atividade neuronal anormal, excessiva ou síncrona no cérebro” (FISHER et al., 2014), podendo estas se manifestar em um amplo espectro de disfunções motoras e cognitivas, dependendo de seu tipo e gravidade (GOLDBERG, 2013; FISHER et al., 2017), em alguns casos podendo até mesmo levar à morte (GOMES, 2010; ANNEGERS & COAN, 1999).

Ainda que útil para o desenvolvimento de fármacos, terapias e modelos experimentais, a teoria do desbalanço entre excitação e inibição não explica como a ictogênese pode ocorrer de forma espontânea e recorrente (STALEY, 2015). Para

compreendermos a patofisiologia das epilepsias é necessário entender também como o cérebro se torna epiléptico. A epileptogênese pode ser compreendida como um processo de modificações estruturais e funcionais levando a uma maior probabilidade de gênese espontânea de crises epiléticas (PITKÄNEN et al., 2015; GOLDBERG, 2013). Estudos *in silico*, em modelos computacionais, ajudaram a formular a teoria de que a existência de um *feedback* positivo na circuitaria excitatória é uma característica necessária para que a rede neuronal seja capaz de, de forma intrínseca, iniciar e sustentar uma crise epilética (PITKÄNEN et al., 2015). Outra propriedade necessária é que essa rede possua biestabilidade, isto é, a capacidade de transitar entre os modos normal e ictal de atividade (JIRSA et al., 2014).

A epileptogênese pode ser desencadeada por diversos eventos precipitantes, tais como: danos cerebrais causados por lesões pré-natais ou perinatais (e.g. má oxigenação ou trauma, durante ou antes do nascimento), infecções, febres, tumores, acidentes vasculares, hipóxia, traumatismos, anormalidades congênitas e condições genéticas (WHO, 2021). Por possuírem diversas causas e por serem uma consequência comum a diversas encefalopatias, as epilepsias estão entre as condições neurológicas de mais alta prevalência. Em 2016, um levantamento determinou uma prevalência global de 45,9 milhões (IC95%: 39,9 - 54,6 milhões) de indivíduos afetados com epilepsias ativas, de natureza secundária ou idiopática, sendo contabilizadas 126.055 mortes relacionadas às epilepsias neste mesmo ano (BEGHI et al., 2019). É necessário ressaltar que a distribuição global desses casos é bastante heterogênea, e países de média e baixa renda concentram cerca de 80% dos pacientes afetados (BEGHI et al., 2019; NGUGI et al., 2010; WHO, 2021).

Epilepsia é um termo bastante abrangente, que diz respeito não a uma, mas a diversas condições específicas, cada qual apresentando uma etiologia e manifestações clínicas distintas (THURMAN et al., 2011). De acordo com o informe oficial da *International League Against Epilepsy* (ILAE), a epilepsia é conceitualmente definida como: “um distúrbio do encéfalo caracterizado pela predisposição duradoura à recorrência de crises epiléticas e às comorbidades neurobiológicas, cognitivas, psicológicas e sociais, associadas a essa condição” (FISHER et al., 2014). Essa definição é interessante, pois inclui um aspecto muitas vezes negligenciado: as epilepsias são síndromes debilitantes cujos efeitos vão além das crises epiléticas, os pacientes com epilepsia convivem com o preconceito e o estigma associado à sua condição, fatores que

agem como agravantes para as comorbidades neuropsicológicas subjacentes às epilepsias, tais como: depressão, presente em 10-60% dos casos; distúrbios de ansiedade, 15-25%; fobia social, 15-20%; e distúrbios de pânico, 5-21% (DE BOER et al., 2008).



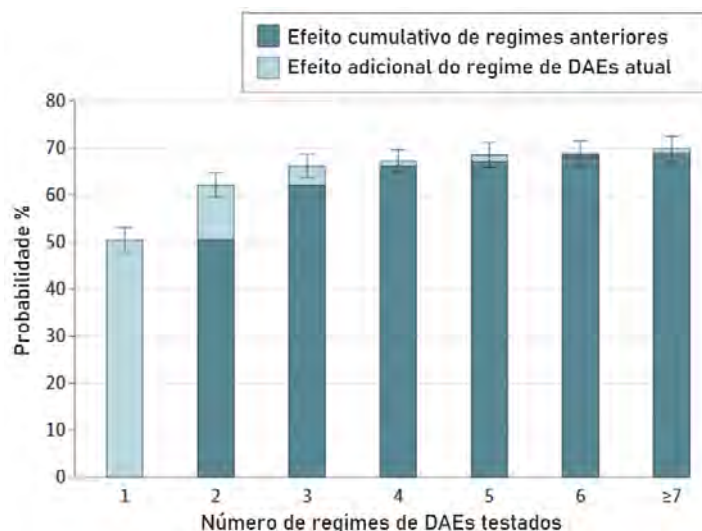
**Figura 1.** Esquema diagnóstico para a classificação das epilepsias. (\*) Denota o início das crises epiléticas (adaptado de SCHEFFER et al., 2017).

Sendo tão diversa, o diagnóstico do tipo específico de epilepsia é essencial para que uma terapia adequada seja empregada em cada caso. Esse diagnóstico inicia-se pela classificação das crises apresentadas pelo paciente (SCHEFFER et al., 2017). De acordo com o relatório oficial da Comissão de Classificação e Terminologia da ILAE, publicado em 2017, as crises epiléticas devem ser classificadas em função do padrão comportamental e, quando disponível, do registro eletroencefalográfico (EEG). Sendo então as crises classificadas com base em seu início, como: focais, com as crises originando-se em redes limitadas a um hemisfério; generalizadas, com o rápido recrutamento de redes distribuídas entre ambos os hemisférios; ou desconhecidas, caso não se tenha conhecimento de seu ponto de início. Opcionalmente essa classificação pode incluir outras características da crise, como o grau de percepção e a presença, ou ausência, de automatismos motores. As crises focais são subdivididas em crises de início motor e não motor e em crises disceptivas e perceptivas, em que se há, respectivamente, comprometimento ou não da consciência. No caso das crises generalizadas, a percepção sempre está comprometida, podendo, no entanto, ainda serem subdivididas em motoras ou não motoras (crises de ausência) (FISHER et al., 2017). Essa classificação é então

utilizada como base para se definir o tipo de epilepsia que o indivíduo apresenta, podendo ser: desconhecida, focal (unifocal ou multifocal), generalizada, ou focal e generalizada combinadas (*Figura 1*; SCHEFFER et al., 2017).

## 1.2. Epilepsias Farmacorresistentes: Alternativas e Mecanismos

Mesmo que a classificação das crises permita um melhor diagnóstico e tratamento, em muitos casos a terapia farmacológica não é suficiente para impedir o surgimento de novas crises. Aproximadamente um terço dos pacientes diagnosticados com algum tipo de epilepsia é resistente ou refratário ao tratamento com dois (ou mais) regimes de drogas antiepilépticas (DAEs), escolhidas e utilizadas de forma apropriada em monoterapia ou em combinação, sendo assim denominados farmacorresistentes (KWAN et al., 2010; ALEXOPOULOS, 2013; SIEGEL, 2004). Um aspecto importante das epilepsias farmacorresistentes (EFRs) é que após a falha de dois regimes terapêuticos a probabilidade de se obter sucesso em tentativas subsequentes caem drasticamente (*Figura 2*; CHEN et al., 2018). É ainda necessário notar que a responsividade ao tratamento farmacológico não é estado fixo, mas sim um processo dinâmico que se modifica ao longo do curso clínico da epilepsia (BERG et al., 2009; BRODIE et al., 2012).



**Figura 2.** Probabilidade de obtenção de 1 ano de liberdade de crises epilépticas para cada novo regime de drogas antiepilépticas testado (adaptado de CHEN et al., 2018).

Outras abordagens terapêuticas, complementares ou alternativas ao tratamento farmacológico, incluem abordagens como dieta cetogênica, ressecção ou desconexão cirúrgica e estimulação elétrica (e.g., estimulação do nervo vago, estimulação do nervo trigêmeo e *deep brain stimulation* [DBS]) (ENGEL JR., 2014). Tais abordagens possuem

taxas de sucesso variado, sendo entre elas, as intervenções cirúrgicas umas das mais efetivas. Novas abordagens, envolvendo sistemas em *closed-loop* com detecção de crises associada a abordagens de DBS, vem sendo desenvolvidas nas últimas décadas e apresentam resultados promissores, no entanto seu uso clínico ainda está em fase de testes (SISTERSON et al., 2019). Os procedimentos de desconexão (e.g., transecção subpial múltipla, calosotomia e hemisferectomia funcional), usualmente de cunho paliativo, visam interromper as vias de propagação das descargas epileptiformes e, assim, reduzir a frequência e severidade das crises (KWAN et al., 2011). Já nos procedimentos ressectivos o objetivo é remover o foco epileptogênico, sendo necessária a remoção de regiões delimitadas do cérebro (e.g., lobectomia temporal anterior, ressecção focal neocortical e ressecção lesional) (ENGEL JR., 2014) ou, em casos particularmente graves, até mesmo a remoção de todo um hemisfério (hemisferectomia) (GRIESSENAUER et al., 2015). Mas, mesmo no caso da epilepsia do lobo temporal (ELT), em que as taxas de sucesso estão entre as mais elevadas, mais de 30% das intervenções cirúrgicas falham em evitar totalmente o surgimento de novas crises (SIEGEL, 2004). Apesar dos riscos associados a um procedimento tão invasivo, para muitos pacientes a intervenção cirúrgica permanece como a última alternativa disponível, sendo cada caso avaliado por uma equipe multidisciplinar de especialistas, que ponderará os riscos e potenciais benefícios do procedimento. No entanto, em muitos casos, o paciente apresenta múltiplos focos epileptogênicos ou um foco difuso ou oculto (i.e., de difícil localização), em outros casos, o foco epileptogênico localiza-se próximo de regiões eloquentes do córtex, inviabilizando sua remoção (KWAN et al., 2011; ENGEL JR., 2014). Devido a estas e outras limitações, grande parte dos pacientes não são candidatos eletivos à intervenção cirúrgica, restando a estes apenas cuidados paliativos.

Devido à alta prevalência das EFRs e às árduas consequências da ausência de um tratamento efetivo, a busca por mecanismos que expliquem a resistência às DAEs é um campo bastante ativo de pesquisa. Dessa forma, diversos mecanismos foram hipotetizados, podendo estas hipóteses serem, essencialmente, categorizados em três grupos: mecanismos relacionados à doença, mecanismos relacionados às drogas e mecanismos genéticos (LÖSCHER et al., 2020). Algumas das hipóteses mais bem estudadas são a hipótese dos transportadores e a hipótese de alteração nos alvos moleculares. Esta última hipótese, postula que alterações induzidas pelo processo epileptogênico levam a modificações nos alvos moleculares onde agem as DAEs, assim,

reduzindo a efetividade do tratamento (KWAN et al., 2011). Em concordância com essa hipótese, as hipóteses genéticas e epigenéticas postulam que polimorfismos e modificações na expressão de proteínas seriam os responsáveis pela baixa responsividade ao tratamento. No entanto, as evidências que suportam essas hipóteses são escassas e inconsistentes em diferentes organismos. Ademais, mesmo que estas hipóteses apresentem mecanismos biologicamente plausíveis, estes mecanismos não seriam suficientes para explicar as EFRs, cujos pacientes apresentam resistência a múltiplos fármacos com alvos e mecanismos de ação distintos (LÖSCHER et al., 2020).

Esta resistência múltipla sugere a presença de mecanismos inespecíficos ao fármaco em questão. Uma possível explicação para esse fenômeno atribui-se à falha das DAEs em alcançar seus alvos. Dentre as hipóteses propostas nessa linha está a hipótese dos transportadores, que postula que a resistência às DAEs se deve à penetração inadequada dos fármacos através da barreira hematoencefálica (BHE), o que ocorre devido à expressão aumentada de proteínas transportadoras de drogas (LÖSCHER et al., 2020). Uma das proteínas mais bem estudadas neste contexto é a Glicoproteína-P, um transportador de efluxo pertencente à família de transportadores *ATP-binding cassette* (ABC). Fisiologicamente esta proteína é expressa em células endoteliais em vasos capilares no cérebro, onde bombeia xenobióticos (i.e., substâncias exógenas) do espaço intracelular para o lúmen capilar, assim, auxiliando na manutenção da integridade da BHE. Em estudos *ex vivo*, com amostras de cérebro ressecadas cirurgicamente de pacientes com EFRs, foi demonstrado uma expressão aumentada de Glicoproteína-P nos capilares bem como a expressão aberrante desta proteína em neurônios e astrócitos (SISODIYA et al., 2002; KWAN et al., 2011). A hipótese farmacocinética apresenta outro mecanismo que possivelmente contribui para a falha das DAEs em alcançar seus alvos. Esta hipótese propõe que pacientes afetados por EFRs apresentam uma expressão aumentada de transportadores de efluxo em órgãos periféricos como intestino, fígado e rins, efetivamente diminuindo a concentração plasmática de DAEs e, conseqüentemente, a quantidade de droga disponível para atravessar a BHE (LÖSCHER et al., 2020).

Por sua vez, a hipótese da rede neural sugere que alterações estruturais associadas a epilepsia, como neurodegeneração, brotamento axonal (*axonal sprouting*), reorganização sináptica, neurogênese aberrante e gliose, contribuem para formação de uma rede neuronal aberrante, levando a uma menor responsividade às terapias farmacológicas (FANG et al., 2011). Outra hipótese que associa as alterações presentes

na epilepsia como causas da farmacorresistência é a hipótese da gravidade intrínseca. Esta hipótese propõe que fatores neurobiológicos comuns promovem, simultaneamente, o aumento da gravidade das crises e a redução da responsividade ao tratamento com DAEs (TANG et al., 2017; LÖSCHER et al., 2020).

Em suma, apesar da existência de diversas hipóteses, algumas mais bem fundamentadas que outras, é comumente aceito que as EFRs possuem natureza multifatorial e causas variáveis, sendo dependente do tipo de epilepsia e do local de ação das DAEs (KWAN et al., 2011; TANG et al., 2017; LÖSCHER et al., 2020). Ainda que nas últimas décadas, diversas novas DAEs tenham sido descobertas e introduzidas no contexto clínico, estas não foram capazes de reduzir significativamente a porcentagem de pacientes farmacorresistentes (GOLYALA & KWAN, 2017). No entanto, este fato não deve desestimular o desenvolvimento de novas DAEs, mas servir como lição para o desenvolvimento de novos fármacos, bem como de novas formas de veiculação e administração, que otimizem os efeitos e parâmetros farmacocinéticos de DAEs existentes.

### **1.3. *Cannabis* spp., Sistema Endocanabinoide e Canabidiol: novas alternativas para o tratamento das epilepsias farmacorresistentes**

#### **1.3.1. *Cannabis* spp.**

Apesar das controvérsias políticas e sociais relativas ao seu uso, as plantas pertencentes ao gênero *Cannabis* (*Cannabis*; i.e., *C. sativa*, *C. indica* e *C. ruderalis*), estão entre as drogas de abuso mais consumidas em todo o mundo (DEGENHARDT et al., 2008). A *Cannabis*, no entanto, possui diversas aplicações que vão muito além de seu uso recreativo, sendo considerada uma das mais antigas ervas medicinais a serem utilizadas pela humanidade. Registros escritos de seu uso medicinal podem ser encontrados na mais antiga farmacopeia conhecida, a *Shen Nung Pen Ts'ao Ching*, escrita por volta de 100 d.C., mas supostamente baseada em tradições orais passadas desde dos tempos do imperador chinês *Shen-Nung* (circa 2700 a.C.) (ZUARDI, 2006). Desde então, ela tem sido aplicada como um fitoterápico no tratamento de uma ampla diversidade de patologias e distúrbios, abrangendo de dores de dente a crises convulsivas (MECHOULAM & FEIGENBAUM, 1987; ZUARDI, 2006).

A *Cannabis* apresenta uma rica e complexa composição química, produzindo centenas de moléculas por meio de seu metabolismo secundário. Dentre os mais de 545

compostos já isolados, um grupo de moléculas se destaca por sua abundância e potencial terapêutico, sendo estas moléculas denominadas canabinoides (FRIEDMAN & DEVINSKY, 2015; PISANTI et al., 2017). O termo canabinoide foi originalmente utilizado para designar uma família de terpeno fenóis de 21 carbonos, produzidos pelo metabolismo secundário da *Cannabis spp.*, assim como metabolitos e produtos de degradação dessas moléculas (FRIEDMAN & DEVINSKY, 2015). Essa definição foi posteriormente substituída por uma mais abrangente, com base farmacológica. Atualmente canabinoide é um termo que compreende os fitocannabinoides, canabinoides de origem vegetal (e.g., canabidiol [CBD],  $\Delta^9$ -tetra-hidrocanabinol [ $\Delta^9$ -THC] e canabinol); os endocannabinoides, ligantes endógenos dos receptores canabinoides (e.g., N-araquidonoiletanolamida [AEA; também conhecida como anandamida] e glicerol 2-araquidonoil [2-AG]); assim como os análogos sintéticos (e.g., cannabidiol-dimetilheptil e 4'-fluorocanabinol [HUF-101]) (GROTENHERMEN, 2003).

### 1.3.2. Sistema Endocanabinoide

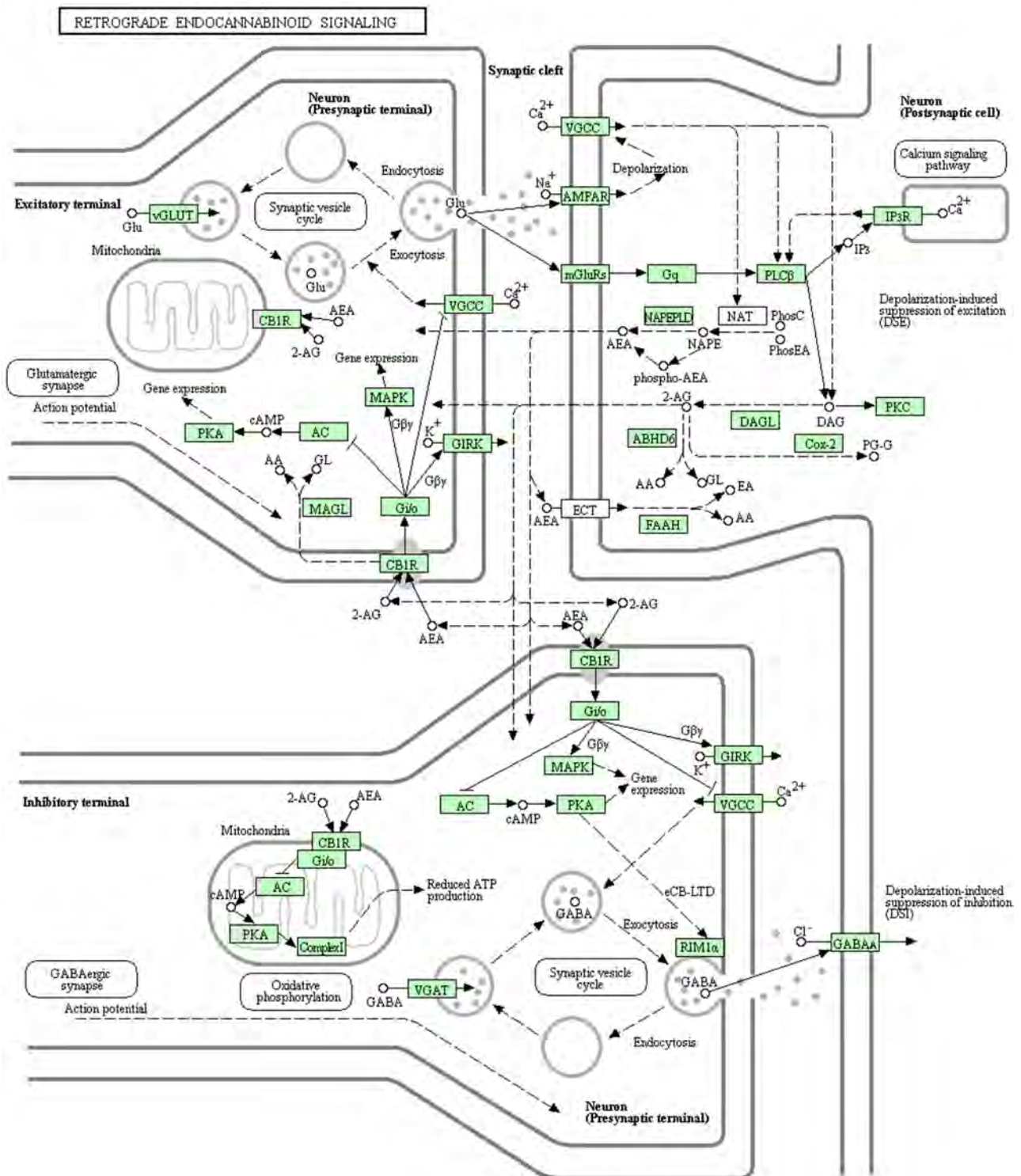
Por muito tempo, o estudo dos canabinoides esteve focado nos efeitos promovidos pelo  $\Delta^9$ -THC (e.g., euforia, prazer, aumento de apetite, psicose e prejuízo à memória episódica, atenção e memória de trabalho), o canabinoide mais abundantes e a principal substância psicoativa da *Cannabis* (ZUARDI, 2008). Estes estudos levaram à identificação de dois de seus alvos moleculares, receptores de membrana acoplados à proteína G (GPCR; do inglês *G protein-coupled receptor*) denominados receptor canabinoide do tipo 1 (CB1) e receptor canabinoide tipo 2 (CB2), onde o  $\Delta^9$ -THC age como agonista parcial (MECHOULAM, 2013). A expressão e função desses receptores difere: O receptor CB1 é um dos GPCRs mais abundantes do cérebro, sendo também expresso em terminações nervosas periféricas, assim como diversos outros tecidos (e.g., trato gastrointestinal, tecido adiposo, hipófise e órgãos sexuais). No cérebro sua expressão é ubíqua, mas pode ser encontrado em níveis particularmente elevados no neocórtex, hipocampo, núcleos da base, cerebelo e tronco encefálico (KENDALL & YUDOWSKI, 2017; HPA, 2021). Nas células, os receptores CB1 se localizam majoritariamente nos terminais pré-sinápticos de neurônios GABAérgicos e glutamatérgicos, mas também podem ser encontrados – em menores proporções – em terminais pré-sinápticos de neurônios dopaminérgicos e colinérgicos, mitocôndrias, astrócitos e terminais pós-sinápticos (CRISTINO et al., 2020; DEGROOT et al., 2006). Já os receptores CB2 estão majoritariamente relacionados com o sistema imune e modulação de resposta

inflamatória, sendo expressos em algumas células de linhagem mieloide (e.g., macrófagos e células microgliais) (MECHOULAM, 2013; KANO et al., 2009). Ainda que de forma modesta, os receptores CB2 também são expressos no cérebro, em neurônios da área tegmental ventral e hipocampo, mas diferentemente dos receptores CB1, estes se localizam pós-sinapticamente em regiões somatodendríticas (CHEN et al., 2017).

A maioria dos efeitos mediados pelos receptores CB1 deve-se à atuação destes na neuromodulação retrógrada inibitória (CRISTINO et al., 2020). Diferentemente de outros neurotransmissores, o 2-AG e AEA não são armazenados em vesículas, mas sim produzidos sob demanda, se difundindo pela membrana e agindo nos receptores CB1 presentes na membrana do neurônio pré-sináptico. Quando ativados, os receptores CB1 (acoplados a proteínas  $G_{i/o}$ ) inibem a abertura de canais de cálcio dependentes de voltagem (VGCC; do inglês *voltage gated calcium Chanel*), assim, suprimindo a liberação de neurotransmissores (via molecular apresentada em maiores detalhes na *Figura 03*; KANO et al., 2009; ARAQUE et al., 2017; CRISTINO et al., 2020). Esse mecanismo endocanabinoide de sinalização retrógrada participa de diferentes formas de plasticidade sináptica, dependendo do neurônio pré-sináptico (glutamatérgico ou GABAérgico) onde o receptor CB1 é expresso e do tipo de circuito onde este está envolvido, muitas vezes atuando em múltiplas sinapses. Alguns desses mecanismos incluem: supressão da excitação/inibição induzida por despolarização ou por receptor metabotrópico (*depolarization-induced supression of excitation* [DSE]; *depolarization-induced supression of inhibition* [DSI]), depressão de longo prazo (LTD; do inglês *long-term depression*) e potenciação de longo prazo (LTP; do inglês *long-term potentiation*) (WILSON & NICOLL, 2001; ARAQUE et al., 2017).

Os receptores CB1 e CB2, seus agonistas endógenos e as enzimas responsáveis pela biossíntese e degradação destes agonistas, constituem o sistema endocanabinoide (CRISTINO et al., 2020). No que diz respeito ao sistema nervoso, o sistema endocanabinoide é uma ampla rede neuromodulatória, envolvida na regulação de diversos processos fisiológicos e cognitivos (e.g., aprendizado, memória, nocicepção, neurogênese, neuroproteção, sistema de recompensa e controle do humor) (STASIULEWICZ et al., 2020). É importante compreender que, ao invés de um sistema discreto e isolado, o sistema endocanabinoide se sobrepõe com diversas outras vias moleculares e processos metabólicos, se tornando ainda mais complexo devido à promiscuidade de mediadores, de forma a dar origem a uma ampla rede de processos e

componentes relacionados, denominada endocanabinoidoma ou sistema endocanabinoide expandido (CRISTINO et al., 2020). Alterações no sistema endocanabinoide são comumente encontradas em pacientes acometidos por distúrbios neurológicos e psiquiátricos (DI IORIO et al., 2013), assim como em modelos experimentais destas doenças (LAZARINI-LOPES et al., 2020a). Fato que sugere o envolvimento do sistema nestas doenças e seus componentes como possíveis alvos terapêuticos (CRISTINO et al., 2020; STASIULEWICZ et al., 2020).



**Figura 3 (página anterior).** Os endocanabinóides atuam como mensageiros retrógrados nas sinapses em várias regiões do cérebro. A família dos endocanabinóides inclui pelo menos cinco derivados do ácido araquidônico; os dois mais bem caracterizados são a AEA e 2-AG. Eles são liberados de neurônios pós-sinápticos após a despolarização pós-sináptica e/ou ativação do receptor. Os endocanabinóides liberados, então, ativam os receptores CB1 nos terminais pré-sinápticos e suprimem a liberação do transmissor inibitório GABA ou do transmissor excitatório glutamato pela inibição dos canais de  $Ca^{2+}$ . Além da conhecida expressão dos receptores CB1 na membrana plasmática, esse receptor também está presente nas membranas mitocondriais, onde reduz a respiração mitocondrial e contribui para o DSI. Enquanto DSI e DSE resultam em plasticidade sináptica de curto prazo, os endocanabinóides também medeiam mudanças sinápticas de longo prazo (eCB-LTD) (adaptado de KEGG, 2017).

### 1.3.3. Canabidiol

A história do CBD inicia-se com sua descoberta, tendo sido isolada no fim da década de 1930, por Adams e colaboradores (ADAMS et al. 1940). Sua estrutura química, no entanto, só seria totalmente elucidada duas décadas mais tarde por Mechoulam e Shvo (MECHOULAM & SHVO, 1963). O CBD é o segundo composto mais abundante encontrado no extrato da *Cannabis sativa.*, mas diferentemente do  $\Delta^9$ -THC, não apresenta efeitos psicotrópicos ou intoxicantes e sua administração resulta em poucos efeitos colaterais (PISANTI et al., 2017; BERGAMASCH et al, 2011). Justamente por ser incapaz de reproduzir os efeitos psicoativos da *Cannabis*, o que mais tarde seria considerado um de seus grandes atrativos, o CBD foi inicialmente considerado uma substância farmacologicamente inativa (ZUARDI, 2006). Contudo, atualmente temos conhecimento de uma miríade de efeitos farmacológicos e benefícios terapêuticos promovidos pelo CBD, que exhibe propriedades anticonvulsivas, antiepilépticas, neuroprotetoras, ansiolíticas, analgésicas, anti-inflamatórias, antitumorais e antioxidantes, dentre outras múltiplas (PISANTI et al., 2017; WHITE, 2019).

Ainda que o CBD seja um fitocanabinoide com estrutura química bastante semelhante ao do  $\Delta^9$ -THC, sua relação com o sistema endocanabinoide é bem mais complexa (ELSAID et al., 2019). Mesmo apresentando uma baixa afinidade pelos sítios ortostéricos dos receptores CB1 e CB2, com uma constante de inibição ( $K_i$ ) na ordem de micro molares – em comparação, o  $K_i$  do  $\Delta^9$ -THC é de cerca de 30 nM – o CBD, ainda assim, é capaz de atenuar diversos dos efeitos agudos do  $\Delta^9$ -THC e sua atuação como antagonista foi demonstrada em diversos estudos *in vitro* e *in vivo*, mesmo em concentrações muito inferiores ao seu  $K_i$  (PERTWEE, 2008; FREEMAN et al., 2019; LAPRAIRIE et al. 2015). Estas e outras evidências, levaram à hipótese de que o CBD

age como um modulador alostérico não competitivo dos receptores CB1, podendo afetar a potência e eficácia de ligantes ortostéricos, como os agonistas endógenos 2-AG e AEA (LAPRAIRIE et al. 2015).

**Tabela 1.** Alvos moleculares do CBD e seu efeito farmacológico (Adaptado de MORALES et al., 2017 e DE ALMEIDA & DEVI, 2020).

Alvos moleculares	Efeito do CBD
Receptor CB1	Modulador alostérico negativo
Receptor CB2	Agonista inverso
FAAH	Inibidor
TRPV1	Agonista → Dessensibilização
TRPV2	Agonista → Dessensibilização
TRPV3	Agonista
TRPVA	Agonista → Dessensibilização
TRPM8	Antagonista
5-HT <sub>1A</sub>	Agonista
5-HT <sub>2A</sub>	Agonista parcial
5-HT <sub>3A</sub>	Antagonista
GPR55	Antagonista
GPR3, GPR6 e GPR12	Agonista inverso
Transportador de nucleosídeos equilibrativo (ENT-1)	Inibidor
Receptor opioide $\mu$	Modulador alostérico
Receptor opioide $\delta$	Modulador alostérico
PPAR $\gamma$	Agonista
Receptor de glicina $\alpha 1$	Modulador alostérico positivo
Receptor de glicina $\alpha 3$	Modulador alostérico positivo
Receptor de Dopamina D2	Agonista parcial
Receptor GABA <sub>A</sub>	Modulador alostérico positivo
Canais de sódio (hNav1.1-1.7)	Inibidor
Canal de cálcio do tipo L (LTCC)	Inibidor
Trocador de Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> Mitocondrial (NCX)	Modulador bidirecional

Quanto a ação do CBD em receptores CB2, estudos sugerem uma ação antagônica, mas não há um consenso claro quanto a como este antagonismo se estabelece, enquanto alguns estudos sugerem que CBD seria um agonista inverso de CB2, efetivamente

reduzindo a ativação basal deste receptor (THOMAS et al., 2007), outros estudos demonstraram a existência de um sítio alostérico onde CBD se liga, sugerindo que o CBD poderia participar de alguma forma de modulação alostérica, assim como nos receptores CB1 (MARTÍNEZ-PINILLA et al., 2017). Outro alvo molecular do sistema endocanabinoide é a hidrolase amida de ácido graxo (FAAH; do inglês *fatty acid amide hydrolase*), onde o CBD age como um inibidor, assim, podendo prevenir o catabolismo do AEA, aumentando sua disponibilidade (LAZARINI-LOPES et al., 2020b).

Sendo considerado uma droga “promiscua”, o CBD possui uma ampla variedade de alvos moleculares, que não se restringem ao sistema endocanabinoide. Graças à sua natureza lipofílica o CBD pode difundir-se livremente pelas membranas, dando a este acesso a todos os compartimentos celulares. Ainda que seja difícil definir com precisão todos os seus alvos moleculares, mais de 65 já foram descritos na literatura, dos quais: cerca de 49% são enzimas, 20% são transportadores, 15% são receptores e 15% são canais de membrana (BIH et al., 2015). Exemplos de alvos moleculares e seus efeitos farmacológicos estão apresentados na Tabela 1 (DE ALMEIDA & DEVI, 2020; MORALES et al., 2017; RYAN et al., 2009; LAUN et al., 2019.). Esse perfil farmacodinâmico complexo e a intersecção de diversas vias de sinalização, dificultam o estudo da contribuição de cada um desses alvos, de forma que os mecanismos de ação do CBD ainda estão longe de serem totalmente elucidados.

#### **1.3.4. Efeitos Anticonvulsivos do Canabidiol**

Apesar do perfil farmacodinâmico complexo, a eficácia do CBD como um potente agente anticonvulsivo foi demonstrada em diversos estudos pré-clínicos (DOS SANTOS et al., 2015; LAZARINI-LOPES et al., 2020b) e clínicos (DEVINSKY et al., 2016; NABBOUT & THIELE, 2020). Diversos mecanismos de ação foram hipotetizados visando explicar seus efeitos antiepilépticos. Um importante mecanismo proposto envolve a neurotransmissão GABAérgica, afetada direta e indiretamente pelo CBD. Receptores GABA<sub>A</sub> são alvos de DAEs, como barbitúricos e benzodiazepínicos, substâncias depressoras que buscam restabelecer o equilíbrio entre excitação e inibição pela facilitação de IPSPs (EF, 2021). O CBD é capaz de agir diretamente em receptores GABA<sub>A</sub>, atuando como um modulador alostérico positivo (BAKAS et al., 2017), aumentando a efetividade de GABA. O CBD parece também ser capaz atuar facilitando a neurotransmissão GABAérgica por meio de seu antagonismo de receptores GPR55. Em um estudo, em modelo genético da Síndrome de Dravet, foi demonstrado que o CBD foi

capaz de aumentar a frequência de IPSPs mediados por receptores GABA<sub>A</sub> e reduzir o *output* excitatório no giro denteado (GD) do hipocampo, sendo este processo dependente dos receptores GPR55 e independente de receptores CB1 (KAPLAN et al., 2017). Em um outro estudo, por Khan e colaboradores, utilizando um modelo químico de ELT, foi demonstrado que o CBD é capaz de restaurar, morfológica e funcionalmente, interneurônios hipocampais colecistocinina (CCK) e parvalbumina (PV) positivos, dois importantes tipos de interneurônios GABAérgicos. Neste mesmo estudo, demonstraram que o CBD é capaz de aumentar a frequência e amplitude de IPSPs entre interneurônios CCK/PV positivos e células piramidais (em CA1) e de reduzir a frequência e amplitude de EPSPs entre neurônios piramidais. Interessantemente, essa redução foi mais pronunciada em neurônios em um estado mais excitável (-55 mV) e com uma maior taxa de disparo, do que em neurônios em estado menos excitável (-70 mV), o que pode sugerir uma propriedade voltagem dependente deste efeito, devido a propriedades voltagem dependentes intrínsecas ao receptor, ou uma interação voltagem dependente do CBD com seu receptor (KHAN et al., 2018).

Diversos outros estudos também demonstram que os efeitos anticonvulsivos do CBD são, ao menos em parte, dependentes de GPR55 (LAZARINI-LOPES et al., 2020b), de forma que não é surpreendente que este também esteja envolvido em outro mecanismo de ação proposto. Diversos alvos moleculares do CBD (*Tabela 1*), como o GPR55, TRPV1-3, LTCC e NCX, estão envolvidos em processos que de forma direta ou indireta alteram a concentração intracelular de cálcio. Dessa forma, a modulação da mobilização de cálcio foi proposta como um possível mecanismo de ação do CBD. O GPR55, quando ativado promove a ativação de proteínas G<sub>q</sub>, G<sub>12</sub>, ou G<sub>13</sub>, levando à ativação de fosfolipase C (PLC) e, conseqüentemente, à liberação de íon de cálcio do retículo endoplasmático, de forma que o CBD, um antagonista do GPR55, é capaz de reduzir a excitabilidade por meio da inibição dessa via (GRAY & WHALLEY, 2020). O TRPV1 é um receptor ionotrópico catiônico não seletivo. Sua ativação resulta em despolarização da membrana citoplasmática pelo influxo de íons, como sódio e cálcio, promovendo o aumento da taxa de disparo de neurônios, estando assim associado à excitabilidade neuronal. Na epilepsia há uma maior expressão de TRPV1, estando este aumento relacionado a um aumento de EPSPs (SAFFARZADEH et al, 2016). Estudos nos modelos de pentilenotetrazol (PTZ) e eletrochoque máximo demonstraram que os efeitos anticonvulsivos do CBD são dependentes de TRPV1 (VILELA et al., 2017;

GRAY et al., 2020). Essa dependência, a princípio, pode parecer pouco intuitiva, considerando o papel do TRPV1 na fisiopatologia das epilepsias e a atuação do CBD, como seu agonista. Mas na realidade, a ativação do TRPV1 pelo CBD é rapidamente seguida por sua dessensibilização, o que conseqüentemente leva a uma redução da hiperexcitabilidade (DE PETROCELLIS et al., 2011). Um efeito semelhante pode ser também observado em TRPV2 e TRPA1 (IANNOTTI, et al., 2014). Outro importante alvo do CBD envolvido na mobilização de cálcio é o *antiporter* mitocondrial NCX. O efeito do CBD neste trocador de sódio e cálcio foi demonstrado em neurônios hipocámpais utilizando sondas de cálcio seletivas para os compartimentos citoplasmático e mitocondrial, já que o CBD é capaz de afetar bidirecionalmente a concentração de cálcio de forma dependente da excitabilidade. Sob concentrações fisiológicas de  $K^+/Ca^{2+}$ , o CBD promove um aumento súbito na concentração de cálcio (no citoplasma), enquanto possui o efeito oposto, de redução da concentração e diminuição das oscilações de cálcio em condição de alta excitabilidade (meio com alta concentração de  $K^+$ , ou exposição a 4-AP) (RYAN et al., 2009).

Apesar dos efeitos anticonvulsivos do CBD serem frequentemente demonstrados como independentes da interação deste com os receptores endocanabinoides, outros estudos apresentam dados contraditórios (LAZARINI-LOPES et al., 2020b), de forma que seu envolvimento não pode ser descartado. O CBD é capaz de afetar o sistema endocanabinoide pela inibição da FAAH e da captação de AEA (BISOGNO et al., 2001) o que promove um aumento da disponibilidade de AEA. Os níveis de AEA, bem como 2-AG, podem ainda ser influenciados pelo CBD por meio da sua ação na mobilização de cálcio, podendo assim, afetar a síntese dos endocanabinoides.

Outro mecanismo de ação proposto para o CBD envolve seus efeitos na via de sinalização de adenosina (GRAY & WHALLEY, 2020). A adenosina é descrita como uma moduladora endógena da excitabilidade neuronal e alterações no seu metabolismo, como o aumento da expressão de adenosina quinase (ADK) em astrócitos, estão relacionados ao processo de epileptogênese (WELTHA et al., 2019). Os efeitos antiepilépticos da adenosina são mediados pela ativação de receptores de adenosina  $A_1$ , presentes em astrócitos e em terminais pré-sinápticos e pós sinápticos. A ativação destes receptores (acoplados a proteínas  $G_{i/o}$ ) inibe o influxo de cálcio no terminal pré-sináptico e promove hiperpolarização do terminal pós-sináptico, ao potencializar canais de potássio retificadores de influxo (WELTHA et al., 2019). Apesar de não interagir diretamente com

os receptores de adenosina, o CBD é capaz de aumentar a disponibilidade de adenosina extracelular, ao impedir sua recaptção, via inibição de ENT-1 (GRAY & WHALLEY, 2020).

Foi recentemente demonstrado que a efetividade do CBD no tratamento de EFRs é dependente da dinâmica de rede do cérebro (ANDERSON et al., 2020). Neste estudo utilizaram análises de EEG baseadas na teoria de grafos da coerência de fase das oscilações eletrográficas (medida de conectividade), para estudar como o CBD altera os a dinâmica de rede e os padrões de atividade oscilatória no cérebro e como alterações da atividade neural e da dinâmica de rede podem ser utilizados como fatores preditivos da eficácia do tratamento com CBD. Dessa forma, demonstraram que os pacientes responsivos ao tratamento (redução de crises superior a 70%) apresentavam uma maior integração de rede (maior conectividade global e menor magnitude) e aumento da segregação de rede (maior conectividade entre redes próximas [*small-world network*]) apenas na faixa de frequência *beta*, quando comparados a pacientes não responsivos ao tratamento. Também demonstraram que maiores doses de CBD promovem uma maior integração de rede, assim como, uma maior segregação de rede nas faixas *delta*, *teta* e *alfa* (ANDERSON et al., 2020).

Em suma, ainda que os mecanismos de ação do CBD estejam longe de serem totalmente elucidados, torna-se cada vez mais claro que os efeitos anticonvulsivos do CBD estão relacionados a grande variedade de mecanismos e alvos moleculares. Essa variedade ajuda a explicar a eficácia do CBD em diferentes modelos experimentais (LAZARINI-LOPES et al., 2020b), assim como no tratamento de pacientes acometidos por diversos tipos de epilepsias, até mesmo as EFRs (DEVINSKY et al., 2016).

#### **1.3.4. Uso Terapêutico do Canabidiol: Desafios e Perspectivas**

A despeito de sua eficácia e seus diversos benefícios, o CBD não pode ser considerado inócuo. Ainda que possua um perfil relativamente seguro e de boa tolerabilidade, como qualquer fármaco, o CBD possui efeitos adversos: Em um estudo conduzido entre 2014 a 2016 (SZ AFLARSKI et al., 2018), como parte de um programa de acesso expandido, o CBD foi administrado em pacientes acometidos por diversas EFRs. Neste estudo os efeitos adversos mais comuns foram diarreia (29%) e sonolência (22%). A incidência destes efeitos adversos foi menos pronunciada no grupo com doses inferiores a 10 mg/kg/dia (dose mediana: 25 mg/kg/dia) e apresentou características dose

dependentes. É necessário notar que, por não possuir um grupo controle (placebo), a incidência relatada corresponde à incidência total de efeitos adversos nessa população. Foram também relatados efeitos adversos graves, que incluem crises convulsivas (9%) e *Status Epilepticus* (7%), no entanto essas taxas são consistentes com as relatadas em outros estudos incluindo pacientes acometidos por epilepsias graves (SZAFLARSKI et al., 2018).

Boa parte do metabolismo do CBD é mediado por proteínas pertencentes à superfamília de enzimas Citocromo P450 (CYP), tais como CYP3A4, CYP2C19, CYP2D6 e CYP2C9, expressas majoritariamente no tecido hepático, mas também presentes no intestino (SAMANTA, 2019; MILLAR et al., 2020). Além de ser degradado por essas enzimas o CBD também atua nestas como um inibidor competitivo, podendo assim interferir no metabolismo de outras DAEs, como: clobazam, topiramato, eslicarbazepina, zonisamida e rufinamida (SAMANTA, 2019). Essa interação medicamentosa possui consequências importantes para os pacientes com EFRs, uma vez que a inibição dessas enzimas pode alterar o perfil farmacocinético destas drogas, podendo resultar no seu acúmulo. Dependendo da extensão deste acúmulo é possível que essas DAEs excedam seu intervalo terapêutico, aumentando a probabilidade e gravidade de efeitos adversos. A título de exemplo, Szaflarski e colaboradores relataram que 38% dos pacientes que tomaram CBD e clobazam (em terapia combinada), apresentaram sonolência, comparado a apenas 14%, no grupo que não tomou clobazam junto ao CBD (SZAFLARSKI et al., 2018). Outros estudos revelaram que a concentração tecidual de clobazam e seu metabolito ativo, N-desmetil clobazam, pode aumentar até cinco vezes por interferência do CBD no seu metabolismo (SAMANTA, 2019). Ainda que a interação medicamentosa seja um risco à saúde dos pacientes, essa interferência também pode ser explorada, permitindo reduzir a dose de fármacos, ainda que mantendo níveis efetivos.

Outro aspecto importante que deve ser considerado para utilização terapêutica do CBD é seu perfil farmacocinético. Como mencionado anteriormente, o CBD é uma substância de alta lipofilicidade, com um coeficiente de partição octanol-água ( $K_{ow}$ ) de 6,3 (MILLAR et al., 2020), de forma que sua solubilização em solução aquosa é bastante limitada (0.1 µg/mL) (MANNILA et al., 2007). Devido a estas características, o CBD quando administrado por via oral, apesar de boa permeabilidade, possui baixa absorção, sendo absorvido ao longo do trato gastrointestinal, principalmente pelo intestino delgado. Além disso, o CBD sofre um intenso metabolismo de primeira passagem, reduzindo

consideravelmente sua biodisponibilidade, que varia em média entre 6% e 19% em diferentes estudos (ELSAID et al., 2019; MECHOULAM et al., 2002). A administração sublingual, ou por meio de *spray* oromucoso, auxilia, promovendo um ligeiro aumento dessa biodisponibilidade, mas uma porção significativa da dose administrada continua sendo absorvida pelo trato gastrointestinal (MILLAR et al., 2020). Uma forma eficiente de aumentar a biodisponibilidade oral do CBD, é realizar sua administração junto a uma refeição rica em gordura. Este simples ato é capaz de aumentar a biodisponibilidade do CBD em até 4 vezes se comparado à sua administração em jejum. Este aumento possivelmente está relacionado à formação de micelas e quilomícrons contendo CBD, sendo estes então transportados pelo sistema linfático, podendo atingir a circulação sem passar pelo fígado, evitando assim que parte do CBD seja degradado pelo metabolismo de primeira passagem (MILLAR et al., 2020).

A degradação e eliminação do CBD estão relacionadas a outro importante parâmetro farmacocinético, sua meia-vida (i.e., tempo decorrido para que a concentração plasmática da droga se reduza pela metade). A meia-vida do CBD varia de forma significativa dependendo da formulação, dose e rota de administração. O CBD, quando administrado por via oral tem uma meia-vida entre 1 e 2 horas (respectivamente, 10 e 20 mg/kg), enquanto a administração oral de cápsulas lipídicas aumenta essa meia vida para cerca de 3 horas (10 mg/kg). *Spray* oromucoso resulta em uma meia vida entre 1,44 e 10,86 horas (entre 5 e 20 mg/kg) (MILLAR et al., 2018).

Devido aos desafios mencionados, diversos grupos têm buscado desenvolver novas formulações e sistemas de *drug delivery*, com o intuito de otimizar os parâmetros farmacocinéticos do CBD. Uma abordagem comum envolve aumentar a solubilidade do CBD em água, fim que pode ser alcançado de diversas formas, como por meio de sistemas de *drug-delivery* autoemulsionantes, encapsulamento, formulações cristalinas melhoradas e outras formulações de *drug-delivery* em estado sólido (MILLAR et al., 2020).

A utilização de sistemas nanoestruturados, como nanopartículas e nanoemulsões para veiculação de drogas é uma abordagem promissora que permite otimizar a maioria dos parâmetros farmacológicos como a biodisponibilidade, absorção e meia-vida. Nanoemulsões são soluções heterogêneas de líquido não miscíveis, com gotículas dispersas, cujo tamanho varia entre 50 e 1000 nm de diâmetro (BRUXEL et al., 2012; JAISWAL & DUDHE, 2015). As nanoemulsões são um interessante sistema para

veiculação de fármacos, pois parâmetros de liberação e estabilidade são facilmente ajustáveis, simplesmente alterando as frações de seus componentes. As nanoemulsões permitem também que substâncias pouco solúveis em soluções aquosas, como o CBD, sejam administradas de forma segura por via endovenosa. No entanto, uma das características mais interessantes de sistemas de *drug delivery*, como as nanoemulsões, é que estes sistemas permitem a liberação lenta e sustentada dos fármacos, reduzindo a frequência de administração e a toxicidade, enquanto concentrações relativamente constantes do fármaco são mantidas nos tecidos (BRUXEL et al., 2012).

#### **1.4. Modelo de *Status Epilepticus* induzido por pilocarpina intrahipocampal**

O modelo experimental de epilepsia induzido por pilocarpina é um modelo bem estabelecido e muito utilizado para o estudo das epilepsias, sendo capaz de mimetizar diversas características fisiopatológicas da condição humana (CURIA et al., 2008). Este modelo pode ser dividido em 3 fases distintas: 1<sup>a</sup> – uma fase aguda, caracterizada pelo surgimento de crises tônico-clônicas generalizadas que progridem para *Status Epilepticus* (SE); 2<sup>a</sup> – uma fase latente, sem crises, durando de poucos dias a mais de um mês, durante a qual, diversas modificações patofisiológicas relacionadas à epileptogênese ocorrem; e 3<sup>a</sup> – uma fase crônica onde surgem crises epiléticas espontâneas e recorrentes, com uma frequência de 2-3 crises por semana, com características semelhantes às apresentadas por pacientes acometidos por ELT (LEITE et al., 2002; CURIA et al., 2008).

A pilocarpina é um potente agonista de receptores muscarínicos M1, M2 e M3 e agonista parcial do subtipo M4 (DB, 2021), mas apenas o subtipo M1 medeia seus efeitos pró-convulsivantes (BYMASTER et al., 2003). Experimentos com atropina, um antagonista competitivo de receptores muscarínicos, demonstraram que a ativação colinérgica promovida pela pilocarpina tem papel essencial para o início das crises e evolução para SE, mas não é mais necessária após o estabelecimento de SE, com o estado ictal sendo sustentado por vias glutamatérgicas (CURIA et al., 2008; JUVALE & HAS, 2020). A hiperativação do componente glutamatérgico durante a fase aguda, resulta na morte de neurônios por um processo denominado excitotoxicidade. Esse processo de neurodegeneração pode ser posteriormente detectado por marcações tipo necrose, como a histoquímica de Fluoro-jade B (CASTRO et al., 2011).

A administração de pilocarpina é realizada preferencialmente por via intraperitoneal (i.p.; 300-400 mg/kg em animais adultos) ou intrahipocampal (1,2- 2.4

mg/mL, 1  $\mu$ L), com ambos os métodos promovendo efeitos eletrográficos, comportamentais e histopatológicos semelhantes (FURTADO et al., 2002; CASTRO et al., 2011; JUVALE & HAS, 2020). No entanto, a administração i.p. de pilocarpina, em doses tão elevadas, promove diversas consequências sistêmicas e resultam em uma mortalidade elevada, próxima de 50%, sendo que apenas 60% dos animais entram em SE (CURIA et al., 2008). A administração prévia de lítio (LiCl; 127 mg/kg) potencializa os efeitos da pilocarpina, alterando a permeabilidade da BHE e aumentando a captação de pilocarpina, permitindo que a dose de pilocarpina seja reduzida, melhorando a taxa de indução de SE e diminuindo a mortalidade. A administração de escopolamina, um antagonista de receptores muscarínicos que não atravessa a BHE, também pode ajudar reduzindo efeitos sistêmicos (JUVALE & HAS, 2020). O modelo de microinjeção intrahipocampal de pilocarpina (PiloIH) introduz diversas melhorias em relação ao modelo original, com uma taxa de indução de SE superior a 70% e uma mortalidade próxima de zero. Além disso, a microinjeção permite uma maior especificidade com a ausência de efeitos sistêmicos (FURTADO et al., 2002; CASTRO et al., 2011).

Neste contexto, propomos avaliar a eficácia do CBD veiculado em nanoemulsão (CBDne), um novo sistema nanoparticulado, no modelo animal de SE induzido por microinjeção de PiloIH.

## **OBJETIVOS**

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Gerais**

Investigar os efeitos da administração prévia de CBDne, em ratos submetidos ao modelo de SE, induzido por PiloIH, por meio de análises comportamentais e eletroencefalográficas.

### **2.2. Objetivos Específicos**

Utilizando o modelo químico de epilepsia por indução de SE com PiloIH, em ratos adultos da linhagem *Sprague-Dawley*, com administração prévia de CBDne, objetiva-se nesse trabalho:

- 1.** Verificar os efeitos do CBDne na gravidade das crises e na latência para início das crises e desenvolvimento de SE.
- 2.** Avaliar os efeitos do CBDne nos registros eletroencefalográficos obtidos após o início das crises, observando a presença de características compatíveis com atividade epileptiforme e alterações nos padrões observados.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### 3. MATERIAS E MÉTODOS

#### 3.1. Animais

Todos os procedimentos e condutas executados nesse projeto foram aprovados pelo Comitê de Ética e pesquisa em experimentação animal da FMRP-USP (CEUA número 105/2018) e foram elaborados em concordância com o guia normativo emitido pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) (PONTES et al., 2019).

**Tabela 2.** Destino dado a cada um dos animais utilizados. Grupo neØ (N=11); grupo CBDne (N=13). NA<sup>1</sup>, não analisado devido à ausência de crises. NA<sup>2</sup>, não analisado devido à presença de inadequações no registro (presença de ruído ou problemas com o eletrodo). NA<sup>3</sup>, erro na cirurgia estereotáxica.

	<b>Animal</b>	<b>EEG</b>	<b>Comportamento</b>	<b>Localização de Quimitrodo e Eletrodo</b>
<b>ne Ø</b>	R01	Analisado	Analisado	Verificado
	R02	Analisado	Analisado	Verificado
	R03	Analisado	Analisado	Verificado
	R04	NA <sup>1</sup>	NA <sup>1</sup>	Verificado
	R05	Analisado	Analisado	Verificado
	R06	NA <sup>3</sup>	NA <sup>3</sup>	NA <sup>3</sup>
	R07	NA <sup>2</sup>	Analisado	Verificado
	R08	Analisado	Analisado	Verificado
	R09	Analisado	Analisado	Verificado
	R10	Analisado	Analisado	Verificado
	R11	Analisado	Analisado	Verificado
	<b>Total</b>	<b>N=8</b>	<b>N=9</b>	
<b>CBDne</b>	R01	Analisado	Analisado	Verificado
	R02	Analisado	Analisado	Verificado
	R03	NA <sup>3</sup>	NA <sup>3</sup>	NA <sup>3</sup>
	R04	NA <sup>1</sup>	NA <sup>1</sup>	Verificado
	R05	Analisado	Analisado	Verificado
	R06	Analisado	Analisado	Verificado
	R07	NA <sup>1</sup>	NA <sup>1</sup>	Verificado
	R08	NA <sup>3</sup>	NA <sup>3</sup>	NA <sup>3</sup>
	R09	Analisado	Analisado	Verificado
	R10	Analisado	Analisado	Verificado
	R11	Analisado	Analisado	Verificado
	R12	Analisado	Analisado	Verificado
	R13	NA <sup>1</sup>	NA <sup>1</sup>	Verificado
	<b>Total</b>	<b>N=8</b>	<b>N=8</b>	

Para o estudo, foram utilizados ratos machos da linhagem *Sprague-Dawley*, com idade média de 2 meses e peso entre 250-300 g, provenientes do Serviço de Biotério do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Após sua chegada, os animais foram mantidos no Biotério de ratos do Departamento de Fisiologia da FMRP-USP, em condições ambientais controladas, ciclo claro-escuro 12/12 horas, temperatura mantida por volta de 21 °C e com acesso *ad libitum* a água e ração. Os animais foram mantidos em caixas de polietileno transparente forradas com maravalha e mantidas em estantes ventiladas (microisoladores). No período que antecede ao procedimento cirúrgico os animais foram mantidos em grupos de até 4 animais por caixa. Após a cirurgia os animais foram transferidos para caixas individuais para prevenir o desprendimento do capacete.

A Tabela 2 detalha o destino dado a cada um dos animais utilizados. Animais que, após a injeção e PiloIH, não apresentaram alterações eletroencefalográficas compatíveis com padrões epileptiformes, não foram inclusos nas análises.

### **3.2. Cirurgia estereotáxica para implante de quimitrodo e eletrodo**

Inicialmente, os ratos foram profundamente anestesiados, por meio da administração intraperitoneal (i.p.) de Tiopentax (tiopental sódico 3%; 30 mg/kg) em combinação com injeção intramuscular (i.m.) do anestésico *Ketamina* (cloridrato de cetamina 10%; 60 mg/kg) e do sedativo, pré-anestésico e relaxante muscular *Xilazina* (cloridrato de xilazina 2%; 20 mg/kg). A verificação de que o animal estava devidamente anestesiado foi realizada por meio de compressão de cauda e coxins das patas, além da verificação de ausência de reflexo córneo e palpebral. Uma dose adicional de *Ketamina* e *Xilazina*, contendo metade da dosagem inicial, foi administrada durante o procedimento cirúrgico, em casos em que o animal demonstrou sinais de desconforto.

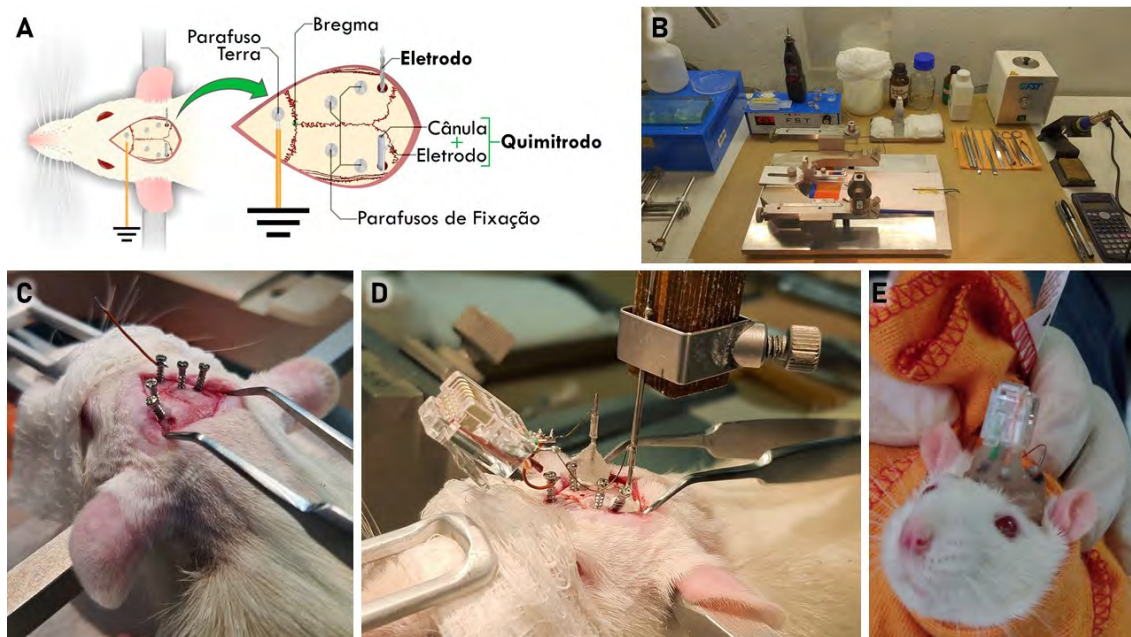
Após a confirmação de que o animal se encontrava devidamente anestesiado foi realizada a tricotomia de seu escalpo, seguida pelo posicionamento do animal e fixação de seu crânio no aparelho estereotáxico. Sobre os olhos do animal foi colocada uma gaze embebida em solução salina, para evitar o ressecamento dos olhos. Foi então realizada, com o uso de álcool 70%, a assepsia da região da cabeça onde foi aplicada uma injeção subcutânea de lidocaína (dose única 0,2 ml; cloridrato de lidocaína 2% contendo epinefrina na combinação de 1:100.000) visando analgesia e redução do fluxo sanguíneo no local. Sob a linha média foi realizada uma incisão longitudinal de aproximadamente 2 cm para exposição do crânio. Pele, músculo, e periósteo foram afastadas para evidenciar

as suturas ósseas utilizadas como referência. O corte foi então limpo utilizando água oxigenada.

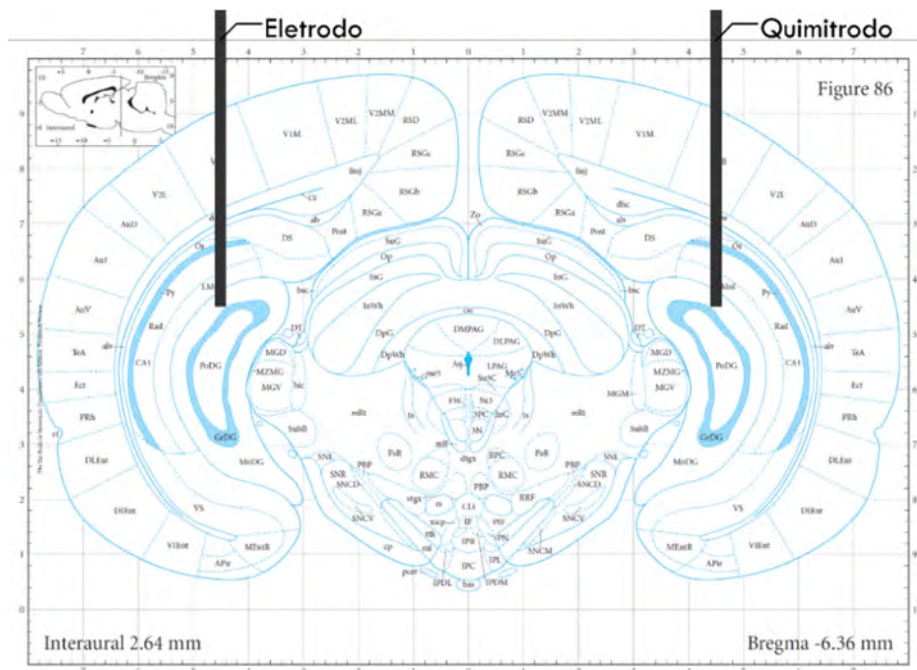
Utilizando uma broca de pequeno diâmetro, devidamente esterilizada, foram perfurados cinco orifícios no crânio para o posicionamento de quatro parafusos de fixação e um parafuso terra, assim como esquematizado na Figura 4.

Utilizando-se o bregma como referência anteroposterior (AP) e médio-lateral (ML) e a dura-máter como referência dorsoventral, (DV) foram implantados, segundo as coordenadas do atlas de Paxinos e Watson (2007):

- Um quimitrodo (cânula + eletrodo), implantado unilateralmente no hipocampo esquerdo (AP: -6,3 mm; ML: + 4,5 mm; DV: -4,5 mm).
- Um eletrodo de registro monopolar, implantado unilateralmente no hipocampo direito (AP: -6,3 mm; ML: - 4,5 mm; DV: -4,5 mm).

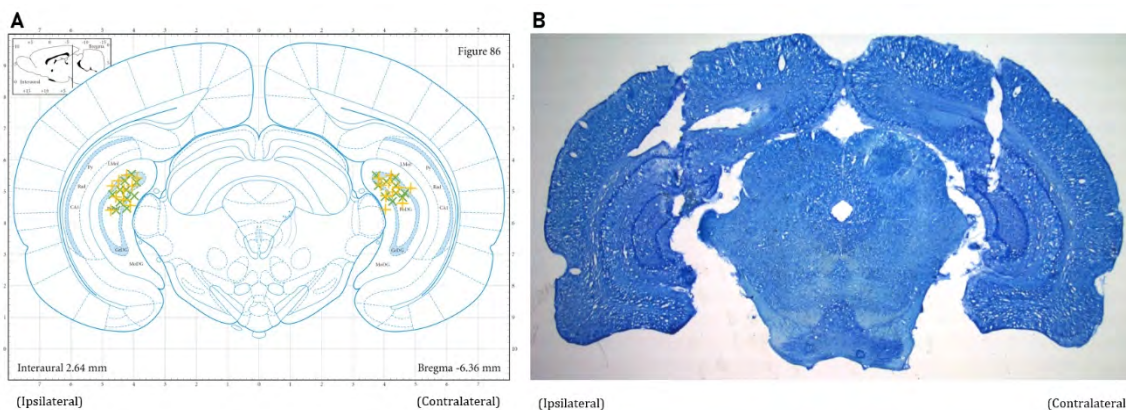


**Figura 4.** (A) Esquema que ilustra o posicionamento dos parafusos de fixação, parafuso terra, eletrodo e quimitrodo. O parafuso terra foi implantado no osso frontal, deslocado aproximadamente um milímetro para a direita da linha mediana. Os parafusos de fixação foram inseridos nos ossos parietais, dois parafusos no osso parietal direito e dois no esquerdo, oferecendo assim pontos de fixação para o acrílico do capacete. O eletrodo foi implantado nas coordenadas estereotóxicas AP: -6,3 mm; ML: -4,5 mm; DV: -4,5 mm e o quimitrodo nas coordenadas AP: -6,3 mm; ML: + 4,5 mm; DV: -4,5 mm, tomando a dura-máter como referência DV e o bregma como referência AP e ML. (B) Aparato cirúrgico utilizado. (C) Posicionamento dos parafusos e orifícios para implante de quimitrodo e eletrodo. (D) Quimitrodo e eletrodo soldados ao conector. (E) Animal acordado com o capacete pronto, sendo contido usando uma flanela de algodão.



**Figura 5.** Esquema de um corte coronal do encéfalo de rato indicando a posição em que foram implantados o eletrodo e o quimitrodo (modificado de PAXINOS & WATSON, 2007).

Os eletrodos e fio terra foram soldados a um conector macho de seis pinos, utilizado para acoplar os eletrodos ao cabo de registro. Os eletrodos foram então cimentados com cimento de zinco odontológico e cobertos com resina acrílica autopolimerizável. Foi administrado no período pós-operatório, de acordo com a solicitação do CEUA, o anti-inflamatório, analgésico e antitérmico flunixinina meglumina (Banamine Injetável; Schering--Plough; 2,5 mg/kg, s.c.). Após o procedimento cirúrgico o animal permaneceu de 6 a 8 dias no Biotério do Departamento de Fisiologia da FMRP-USP, para recuperação, antes de se iniciar os próximos procedimentos.



**Figura 6.** Confirmação histológica da posição dos quimitrodos e eletrodos. (A) Posições das pontas dos eletrodos dos animais incluídos nas análises. (B) Fotomicrografia ilustrativa (rato R03; neØ) do posicionamento dos quimitrodo e eletrodo; coloração histológica de azul de toluidina.

### 3.3. Administração de CBDne ou neØ e indução de SE

Passados entre 6 a 8 dias de recuperação os animais foram designados ou ao grupo CBDne, ou ao grupo neØ. Ratos do grupo CBDne receberam, por via i.p., uma dose única da nanoemulsão contendo CBD. Como a concentração final do CBD na nanoemulsão pode variar a cada lote produzido (entre 29,55 mM e 35,09 mM), o volume a ser administrado teve pequenas variações, mantendo-se, no entanto, fixa a dose do ativo (25 mg/kg). Ratos do grupo neØ receberam a nanoemulsão vazia. A dose administrada nos animais neØ foi calculada com base no volume/peso administrado nos animais CBDne, mantendo assim constante a dose do excipiente em ambos os grupos. As administrações de CBDne ou neØ foram realizadas 6 horas antes da microinjeção de PiloIH, tempo necessário para que o CBD fosse liberado.

Passadas 5 horas e meia após a administração da substância teste, os animais foram colocados para registro eletrográfico da linha de base (*baseline*), assim como descrito no tópico seguinte. Passados 30 min de registro, foi realizada a administração de PiloIH. Durante a aplicação da PiloIH os animais foram contidos com o auxílio de uma flanela de algodão, com o intuito de restringir seus movimentos (Figura 4-E). Foi então administrado 1 µL, de pilocarpina (1,2 mg/µL; em salina 0,9%) a uma velocidade de 0,5 µL/min. Para esse procedimento utilizamos uma seringa de microinjeção de 10 µL conectada a uma bomba de microinjeção. Terminada a microinjeção os animais permaneceram com a agulha na cânula por mais 1 min, permitindo que a pilocarpina deixasse a cânula e fosse absorvida pelo tecido nervoso. Todos os animais receberam uma dose de Diazepam (5 mg/kg; i.p.) 90 minutos após início de SE, para bloqueio das crises. Os animais que não desenvolveram SE receberam a mesma dose de Diazepam 100 minutos após injeção da PiloIH. Após o experimento animais receberam 5 ml de solução salina com 5% de glicose.

### 3.4. Registro de vídeo-EEG

Para a realização do registro de EEG, os animais foram colocados individualmente em uma caixa de acrílico, cilíndrica e transparente, de 37 cm de diâmetro e 50 cm de altura, envolvida por uma tela metálica aterrada (gaiola de *Faraday*), para prevenir ruídos no registro. O conector na cabeça do animal foi ligado a um *headstage*, que transforma o sinal eletrofisiológico de alta para baixa impedância, permitindo uma redução dos ruídos. O cabo de registro conecta então o *headstage* a um anel giratório (*slip ring*) no topo da

caixa, o que permite que o cabo possa girar livremente e garante amplitude de movimento ao animal. Os sinais eletrofisiológicos foram registrados a uma taxa de amostragem de 2 kHz e intervalo de -10 a 10 mV, sendo esse registro conjugado ao vídeo, capturado por uma *webcam*. A captura do registro foi realizada sem qualquer manipulação adicional (exceto pré-amplificação), toda a filtragem foi realizada *offline* durante o processo de análise. Para conversão analógica-digital e captura do registro e vídeo conjugado, utilizamos o sistema *PowerLab® 8/30 (AD Instruments)* e o *software LabChart® Pro 8.0 (AD Instruments)*, instalado no computador.

### **3.5. Perfusão e coleta de tecido**

A eutanásia e perfusão dos animais foi realizada 24 h após o fim do SE. Antes do início da perfusão os animais foram anestesiados com uma superdose de *Ketamina* (cloridrato de cetamina 10%; 120 mg/kg) e *Xilazina* (cloridrato de xilazina 2%; 80 mg/kg). A perfusão aórtica foi realizada com auxílio de uma bomba de perfusão, com um fluxo controlado de 20 mL/min. Foram perfundidos, inicialmente, 300 ml de uma solução de tampão fosfato (PBS, 100 mM, pH 7,4) e, posteriormente, 300 ml de uma solução de paraformaldeído (PFA; 4% em PBS 100 mM; pH 7,4).

Terminada a perfusão, os cérebros foram removidos e pós-fixados, por imersão, em PFA (4% em PBS 100 mM; pH 7,4) por dois dias em temperatura ambiente e em seguida, transferidos à solução de sacarose 30% em PBS, para crioproteção dos tecidos. Os frascos contendo os tecidos foram mantidos em geladeira até que o tecido absorvesse a sacarose por osmose e precipitasse no frasco. Após esse processo os cérebros foram congelados no criostato e preservados no freezer a -20°C, até que os mesmos fossem cortados no criostato.

### **3.6. Rotina MATLAB® para análise eletroencefalográfica**

Para análise dos dados coletados, foi escrita uma rotina (*script*) em linguagem *MATLAB® (The MathWorks, Inc.)*, que realiza a análise de forma semiautomática, requerendo *inputs* mínimos. Este *script* foi criado com o intuito de automatizar o processo de análise, tornando-o mais consistente e desviesado, mas também, com intuito de expandir as possibilidades de análise oferecidas por sistemas comerciais e servir como plataforma que pode ser expandida e utilizada em projetos futuros. A análise realiza a detecção automática de crises eletrográficas no registro de EEG, quantifica a duração e a frequência dessas crises, detecta a presença de SE, quantifica a potência média de

frequências presentes em épocas definidas do registro, gera figuras e exporta os dados quantificados. Esse sistema conta ainda com uma interface gráfica do usuário (GUI; do inglês *graphical user interface*), permitindo sua utilização por usuários sem qualquer conhecimento prévio em programação na linguagem *MATLAB*®. Os registros foram exportados para o formato *‘.mat’* (arquivo de armazenamento do *MATLAB*®) utilizando o próprio *LabChart*®.

Em suma, o *script* de análise inicia com seleção do arquivo contendo os registros de um animal. Após a seleção, uma janela surge contendo campos para inserção de identificações, como o experimento, o grupo experimental, identificador do animal e nomes dos canais. A rotina de forma automática busca no arquivo essas informações, mas permite sua modificação. Essas identificações serão utilizadas para nomear arquivos e como título de gráficos. Ainda que somente dois eletrodos tenham sido utilizados nesse protocolo, a rotina foi construída de forma a acomodar a análise de até 5 canais, com possibilidade de fácil expansão, caso necessário. Os dados do registro são então importados e o sinal passa por um pré-processamento, sendo reamostrado a 1 kHz (*downsampling* necessário devido às limitações de *hardware*) e filtrado digitalmente com um filtro passa-altas (*High-pass filter*) de 0,5 Hz e um filtro rejeita-faixa (*Notch filter*) de 60 Hz. Após o pré-processamento o sinal é exibido permitindo a seleção da linha de base e do ponto onde se encerra a microinjeção de PiloIH. Após essa seleção uma nova janela surge permitindo a seleção de parâmetros utilizados na análise e detecção da crise. Nesta mesma janela, uma figura apresenta a pré-visualização da detecção.

A detecção da crise é realizada com base na amplitude do sinal após filtragem com um filtro passa-altas. Esse sinal é então separado em segmentos, sendo então calculado a raiz média quadrada (RMS, do inglês *root mean square*) a partir de cada segmento, esse valor calculado representa a média da amplitude absoluta do sinal. Uma média deslizante é então aplicada, no *array* contendo os valores de RMS calculados, assim, suavizando o sinal de saída. O tamanho dos segmentos utilizados no cálculo do RMS e tamanho da janela da média deslizante, definem a resolução temporal da detecção. Esse sinal de saída é então normalizado, sendo dividido pelo valor do RMS da linha de base. Os valores presentes na série temporal resultante, expressos em unidade arbitraria, representam quantas vezes a amplitude do sinal excede a amplitude da linha de base, ou seja, valores inferiores a 1 possuem amplitude inferior a linha de base, enquanto valores superiores a 1 possuem amplitude superior à linha de base. Esse sinal obtido é então comparado a um

limiar, de forma que, valores superiores a esse limiar indicam a presença de atividade ictal. Uma duração mínima dessa atividade é então utilizada como critério para identificação de crises. Um outro parâmetro que tem que ser definido para a identificação do SE e o intervalo entre eventos ictais para que sejam considerados crises distintas. Ainda o *script* permita a seleção de uma diversidade de parâmetros, os parâmetros utilizados foram padronizados para todas as análises permitindo comparabilidade entre diferentes animais. Esses padrões foram definidos e otimizados de forma a identificar a atividade ictal hipocampal, mas diferentes parâmetros podem ser necessários para identificação de crises em outras estruturas. Outros parâmetros que podem ser definidos são a duração da análise após o início das crises e o tamanho das épocas que serão utilizados para calcular a potência de banda de frequência. Após a definição destes parâmetros, o *script* segue para as figuras e análises.

O *script* gera um total de quatro figuras para cada canal: (1) Serie temporal com o sinal e as crises detectadas, indicando o início das crises e o início de SE (caso este esteja presente); (2) *Plot* da detecção das crises; (3) Espectrograma do sinal; e (4) Gráfico da potência de banda de frequência. A potência média de cada segmento é calculada para as faixas de frequência: Global (0,5 Hz - Frequência de *Nyquist*), *Delta* (0,5-4 Hz), *Teta* (4-8 Hz), *Alfa* (8-13 Hz), *Beta* (13-30Hz), *Gama* baixa (30-80 Hz) e *Gama* alta (>80 Hz) sendo esses valores então normalizados pela linha de base. Após gerar os gráficos uma janela *pop-up* verifica se o usuário gostaria de salvar os gráficos e análise. Caso este opte por salvar, as figuras são exportadas no formato *TIFF* e os resultados das análises, como latência para início de crises e SE, duração e frequência das crises, e os dados de potência são exportados para uma planilha do *Microsoft® Office Excel (Microsoft Corporation)* em formato '.xlsx'. Para maiores detalhes sobre o *script*, ver Anexo I. O *script* foi disponibilizado integralmente na plataforma *MATLAB Central File Exchange*.

### **3.8. Parâmetros de detecção de crises epiléticas e SE.**

Os padrões epileptiformes são definidos pela presença de espículas paroxísticas de amplitude média superior a duas vezes a linha de base após a filtragem de ambos os sinais (linha de base e época de interesse) com filtro passa-altas de 4 Hz, removendo assim oscilações Delta, de alta amplitude, que podem interferir na detecção (NISSINEN et al., 2000). Para identificação de atividade ictal os padrões epileptiformes tem que se sustentar por uma duração mínima de 3 s, permitindo a separação de atividade ictal e

interictal (FISHER et al., 2014b). Enquanto que o SE é definido de forma prática como uma atividade elétrica, compatível com padrões epileptiformes, sendo essa atividade sustentada de forma ininterrupta por um período superior a 30 min (TRINKA et al., 2015). Para esse propósito são consideradas interrupções períodos superiores a 10 s em que se há a ausência de atividade ictal.

Outros parâmetros utilizados incluem:

- Tamanho da janela da linha de base: 10 min;
- Tamanho dos segmentos utilizados no cálculo do RMS: 100 ms;
- Tamanho da janela da média deslizante, aplicada ao *array* contendo os valores calculados de RMS: 25 segmentos.

### 3.9 Critérios de análise do vídeo-EEG

As análises comportamentais são realizadas por meio do estudo do Vídeo-EEG que correlaciona (em sincronismo) os achados eletroencefalográficos com os comportamentos dos animais. Os comportamentos apresentados durante as crises são classificados conforme o índice de gravidade para as crises epiléticas de Racine (1972) modificado por Pinel e Rovner (1978; Tabela 3).

**Tabela 3.** Índice de gravidade para crises epiléticas. Racine (1972) modificado por Pinel e Rovner (1978).

<b>Classe 1</b>	Automatismos orofaciais
<b>Classe 2</b>	Mioclonias de cabeça
<b>Classe 3</b>	Mioclonia de patas anteriores
<b>Classe 4</b>	Elevação ( <i>rearing</i> )
<b>Classe 5</b>	Elevação e queda ( <i>falling</i> )
<b>Classe 6</b>	Mais de uma crise classe 5
<b>Classe 7</b>	Corridas e pulos
<b>Classe 8</b>	Convulsão tônico-clônica generalizada

### **3.10. Estudo de incorporação do CBD em nanoemulsão**

A formulação do CBDne, avaliada neste trabalho, foi desenvolvida, produzida e caracterizada em colaboração com o grupo de pesquisa coordenado pelo **Prof. Dr. Antônio Claudio Tedesco** (Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Departamento de Química – USP). Testes preliminares *in vitro* foram realizados em colaboração com o **Dr. Rui Milton Patrício da Silva Junior** (FMRP- USP), coorientador deste projeto. O CBD foi cedido pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina (INCT-TM; FAPESP Proc. 14/50891-1; CNPq Proc. 465458/2014-9), a qual esse projeto está vinculado.

#### **3.10.1. Curva analítica padrão de CBD em solvente orgânico por espectroscopia de absorção no UV-Vis**

Para a construção da curva padrão de CBD em metanol, utilizada na quantificação do ativo (CBD) nas formulações, foram utilizadas cubetas de quartzo de caminho óptico de 1 cm e o espectrofotômetro (*Ultrospec 7000, GE*), com varredura na faixa entre 250 e 350 nm. A curva foi construída em triplicata, utilizando o metanol como solvente orgânico, com 10 concentrações diferentes, variando entre 0,05 e 1,1 mM de CBD.

#### **3.10.2. Quantificação da CBDne**

Para a quantificação de CBD na nanoemulsão, 25 µL da formulação foi rompida com DMSO e auxílio de banho de ultrassom por 40 minutos. Em seguida, a mesma foi diluída com metanol até obter o volume total de 1500 µL. O mesmo procedimento foi realizado com a neØ para ser utilizada com “branco” no espectrofotômetro. O experimento foi realizado em triplicata, com obtenção dos espectros.

#### **3.10.3. Caracterização físico-química das nanoemulsões e acompanhamento da estabilidade**

Todas as formulações foram caracterizadas quanto ao tamanho médio, índice de polidispersão e potencial zeta (tanto o tamanho quanto PDI foram determinados à 25°C por um laser com dispersão de luz no ângulo de 173°, e o potencial zeta, medido pela mobilidade eletroforética, ambos no equipamento ZetaSizer®, Nano ZS, *Malvern PCS Instruments, UK*). Para a quantificação das formulações, foram utilizadas cubetas de quartzo de caminho óptico de 1 cm e o espectrofotômetro (*Ultrospec 7000, GE*), com varredura na faixa entre 250 e 350 nm.

### 3.11. Delineamento experimental

Os animais foram inicialmente submetidos a cirurgia estereotáxica para implante de quimitrodo e eletrodo de registro. Passados de 6 a 8 dias de recuperação cirúrgica, esses animais foram separados em dois grupos experimentais: No grupo CBDne foi administrada uma injeção de CBDne (CBD a 25 mg/kg; i.p.), no grupo neØ foi administrada uma injeção i.p., de mesmo volume, da nanoemulsão vazia. O registro de vídeo EEG foi iniciado 30 minutos antes da microinjeção de PiloIH, para obtenção do registro da linha de base, e mantido até o bloqueio das crises. A indução de SE foi realizada via microinjeção de PiloIH, efetuada 6 horas após a administração do CBDne ou da neØ. Após seu início, o SE foi mantido por 90 minutos, sendo então administrada uma injeção i.p. de Diazepam (5 mg/kg) para bloqueio das crises. Os animais que não desenvolveram SE receberam a mesma dose de Diazepam 100 minutos após a injeção de PiloIH. Foi realizada, 24 h após o término do SE, a perfusão dos animais e coleta dos tecidos para análises histológicas.

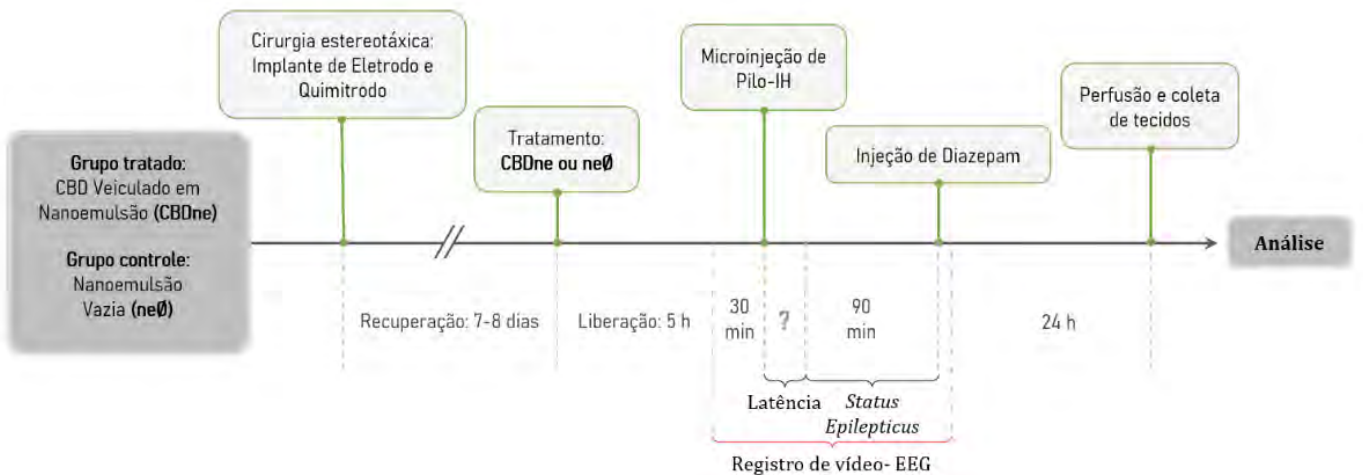


Figura 7. Linha temporal esquematizando o protocolo experimental. Descrição no texto.

## **RESULTADOS**

## 4. RESULTADOS

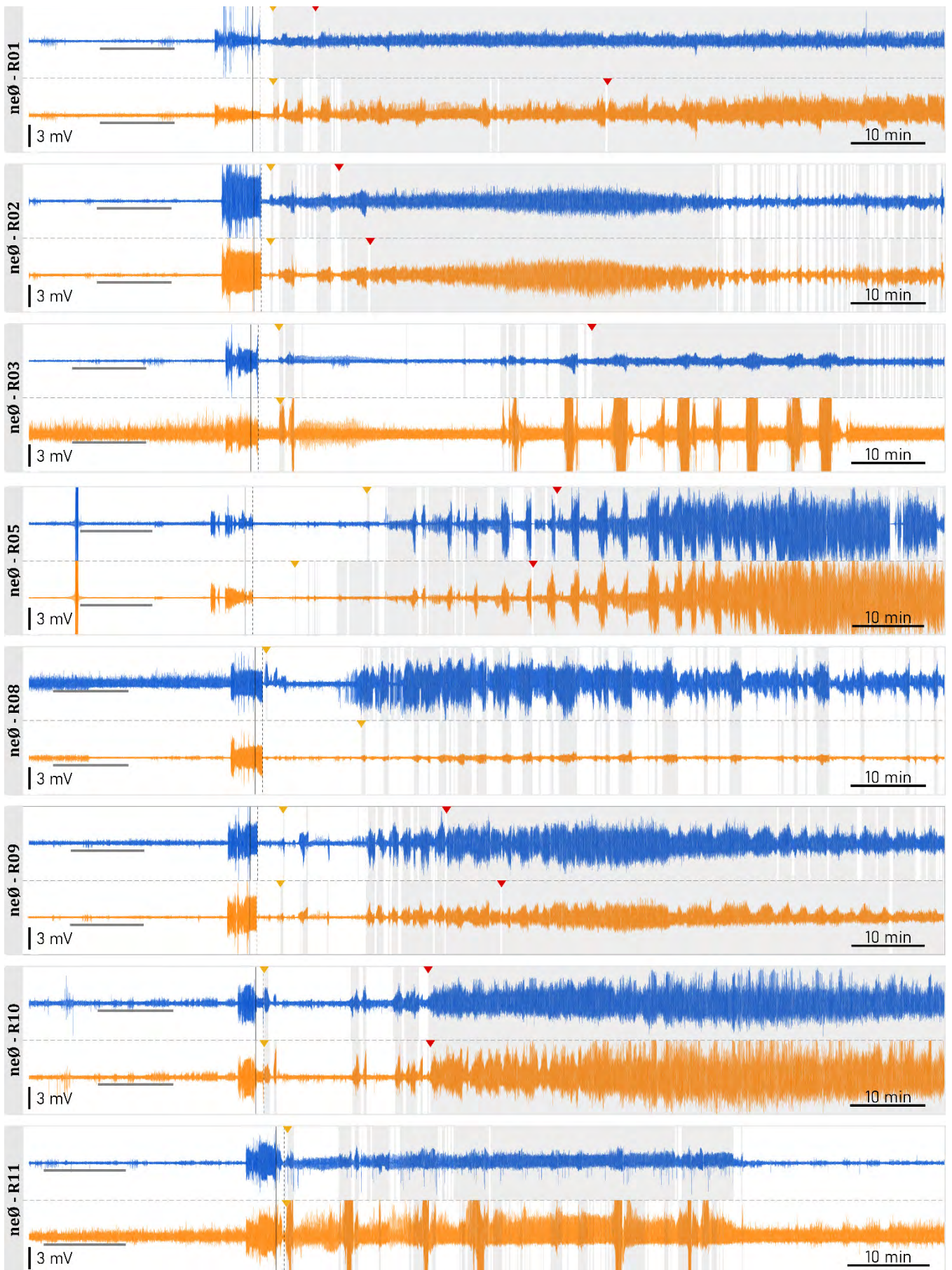
### 4.1. Análise de Registro Eletroencefalográfico

#### 4.1.1. Análise de Série-temporal

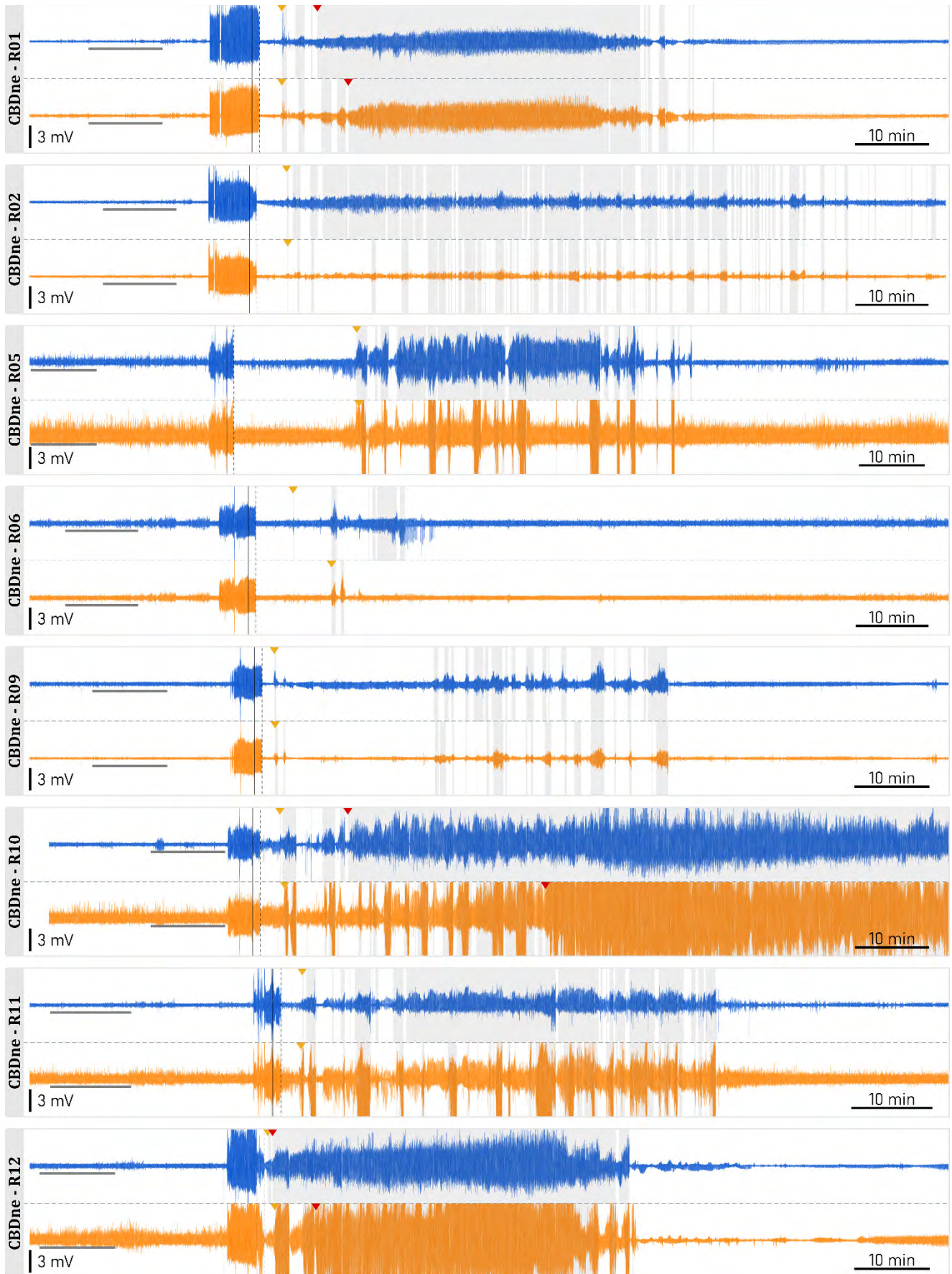
Nas Figuras 8 e 9 estão apresentados os registros de EEG de ambos os hipocampos, ipsilateral e contralateral à microinjeção de PiloIH. Cada serie temporal apresenta o registro dos 30 minutos precedentes à microinjeção, até o fim da janela de 90 minutos, iniciada após o surgimento da primeira crise eletrográfica apresentada pelo animal. Nos registros é possível notar a presença de um sinal de alta amplitude nas adjacências ao período de injeção, que não deve ser confundido com uma crise. Esse sinal se trata de um ruído e deve-se à manipulação dos animais, visto que estes foram removidos da gaiola de *Faraday* para realização da microinjeção. Esse ruído foi utilizado como referência visual durante as análises, que se iniciam após esse ruído. Para as análises de latência, apresentadas no tópico seguinte, é considerado que o final da microinjeção ocorreu 1 minuto antes do fim da manipulação.

Na Figura 8 estão apresentados os registros dos animais do grupo neØ ( $N=8$ ), cujas análises eletroencefalográficas foram realizadas. Nesse grupo experimental, dos oito animais analisados, seis evoluíram para SE. Já na Figura 9 estão apresentados os registros dos animais do grupo CBDne ( $N=8$ ). Nesta, podemos observar que SE foi detectado apenas nos ratos R01, R10 e R12.

É ainda necessário mencionar que os registros do rato R11 do grupo neØ e do rato R11 do grupo CBDne foram interrompidos após terem passado apenas 80 min após a primeira crise eletrográfica, devido a problemas no registro (má conexão do cabo). Apesar dessa irregularidade, foi possível incluir estes animais nas análises quantitativas apresentadas a seguir, uma vez que estes não apresentaram crises no período desprezado, o que impactaria no cálculo da fração de tempo despendido em crises.



**Figura 8.** Registros eletroencefalográficos dos animais do grupo neØ ( $N=8$ ). Em azul e laranja, respectivamente, registros ipsilaterais (hipocampo esquerdo) e contralaterais (hipocampo direito) à microinjeção de PiloIH. Triângulos amarelos indicam o momento em que se iniciam as crises e os triângulos vermelhos, indicam o momento em que se inicia o SE. Em cinza, crises eletrográficas detectadas.



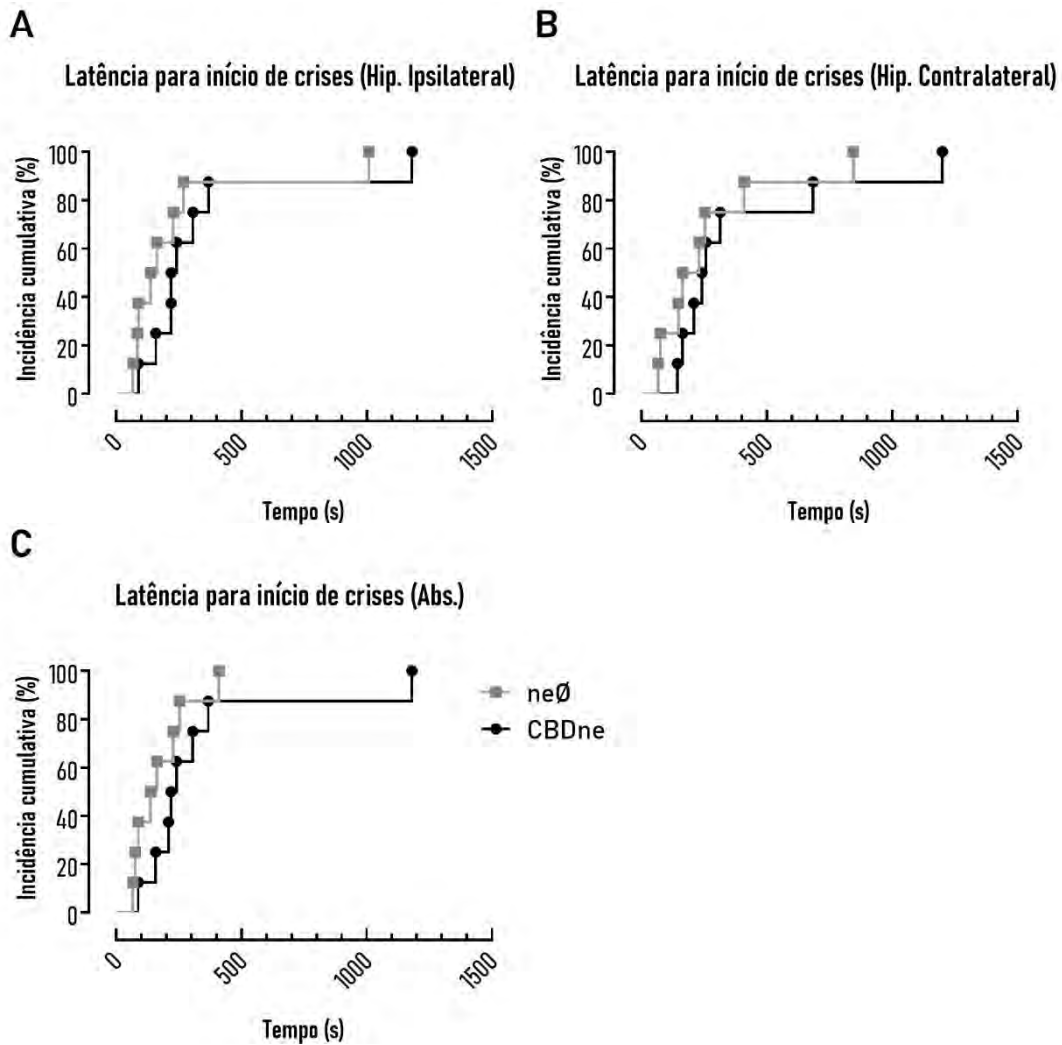
**Figura 9.** Registos eletroencefalográficos dos animais do grupo CBDne ( $N=8$ ). Em azul e laranja, respectivamente, registros ipsilaterais (hipocampo esquerdo) e contralaterais (hipocampo direito) à microinjeção de PiloIH. Triângulos amarelos indicam o momento em que foi detectada a primeira crise eletrográfica no registro, enquanto os triângulos vermelhos indicam o momento em que se inicia o SE. Em cinza, crises eletrográficas detectadas.

#### 4.1.2. Latências para início de crises epilépticas e SE

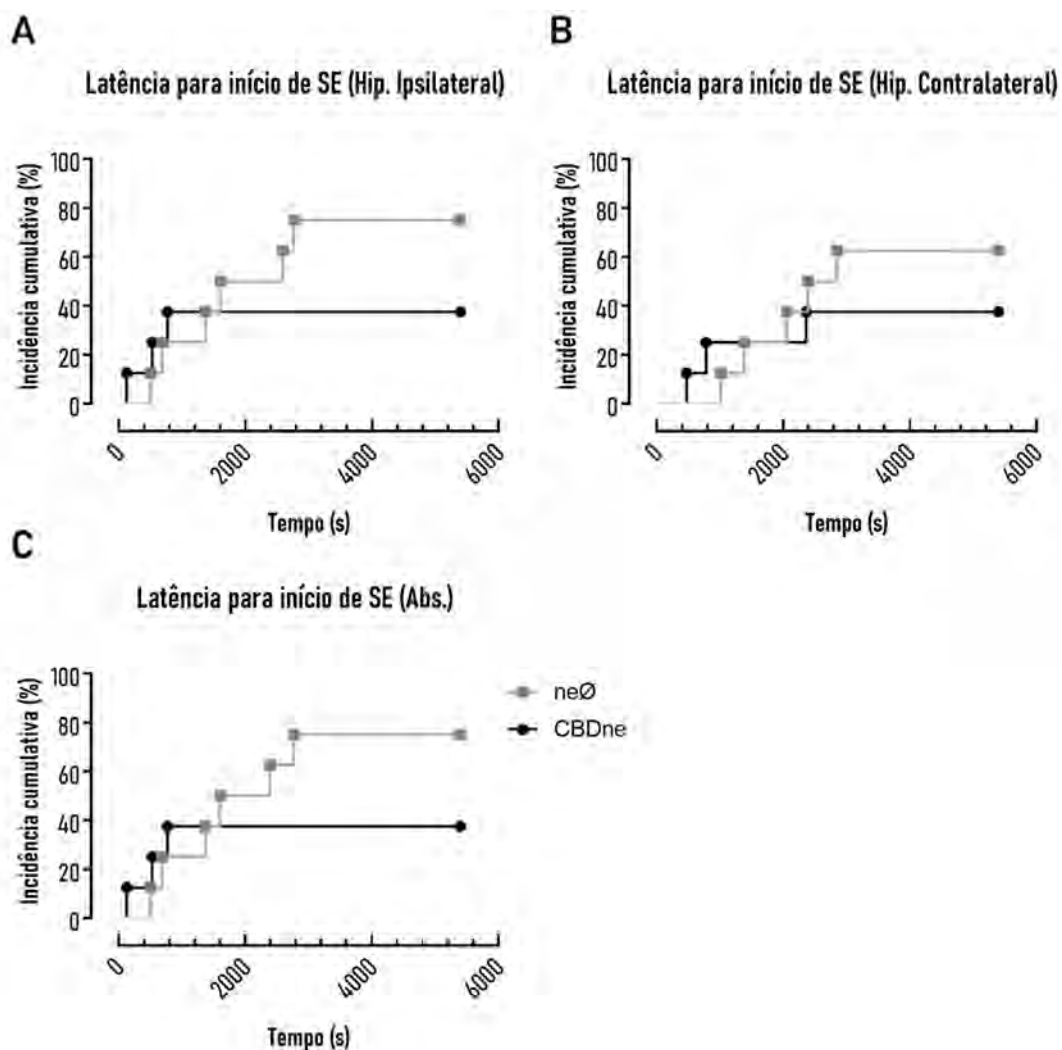
Nas Figuras 10 e 11, estão apresentados os gráficos de *Kaplan-Meier* das latências para início das crises e SE. No eixo  $x$  temos o tempo, em segundos, enquanto no eixo  $y$  temos a incidência cumulativa do evento em análise. A escolha do gráfico de *Kaplan-Meier* para apresentar as latências segue a proposta de Jahn-Eimermacher e colaboradores (2011). A medida da latência para a ocorrência de um certo ‘evento’, é comum em diversos estudos comportamentais, mas devido às limitações do experimento, ou até mesmo ao próprio desenho experimental, é possível que alguns animais não realizem o comportamento de interesse dentro do período de observação. Nessas situações, é comum que o tempo máximo de observação seja erroneamente atribuído aos animais que não realizaram o comportamento, como sendo sua latência, ou ainda, que esses animais sejam simplesmente desconsiderados na análise. No entanto, essas abordagens podem afetar os resultados, levando a conclusões equivocadas (BUDAEV, 1997). Além disso, as análises estatísticas usualmente utilizadas (teste-t e ANOVA) requerem que certas suposições sejam aceitas como verdadeiras para serem aplicadas, como distribuição normal e igualdade das variâncias, sendo estas suposições violadas quando o tempo máximo de observação é atribuído como o valor de latência aos animais que não expressam o comportamento, de forma que os dados são truncados à direita, contradizendo a distribuição normal (JAHN-EIMERMACHER et al., 2011).

Na Tabela 4, os valores de latência média e mediana de cada grupo são apresentados, assim como o *hazard ratio* entre os grupos, calculado pelo método *logrank*. O valor de *hazard ratio*, uma razão calculada entre as taxas de risco dos grupos CBDne e neØ, em todos os casos foi inferior a 1, o que indica que o grupo neØ apresenta uma taxa de risco maior que o CBDne tanto para o início de crises quanto para o início SE, no entanto, não foi encontrada diferença significativa. Ainda nessa Tabela, é necessário explicar a presença de valores indefinidos de média e mediana para o início de SE: O cálculo de latência média só pôde ser realizado em casos em que todos os animais analisados apresentaram o comportamento de interesse, crises epilépticas ou SE, enquanto a latência mediana somente pôde ser determinada quando mais da metade dos animais do grupo apresentaram o comportamento.

Foi também realizada uma análise de contingência (teste exato de Fisher) para avaliar a incidência (absoluta) de SE entre os grupos neØ e CBDne, no entanto, apesar da redução de 37,5% (neØ – CBDne), não foi encontrada diferença significativa ( $p = 0,157$ ).



**Figura 10.** Gráficos de Kaplan–Meier apresentando a latência para início de crises epiléticas. (A e B) Latência para início de crises no hipocampo esquerdo (ipsilateral) e direito (contralateral), respectivamente. (C) Latência absoluta para início de crises (considerada apenas a menor latência apresentada por cada animal). neØ (N=8); CBDne (N=8). Diferenças estatisticamente não significativas. Em A,  $p\text{-value} = 0,2849$ ; em B,  $p\text{-value} = 0,4140$ ; em C,  $p\text{-value} = 0,2849$  (Teste de Mantel-Cox).

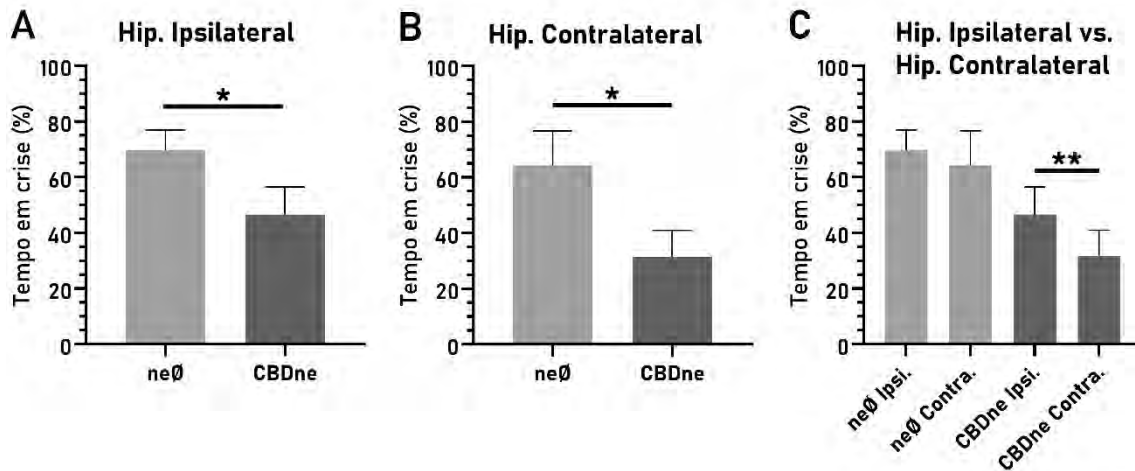


**Figura 11.** Gráficos de *Kaplan–Meier* apresentando a latência para início de SE. (A e B) Latência para início de SE no hipocampo esquerdo (ipsilateral) e direito (contralateral), respectivamente. (C) Latência absoluta para início de SE (considerada apenas a menor latência apresentada por cada animal). neØ ( $N=8$ ); CBDne ( $N=8$ ). Diferenças estatisticamente não significativas. Em A,  $p\text{-value} = 0,2948$ ; em B,  $p\text{-value} = 0,4969$ ; em C,  $p\text{-value} = 0,2948$  (Teste de *Mantel-Cox*).

**Tabela 4.** Resultados da regressão de *Cox* e estatística descritiva das latências para início de crises e SE. neØ ( $N=8$ ); CBDne ( $N=8$ ).

Latência	Comparação	neØ		CBDne		Regressão de Cox	
		Média (s)	Mediana (s)	Média (s)	Mediana (s)	<i>Hazard ratio</i> [95%-IC]	<i>p-value</i>
Início de crises	CBDne/neØ (ipsilateral)	255.11	149,5	347,1	229,45	0,599 [0,218;1,647]	0,2849
	CBDne/neØ (contralateral)	273.96	196,95	401.66	248,8	0,674 [0,248;1,831]	0,4140
	CBDne/neØ (Absoluta)	177.44	149,5	524,008	229,3	0,599 [0,218;1,647]	0,2849
Início de SE	CBDne/neØ (ipsilateral)	Indef.	2095,1	Indef.	Indef.	0,486 [0,132;1,796]	0,2948
	CBDne/neØ (contralateral)	Indef.	2621,65	Indef.	Indef.	0,613 [0,153;2,450]	0,6960
	CBDne/neØ (Absoluta)	Indef.	1995,35	Indef.	Indef.	0,486 [0,132;1,796]	0,109

### 4.1.3. Fração de tempo em crise



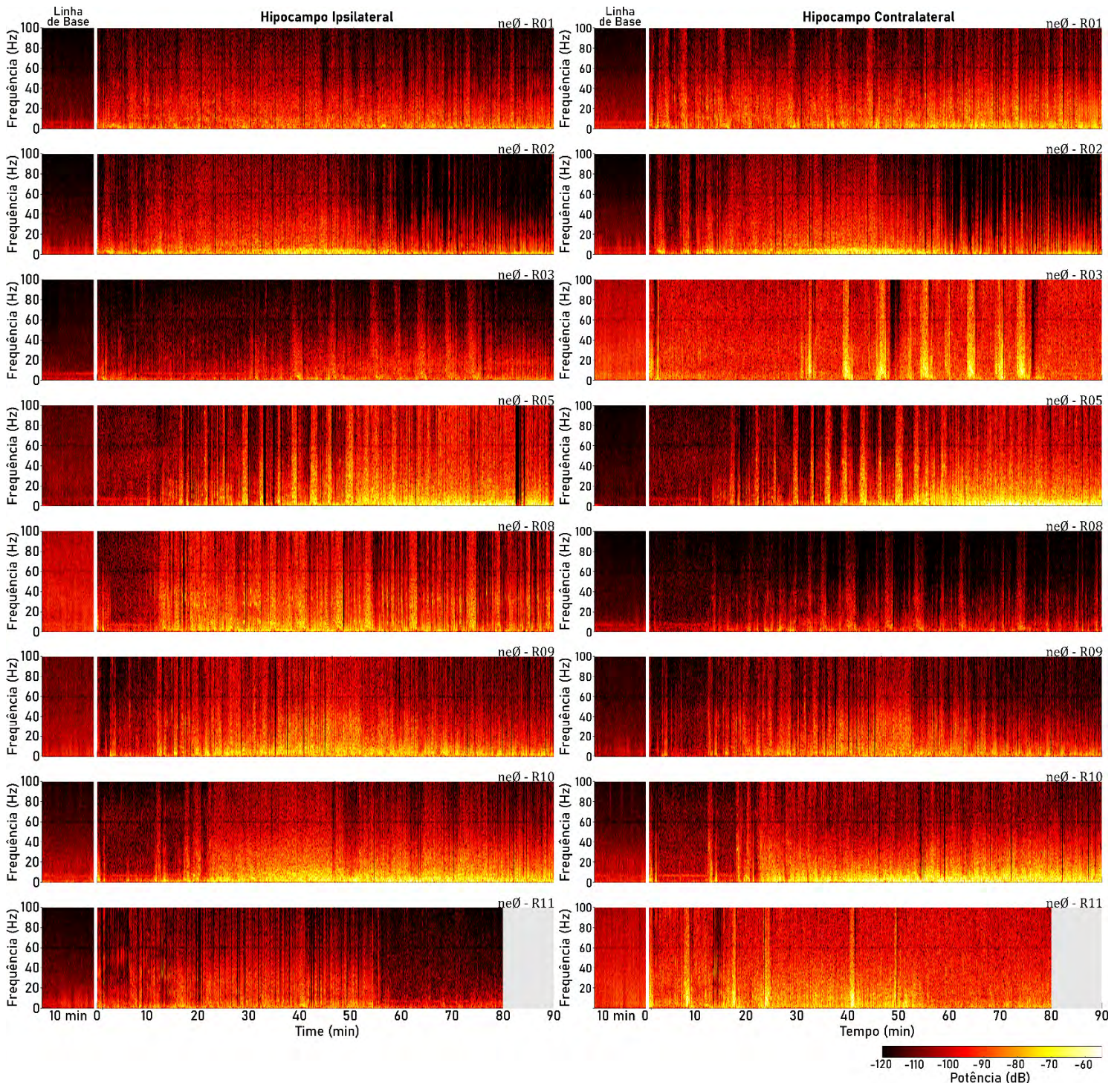
**Figura 12.** Avaliação da fração de tempo despendida em crise, considerando a janela de tempo de 90 min após a primeira crise detectada. Grupos neØ ( $N=8$ ) e CBDne ( $N=8$ ). (A) Referente aos registros do hipocampo ipsilateral à microinjeção de PiloIH. Médias: neØ = 69,73 % e CBDne = 46,52 %. Diferença entre as médias (CBDne - neØ)  $\pm$  EPM:  $-23,21 \pm 12,22$ ;  $p < 0,05$  (Teste-t com correção de Welch). (B) Referente aos registros do hipocampo contralateral à microinjeção de PiloIH. Médias: neØ = 64,25 % e CBDne = 31,56 %. Diferença entre as médias (CBDne - neØ)  $\pm$  EPM  $-32,69 \pm 15,50$ ;  $p < 0,05$  (Teste-t com correção de Welch). (C) Referente à comparação entre os hipocampos Ipsilateral e Contralateral. Diferença entre as médias (CBDne Ipsi. - CBDne Contra)  $\pm$  EPM  $-14,96 \pm 5,05$ ;  $p < 0,01$  (Teste de Wilcoxon). Os dados foram apresentados como média  $\pm$  EPM.

A Figura 12 apresenta a fração de tempo despendido em crises eletrográficas assim como detectado na janela de 90 min após a primeira crise apresentada pelo animal. Em ambos os hipocampos, ipsilateral e contralateral à microinjeção de PiloIH, foram observadas reduções na fração de tempo despedido em crise nos animais pertencentes ao grupo CBDne em comparação ao grupo neØ (Teste-t com correção de Welch;  $p < 0,05$ ). Foi também detectada diferença na fração de tempo despedido em crises entre os hipocampos Ipsilateral e Contralateral no grupo CBDne (Teste de Wilcoxon;  $p < 0,01$ ), mas não no grupo neØ.

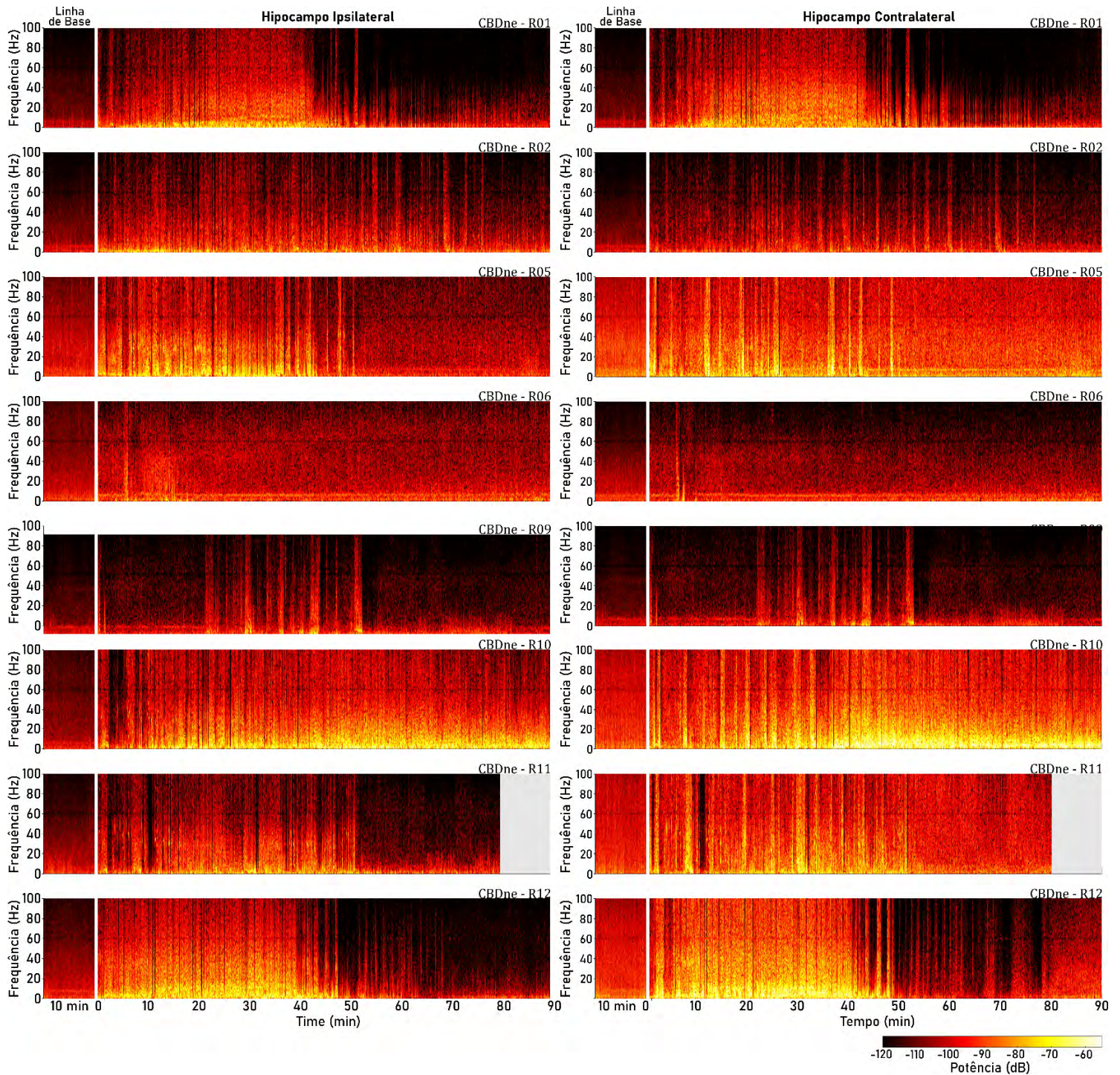
### 4.1.4. Análise espectral

As análises espectrais baseiam-se na decomposição do sinal em frequências fundamentais, descrevendo-o em função da contribuição de cada uma dessas frequências. Para que isso seja possível, métodos matemáticos, como a transformada rápida de *Fourier* (FFT, do inglês *fast Fourier transform*) e transformada de *wavelets*, precisam ser aplicados (MOYER et al., 2017). Essas abordagens permitem que o sinal seja observado

sob uma nova dimensão. Nas Figuras 8 e 9, a escala do eixo temporal foi compactada para que fosse possível observar todo o período de registro, no entanto, ao reduzirmos a escala a este ponto, muitos detalhes finos são perdidos, tornando a inspeção visual pouco informativa. Nesse sentido os espectrogramas apresentam uma grande vantagem, pois mesmo em uma escala temporal reduzida, uma grande quantidade de detalhes continua preservada.



**Figura 13.** Espectrograma dos animais do grupo neØ. Na esquerda espectrograma dos registros ipsilaterais e na direita dos registros contralaterais ( $N=8$ ). Descrição no texto.



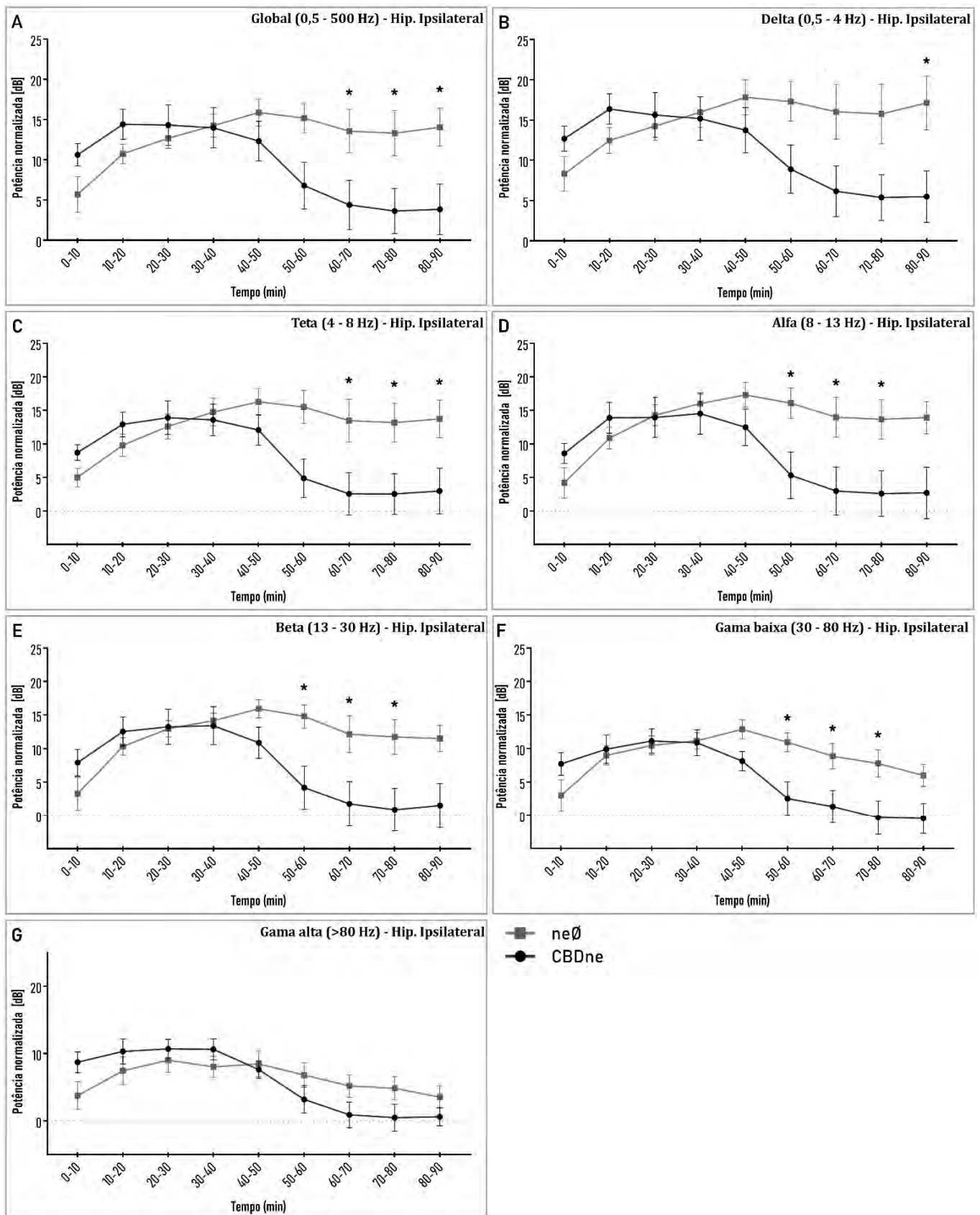
**Figura 14.** Espectrograma dos animais do grupo CBDne. Na esquerda espectrograma dos registros ipsilaterais e na direita dos registros contralaterais ( $N=8$ ). Descrição no texto.

Os espectrogramas apresentados (Figuras 13 e 14) representam uma matriz, em que cada coluna apresenta um *array* (uma matriz unidimensional) de vetores obtido pelo cálculo de uma FFT de curto termo (STFT, do inglês *Short-time Fourier transform*). A natureza de “curto termo” da STFT, deve-se à aplicação da FFT a segmentos, ou janelas (sendo por isso também conhecida como FFT janelada), do sinal, sendo a largura dessa janela representada no eixo  $x$ , como a porção de tempo decorrido. Em suma, cada ‘ponto’

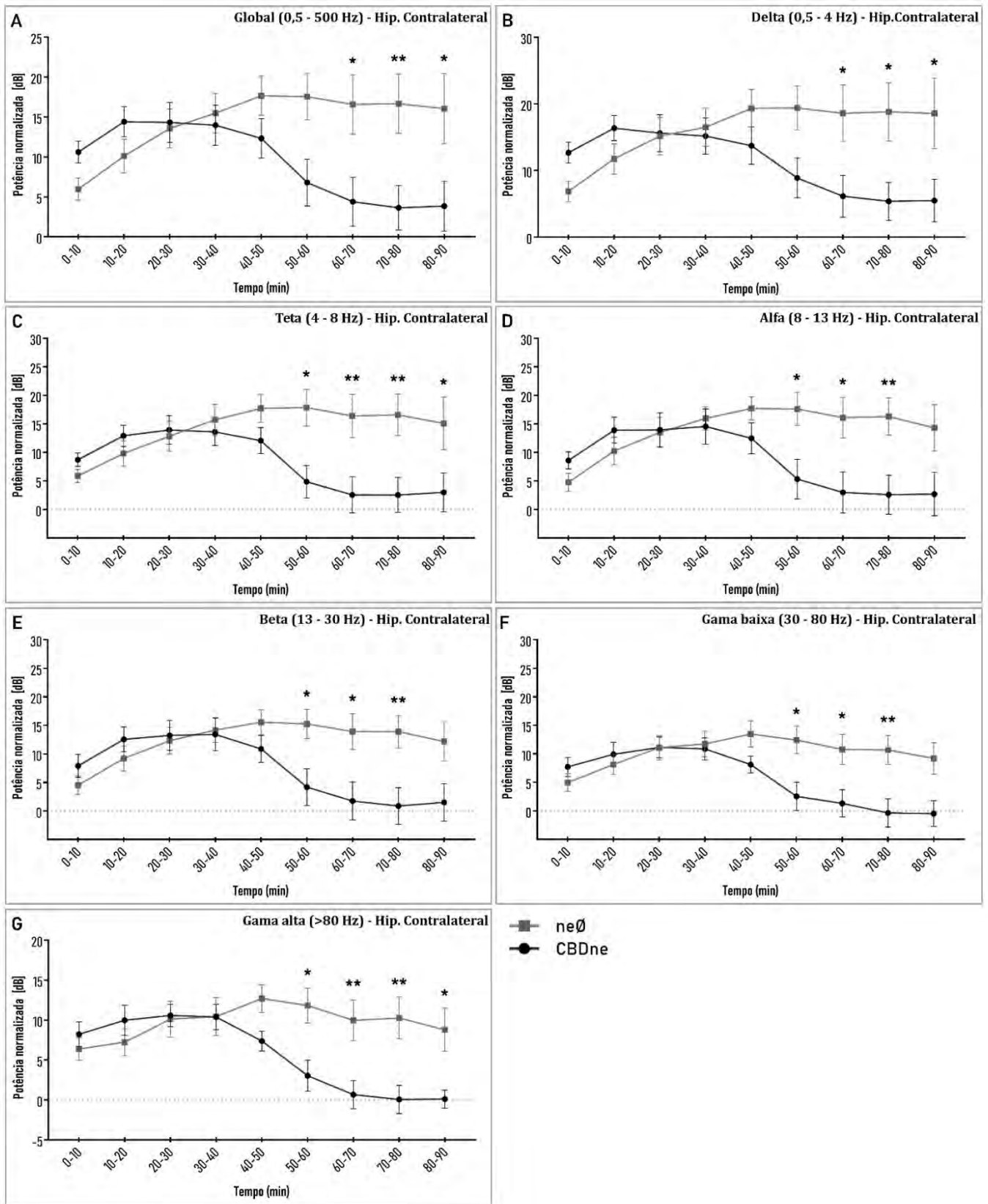
do espectrograma possui um valor de  $y$ , relativo à frequência, dois valores de  $x$ , relativos aos limites inferior e superior da janela de tempo e um terceiro valor apresentado em escala de cores, representando a ‘intensidade’ do sinal, na frequência  $y$  e janela de tempo  $x$ , nesse caso apresentado em unidade de potência em decibéis (dB). No entanto, devido à natureza não estacionária do registro de EEG, simplesmente recortar um segmento do registro poderia introduzir artefatos durante o cálculo do FFT. Para mitigar esses efeitos foram utilizados os artifícios de sobreposição de janelas e *windowing* com janela de Hamming (WALLISCH et al., 2014). Dessa forma, as Figuras 13 e 14 apresentam os espectrogramas da linha de base e dos 90 min subsequentes ao início das crises dos animais do grupo neØ (figura 13;  $N=8$ ) e CBDne (figura 14;  $N=8$ ).

Ainda que haja uma variação considerável dentro de cada grupo (Figuras 13 e 14), é possível notar a presença de algumas similaridades. De forma geral, as crises apresentadas pelos animais do grupo neØ, se não se tornam mais intensas ao passar do experimento ao menos mantem-se com igual intensidade, enquanto as crises apresentadas pelos animais do grupo CBDne se tornam abruptamente mais brandas, nos 30 ou 40 minutos finais.

Os espectrogramas, no entanto, apesar de serem bastante informativos, não nos permitem calcular de forma efetiva algum tipo de estatística que para avaliar objetivamente essa observação. Então, com o intuito de detectar essa dinâmica temporal de forma quantitativa, o *script* para *MATLAB*® extrai os mesmos 90 minutos apresentados nos espectrogramas, dividindo-os em épocas de 10 min e aplicando a cada uma dessas épocas a função *bandpower*, que calcula a potência média de uma faixa de frequência. Essa função é reaplicada a diversas faixas de frequência e as médias são então divididas pela potência da linha de base na respectiva faixa de frequência, de forma que os valores se tornem relativos à linha de base, e no final convertidos a dB.



**Figura 15.** Gráficos da potência relativa dos registros ipsilaterais, normalizada pela linha de base, comparando os grupos *neØ* ( $N=8$ ) e *CBDne* ( $N=8$ ). Potência calculada para as faixas de frequência: (A) Global (0,5-500 Hz), (B) Delta (0,5-4 Hz), (C) Teta (4-8 Hz), (D) Alfa (8-13 Hz), (E) Beta (13-30 Hz), (F) Gama baixa (30-80 Hz) e (G) Gama alta (>80 Hz). Análise de Modelo Misto com pós-teste de múltiplas comparações de Sidak (\*  $p > 0,05$ ). Os dados foram apresentados como média  $\pm$  EPM.

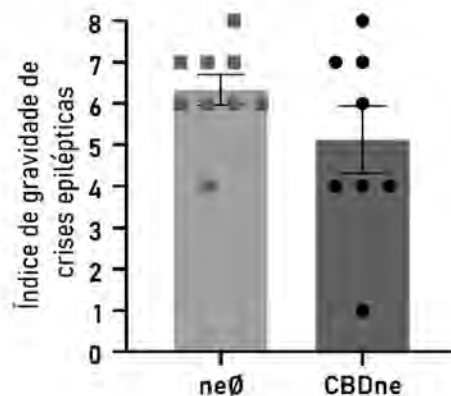


**Figura 16.** Gráficos da potência relativa dos registros contralaterais, normalizada pela linha de base, comparando os grupos neØ ( $N=8$ ) e CBDne ( $N=8$ ). Potência calculada para as faixas de frequência: Potência calculada para as faixas de frequência: (A) Global (0,5-500 Hz), (B) Delta (0,5-4 Hz), (C) Teta (4-8 H), (D) Alfa (8-13 Hz), (E) Beta (13-30Hz), (F) Gama baixa (30-80 Hz) e (G) Gama alta (>80 Hz). Análise de Modelo Misto com pós-teste de múltiplas comparações de Sidak (\*  $p > 0,05$ ; \*\*  $p > 0,01$ ). Os dados foram apresentados como média  $\pm$  EPM.

Assim, nas Figuras 15 e 16 temos os gráficos da potência relativa dos registros ipsilaterais e contralaterais comparando os grupos neØ (N=8) e CBDne (N=8). As Figuras 15-A e 16-A apresentam a dinâmica temporal dos registros na frequência global. Nestes gráficos, vemos que a potência de ambos os grupos é semelhante nos 50 a 60 minutos iniciais, sendo que de fato o grupo CBDne inicia com uma média superior à do grupo neØ, no entanto isso se inverte entre 30 e 40 minutos de análise, passando a divergir a partir deste ponto. Essa diferença pôde ser estatisticamente detectada nos 30 minutos finais, assim como havíamos observado nos espectrogramas ( $p < 0,05$ ), na comparação ponto a ponto do pós-teste de *Sidak*. Observando o formato das curvas, ao longo da maioria das faixas de frequências, em ambos os hipocampos, vemos que o grupo neØ evolui gradativamente ao longo dos 50 a 60 minutos iniciais, quando atingiu um platô, enquanto o grupo CBDne evolui rapidamente entre os 30 e 40 minutos iniciais, mas começa a decair após esse ponto.

#### 4.2. Análise de Vídeo-EEG

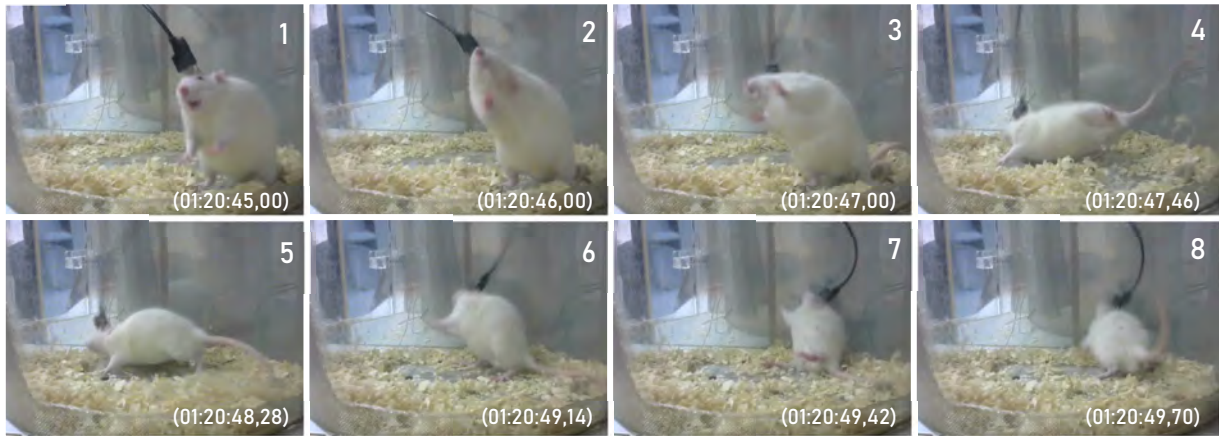
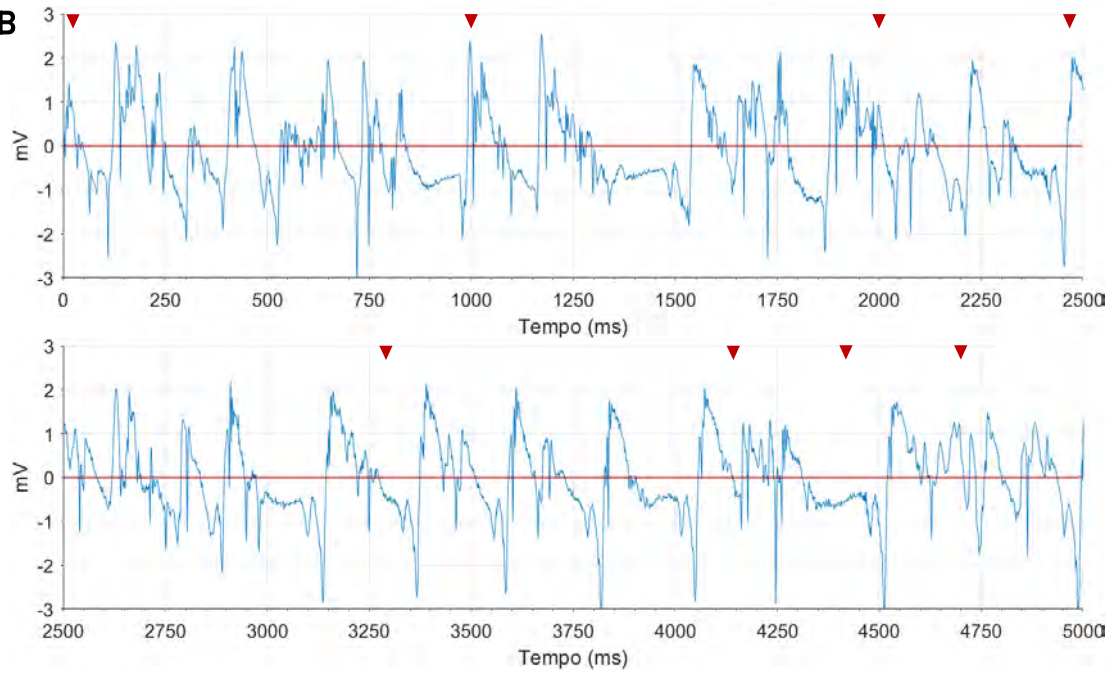
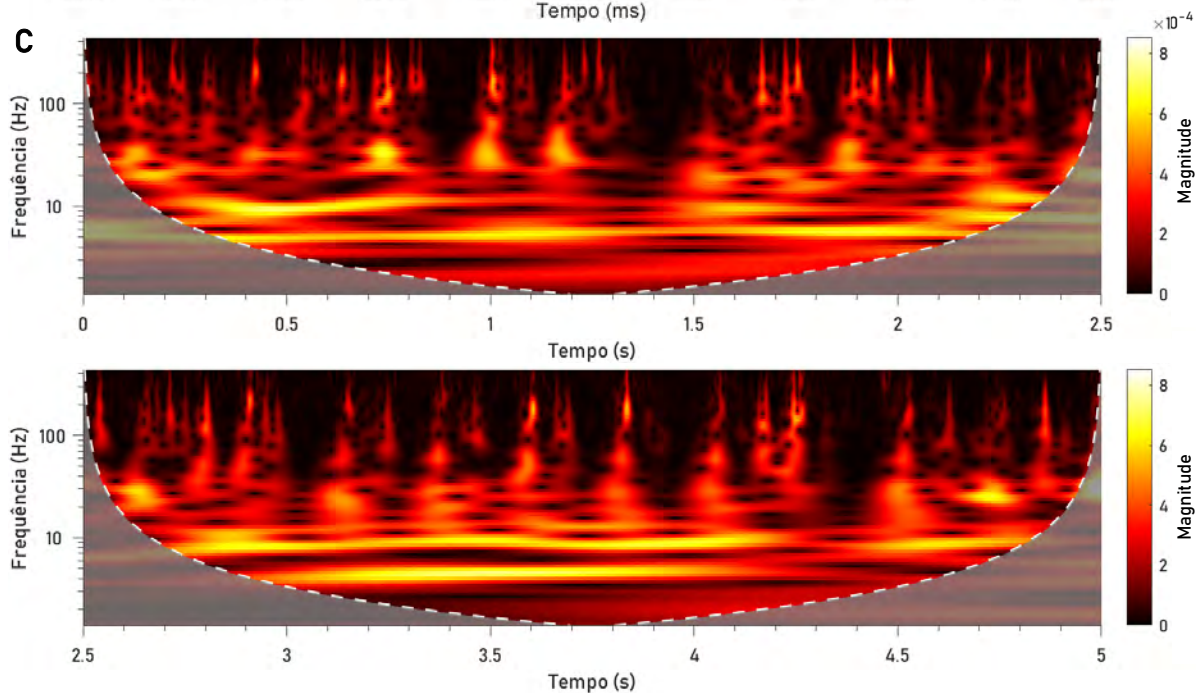
O vídeo-EEG foi analisado de acordo com o índice de gravidade para crises epilépticas de Racine (1972), modificado por Pinel e Rovner (1978). Como vemos na Figura 17, a média do *score* de gravidade do grupo CBDne não apresentou diferença estatística do grupo neØ.



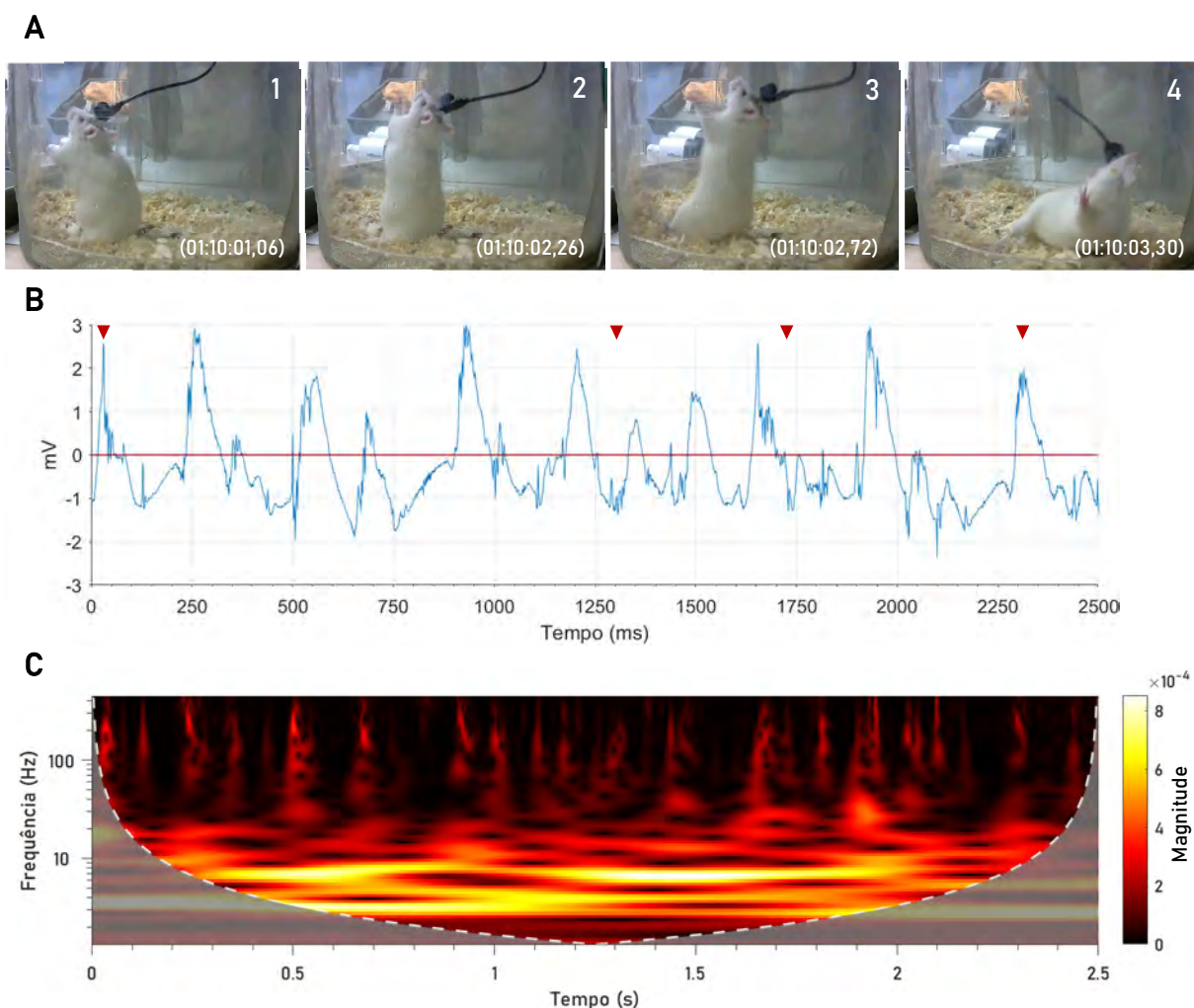
**Figura 17.** Avaliação comportamental dos grupos neØ (N=9) e CBDne (N=8), de acordo com o índice de gravidade para crises epilépticas de Racine (1972), modificado por Pinel e Rovner (1978). Médias  $\pm$  EPM: neØ =  $6,33 \pm 0,37$  e CBDne =  $5,13 \pm 0,81$ . Diferença entre as médias (CBDne - neØ)  $\pm$  EPM:  $-1,21 \pm 0,86$  teste não paramétrico, não pareado, de Mann-Whitney ( $p > 0,05$ ). Os dados foram apresentados como média  $\pm$  EPM.

A Figura 18 apresenta a sequência comportamental e registro eletroencefalográfico concomitante de um animal (rato R08) do grupo neØ. Esse animal expressou uma crise classe 6 no índice de Racine (mais de uma elevação com queda), sendo representativo do grupo neØ, cujo *score* médio ( $\pm$  EPM) foi igual a  $6,33 \pm 0,37$ . Nos painéis 1 a 4 (Figura 18-A) vemos o animal apresentar automatismos orofaciais, elevação e mioclonias de patas anteriores, seguidas pela perda postural com a flexão de cabeça e tronco para direita, provocando uma queda. Ao cair, o animal apresenta em rápida sucessão (painéis 5 a 8), mioclonias generalizadas e uma nova elevação seguida por queda. O registro de EEG (Figura 18-B) apresenta ondas regulares, de padrão similar, com predominância de oscilações nas frequências Teta, Alfa e Gama, como demonstra o escalograma de magnitude (Figura 18-C). O escalograma também demonstra a presença de oscilações de alta frequência (HFO; do inglês *High Frequency Oscillations*).

Como podemos observar no gráfico apresentado na Figura 17, o grupo CBDne obteve um *score* médio ( $\pm$  EPM) igual a  $5,13 \pm 0,81$ . No entanto, incidentalmente, nenhum animal apresentou uma crise classe 5 (uma única elevação com queda). Dessa forma, optamos por apresentar como representativo do grupo CBDne a primeira elevação com queda apresentada pelo rato CBDne-R10, que apresentou uma crise classe 6 (mais de uma elevação com queda) no índice de gravidade para crises epiléticas. Sendo assim, a Figura 19 apresenta a sequência comportamental e registro de EEG de um animal do grupo CBDne. Nos painéis 1 a 4 (Figura 19-A) observamos o animal realizar elevação com mioclonia de patas anteriores, seguido por continuidade das mioclonias e hiperextensão do torso, levando por fim, à perda postural e queda. Como confirmado pelo escalograma (Figura 19-C), observamos no registro de EEG (Figura 19-B) a presença de oscilações Teta de cerca de 5 Hz, sendo sobrepostas às cristas das ondas, oscilações de alta frequência.

**A****B****C**

**Figura 18.** Imagem representativa da sequência comportamental e registro eletroencefalográfico concomitante de um animal do grupo neØ. Em A, sequência comportamental. Em B, registro de EEG. Em C, Escalograma de magnitude. Descrição no texto.



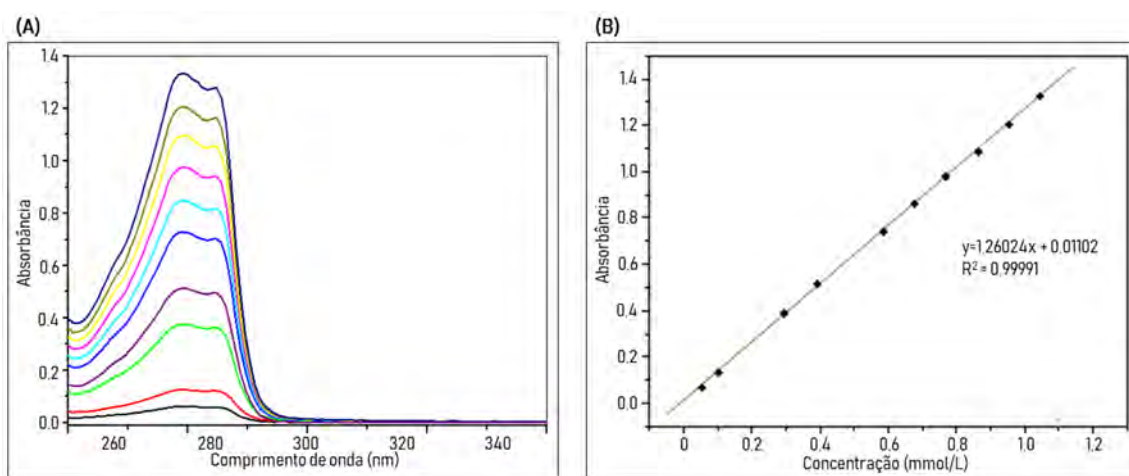
**Figura 19.** Imagem representativa da sequência comportamental e registro eletroencefalográfico concomitante de um animal do grupo CBDne. Em A, sequência comportamental. Em B, registro de EEG. Em C, Escalograma de magnitude. Descrição no texto.

### 4.3. Caracterização Físico-química da Nanoemulsão

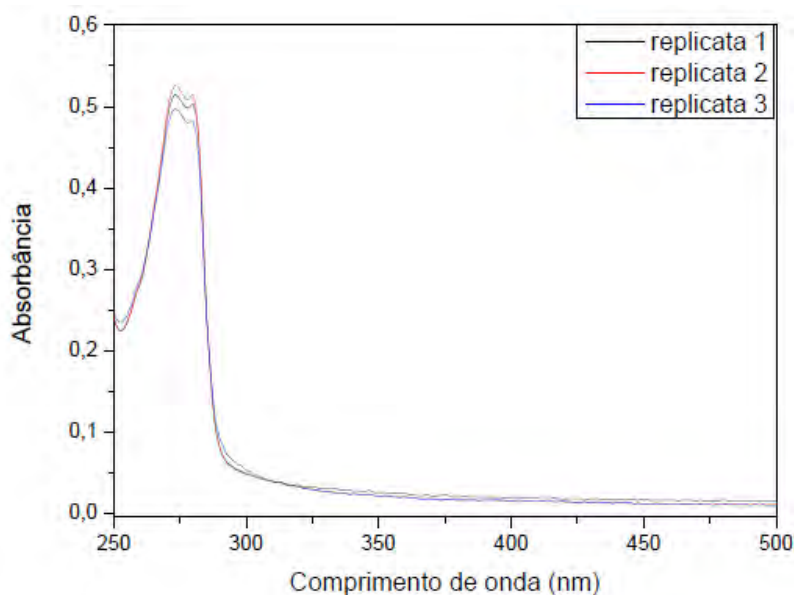
Para a quantificação do CBD contido na nanoemulsão, 25  $\mu\text{L}$  da formulação foi dissolvida com DMSO (Sigma-Aldrich) com o auxílio de banho de Ultrassom por 40 minutos. Em seguida, a formulação foi diluída com etanol (Sigma-Aldrich) até o volume total de 2000  $\mu\text{L}$ . O mesmo procedimento foi realizado com a neØ para ser utilizada com referência nas medidas espectrofotométricas. O experimento foi realizado em triplicata. Os espectros apresentaram o perfil esperado, conforme apresentado na Figura 21.

As absorvâncias obtidas no comprimento de onda de 273 nm (Figura 21) foram de 0,526, 0,515 e 0,497, que aplicadas na equação da reta (obtida pelos estudos de construção da curva de calibração de CBD em etanol:  $y = 1163,92 x + 0,00211$ ), resultaram em concentrações da ordem de 36,0 mM, 35,5mM e 34,0 mM, com um valor média de  $35,09 \pm 0,6$  mM ou  $11,03 \pm 0,20$  g/L (valores relativos ao 6º lote produzido).

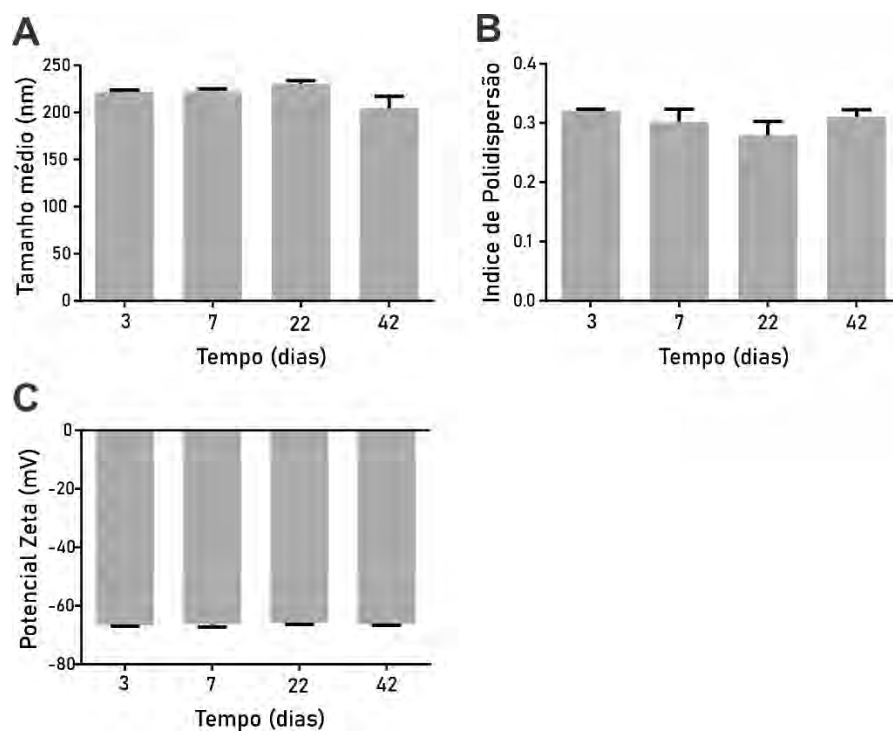
Os parâmetros de tamanho médio, PDI e potencial zeta são medidas indicativas da qualidade da nanoemulsão: a manutenção de partículas em um tamanho médio constante é um indicativo de que as partículas não se agregaram durante o período de análise; já o PDI é uma medida de variabilidade no tamanho das partículas (valores variam de 0 a 1, valores mais próximos de 0 indicam menor dispersão); enquanto que o potencial zeta é uma medida da repulsão eletrostática da partícula (valores superiores a +30 e inferiores a -30 indicam boa estabilidade). Conforme apresentado na Figura 15, é possível notar que a nanoemulsão se manteve com um tamanho médio em torno de 225 nm nos 42 dias analisados, com um índice de polidispersão em torno de 0,3 e potencial zeta de -65 mV.



**Figura 20.** Espectros de absorção (A) com varredura na faixa de 250 à 350nm e curva analítica padrão de CBD em meio orgânico, com pontos coletados nos máximos de absorção dos respectivos espectros (concentrações entre 0,05 e 1,1 mM).



**Figura 21.** Espectros de absorção de alíquotas de 25 µL da CBDne em meio orgânico de etanol.



**Figura 22.** Acompanhamento da estabilidade em relação ao tempo após o preparo. (A) Tamanho Médio; (B) Índice de PdI; e (C) Potencial Zeta da CBDne de concentração 35,09 mM.

**DISCUSSÃO**

## 5. DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos eletrográficos e comportamentais da administração prévia de CBDne, em ratos submetidos ao modelo de SE, induzido por PiloIH. Em suma, demonstramos a eficácia do CBDne na redução do tempo despendido em crise e na modulação da dinâmica de crise, observada pela redução de potência global nos registros ipsilateral e contralateral à microinjeção de PiloIH, entre 60 e 90 minutos após o início das crises. No entanto, não foi observada alteração significativa dos parâmetros de latência para início de crises e SE ou na gravidade das crises apresentadas pelos animais do grupo CBDne, quando comparados ao grupo neØ.

A ausência de diferença significativa nas análises de latência (Tabela 4 e Figuras 10 e 11) e gravidade de crises (Figura 17) foi inesperada e vai contra o que foi reportado por Do Val-Da Silva e colaboradores (2017), que no modelo de SE induzido por PiloIH, observaram efeitos do CBD aumentando a latência para início de SE e diminuição da severidade de crises epiléticas e o número de ratos que desenvolveram SE. No entanto, é importante mencionar que existem diversas diferenças metodológicas entre o presente estudo e o estudo mencionado, em que foi utilizada uma dose única de 2,4 mg/animal de pilocarpina, o dobro da utilizada no presente estudo, tendo esta, sido injetada na região posterior dorsal do hipocampo, não no GD. Foi também utilizada uma dose diferente de CBD, 10 mg/kg, administrada 1 hora antes da indução por PiloIH. Lima e colaboradores (2020) reportaram uma redução semelhante da gravidade de crises e aumento da latência utilizando o modelo de crises induzidas por PiloIH em camundongos tratados com CBD. É também evidente, mas necessário ressaltar, que estes estudos utilizaram um veículo distinto da nanoemulsão, de forma que uma comparação direta é pouco apropriada.

É interessante notar que a taxa de indução de SE no grupo neØ, de 75%, foi bastante semelhante aos 71% relatados por Furtado e colaboradores (2002), enquanto a do grupo CBDne foi de apenas 37,5%. Entretanto, nesse caso não foi detectada diferença significativa entre os grupos neØ e CBDne, fato que pode ser atribuído parcialmente ao número limitado de animais analisados.

Observando os resultados de potência é possível perceber que os efeitos do CBDne apresentam uma dinâmica temporal bastante diferente de um efeito tudo ou nada (Figuras 15 a 16). Relativo às curvas de potência ao longo do tempo, na faixa de frequência global, em ambos os hipocampos é perceptível a presença de um aumento

gradual da potência no grupo neØ, atingindo um platô aproximadamente na metade do experimento. O Grupo CBDne, por outro lado, inicia com potência semelhante à do grupo neØ, no entanto, após um período de 30 ou 40 minutos essa potência apresenta um rápido declínio, sem nunca atingir os valores máximos observados no grupo neØ. Khan e colaboradores (2018), em estudos *in vitro* utilizando fatias hipocâmpais em meio livre de  $Mg^{+}$ , demonstraram que o CBD é capaz de reduzir a excitabilidade hipocâmpal por meio da modulação seletiva de neurônios piramidais e interneurônios PV e CCK positivos, silenciando EPSPs entre neurônios piramidais ao mesmo tempo que potencializando IPSPs, de forma a reinstaurar uma atividade de rede normal. Fato interessante é que esse efeito foi significativamente mais pronunciado em neurônios em um estado mais excitável e com uma maior taxa de disparo, sugerindo que o efeito é dependente da excitabilidade. Esse é um possível mecanismo de ação para o fenômeno observado no presente estudo, em que só se foi observado um efeito após instaurado um estado de hiperexcitabilidade.

Com relação à potência nas diversas faixas de frequência estudadas, vemos que o efeito observado na potência global não é particularmente dependente de nenhuma faixa de frequência, com praticamente todas elas apresentando curvas bastante semelhantes. Única exceção é a faixa de frequência Gama alta (>80 Hz) no hipocampo ipsilateral à microinjeção PiloIH, que não apresentou diferenças significativas entre os grupos e CBDne.

Outra métrica importante é o da duração das crises eletrográficas, assim como detectado na janela de 90 min após a primeira crise apresentada pelo animal. Esse resultado, de certa forma conectado aos resultados de potência, nos fornece uma perspectiva diferente, mas informativa do que realmente ocorreu no cérebro desses animais. Detectamos nos canais ipsilateral e contralateral à microinjeção de PiloIH uma redução significativa do tempo despendido em crises eletrográficas nos animais CBDne, em comparação ao grupo neØ. Esse efeito protetor é particularmente relevante, considerando que, no modelo sistêmico de pilocarpina a duração das crises durante o insulto inicial possui correlação com a magnitude do dano cerebral e posterior surgimento de crises espontâneas e recorrentes durante a fase crônica do modelo, com uma maior duração do SE estando relacionada a uma menor latência para o surgimento da primeira crise espontânea e a uma maior frequência de crises (CURIA et al., 2008; LEMOS & CAVALHEIRO, 1995). Lemos e Cavalheiro (1995) demonstraram ainda que animais

exibindo uma duração de apenas 30 minutos de SE (induzido por injeção sistêmica de pilocarpina) não desenvolveram crises espontâneas e apresentaram contagens de células hipocâmpais e densidade da histoquímica de neo-Timm (região supragranular do GD) similares ao grupo controle. Estes resultados indicam que 30 minutos ou menos de SE não são suficientes para induzir morte celular ou o processo de *sprouting* de fibras musgosas, processos relacionados ao processo epileptogênico. Além disso, o CBD é um potente agente neuroprotetor, capaz de interferir na sobrevivência e plasticidade neural, não somente por reduzir os efeitos excitotóxicos por interferência direta na excitabilidade mediada por glutamato, mas também por promover efeitos como inibição de dano oxidativo induzido por radical livre, regulação da BHE e modulação das vias de sinalização PI3K/Akt/mTOR/GSK-3 (ROSENBERG et al., 2017; LIMA et al., 2020). É também interessante notar que, apesar da ausência de diferença significativa na análise comportamental (gravidade de crise), Castro e colaboradores (2011), em um estudo comparativo entre a neurodegeneração (Fluoro-Jade positiva; FJ+) induzida por pilocarpina sistêmica e intra-hipocâmpal, não observaram correlação entre a gravidade das crises e o número de células FJ+ no hipocampo. Os resultados apresentados por estes estudos, junto à redução da duração das crises eletrográficas promovida pelo CBDne, sugerem que o CBDne pode possuir considerável efeito neuroprotetor. Nesse sentido, mais estudos são necessários para identificar os possíveis efeitos neuroprotetores da administração do CBDne.

Também relativo à duração das crises eletrográficas, foi detectada no grupo CBDne diferença na fração de tempo despendido em crises, entre os hipocâmpos ipsilateral e contralateral à microinjeção de pilocarpina, com o lado contralateral passando menos tempo em crises eletrográficas, não tendo sido, no entanto, detectada diferença no grupo neØ. Essa redução de tempo despendido em crises no hipocampo contralateral pode representar uma maior dificuldade de generalização das crises no grupo CBDne.

É relevante mencionar que estas análises do registro de EEG só foram possíveis devido ao desenvolvimento do *scrip* de análise para MATLAB. Esta rotina foi construída com o intuito de permitir extrair, de forma desviesada e padronizada, o maior número possível de informações dos registros obtidos. Para maior facilidade de uso por usuários futuros, foi construída uma GUI, que permite que essa análise seja utilizada e customizada para uso em outros protocolos, mesmo sem conhecimentos prévios de programação por parte do usuário. Apesar da abordagem simples, o algoritmo de detecção de crises

utilizado se mostrou bastante adequado para a detecção das crises eletrográficas observadas. Nissinen e colaboradores (2000) estabeleceram como métrica para identificação de crises a presença de oscilações de frequência superior à 5 Hz com ao menos duas vezes a amplitude da linha de base. No entanto, devido à intrincada correlação entre as oscilações Teta e a circuitaria hipocampal (KITCHIGINA, 2018), optamos por modificar esse critério de identificação para incluir oscilações de frequência superior à 4 Hz, assim, incluindo a faixa de frequência Teta (4 a 8 Hz) em sua totalidade.

Quanto caracterização físico-química da nanoemulsão, demonstramos que o CBDne pode ser produzido de forma estável e em concentrações de CBD elevadas o suficiente para eliciar efeitos anticonvulsivos no modelo de SE induzido por microinjeção de PiloIH. Sistemas de *drug delivery* auto-nanoemulsificantes, como este, produzem nanoemulsões termodinamicamente estáveis que permitem a veiculação e melhora da absorção e biodisponibilidade de compostos altamente lipofílicos como o CBD (GUPTA et al., 2017). Devido ao perfil farmacocinético do CBD, diversos grupos têm buscado desenvolver novas formulações e sistemas de *drug delivery* que melhorem sua absorção e biodisponibilidade (MILLAR et al., 2020), tendo recentemente sido desenvolvida uma outra nanoemulsão para veiculação do CBD (NAKANO et al., 2019).

Ainda que tenhamos demonstrado a eficácia do CBDne, uma das limitações do presente estudo está relacionada à ausência de ensaios que verifiquem os níveis teciduais e séricos do CBD ao logo do experimento, de forma que mais estudos serão necessários para determinação do perfil farmacocinético dessa nova formulação.

**CONCLUSÃO**

## 6. CONCLUSÃO

Demonstramos o efeito anticonvulsivante do CBDne no modelo de SE induzido por microinjeção de PiloIH, assim como observado pela redução do tempo despendido em crises e pela modulação da dinâmica temporal das crises, observada pela redução da potência na faixa de frequência global, nos registros ipsilateral e contralateral à microinjeção de PiloIH, entre 60 e 90 minutos após o início das crises. Demonstramos ainda que essa redução na frequência global não deve ser atribuída à redução em nenhuma faixa de frequência específica. No entanto, não detectamos efeito significativo do CBDne na latência para início de crises e SE, ou na gravidade das crises apresentadas. Foi também apresentada um *script* em linguagem *MATLAB*®, com um algoritmo capaz de realizar a detecção de crises e extrair informações relevantes do registro eletroencefalográfico, tal como, tempo de início e duração de cada crise, latência para início das crises e SE, potência média de faixas de frequência e gerar gráficos da série temporal e espectrogramas, tendo esse *script* sido disponibilizado na plataforma *MATLAB Central File Exchange* (SERVILHA-MENEZES, 2021). O algoritmo desenvolvido foi construído de forma a ser suficientemente generalista para que seja facilmente implementado e utilizado em diversos cenários, como na análise de registros obtidos em outros protocolos ou na análise de EEG de pacientes com epilepsia.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXOPOULOS, Andreas V. Pharmacoresistant epilepsy: Definition and explanation. **Epileptology**, v. 1, n. 1, p. 38-42, 2013.

ANDERSON, David E.; MADHAVAN, Deepak; SWAMINATHAN, Arun. Global brain network dynamics predict therapeutic responsiveness to cannabidiol treatment for refractory epilepsy. **Brain Communications**, v. 2, n. 2, p. fcaa140, 2020.

ANNEGERS, John F.; COAN, Sharon Pasternak. SUDEP: overview of definitions and review of incidence data. **Seizure**, v. 8, n. 6, p. 347-352, 1999.

ARAQUE, Alfonso et al. Synaptic functions of endocannabinoid signaling in health and disease. **Neuropharmacology**, v. 124, p. 13-24, 2017.

BAKAS, T. et al. The direct actions of cannabidiol and 2-arachidonoyl glycerol at GABAA receptors. **Pharmacological research**, v. 119, p. 358-370, 2017.

BEGHI, Ettore et al. Global, regional, and national burden of epilepsy, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **The Lancet Neurology**, v. 18, n. 4, p. 357-375, 2019.

BERG, Anne T. et al. Remission of epilepsy after two drug failures in children: a prospective study. **Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society**, v. 65, n. 5, p. 510-519, 2009.

BIH, Clementino Ibeas et al. Molecular targets of cannabidiol in neurological disorders. **Neurotherapeutics**, v. 12, n. 4, p. 699-730, 2015.

BISOGNO, Tiziana et al. Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. **British journal of pharmacology**, v. 134, n. 4, p. 845-852, 2001.  
BISOGNO, Tiziana et al. Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. **British journal of pharmacology**, v. 134, n. 4, p. 845-852, 2001.

BRODIE, M. J. et al. Patterns of treatment response in newly diagnosed epilepsy. **Neurology**, v. 78, n. 20, p. 1548-1554, 2012.

BRUXEL, Fernanda et al. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. *Química nova*. São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, 1978-. Vol. 35, n. 9 (2012), p. 1827-1840, 2012.

BYMASTER, Frank P. et al. Role of specific muscarinic receptor subtypes in cholinergic parasympathomimetic responses, in vivo phosphoinositide hydrolysis, and pilocarpine-induced seizure activity. **European Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 7, p. 1403-1410, 2003.

CASTRO, O. W. et al. Comparative neuroanatomical and temporal characterization of FluoroJade-positive neurodegeneration after status epilepticus induced by systemic and intrahippocampal pilocarpine in Wistar rats. **Brain research**, v. 1374, p. 43-55, 2011.

CHEN, De-jie et al. Brain cannabinoid receptor 2: expression, function and modulation. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 38, n. 3, p. 312-316, 2017.

CHEN, Zhibin et al. Treatment outcomes in patients with newly diagnosed epilepsy treated with established and new antiepileptic drugs: a 30-year longitudinal cohort study. **JAMA neurology**, v. 75, n. 3, p. 279-286, 2018.

CRISTINO, Luigia; BISOGNO, Tiziana; DI MARZO, Vincenzo. Cannabinoids and the expanded endocannabinoid system in neurological disorders. **Nature Reviews Neurology**, v. 16, n. 1, p. 9-29, 2020.

CURIA, Giulia et al. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. **Journal of neuroscience methods**, v. 172, n. 2, p. 143-157, 2008.

DE ALMEIDA, Douglas L.; DEVI, Lakshmi A. Diversity of molecular targets and signaling pathways for CBD. **Pharmacology research & perspectives**, v. 8, n. 6, p. e00682, 2020.

DE BOER, Hanneke M.; MULA, Marco; SANDER, Josemir W. The global burden and stigma of epilepsy. **Epilepsy & behavior**, v. 12, n. 4, p. 540-546, 2008.

DE PETROCELLIS, Luciano et al. Effects of cannabinoids and cannabinoid-enriched Cannabis extracts on TRP channels and endocannabinoid metabolic enzymes. **British journal of pharmacology**, v. 163, n. 7, p. 1479-1494, 2011.

DEGENHARDT, Louisa et al. Toward a global view of alcohol, tobacco, cannabis, and cocaine use: findings from the WHO World Mental Health Surveys. **PLoS medicine**, v. 5, n. 7, p. e141, 2008.

DEGROOT, Aldemar et al. CB1 receptor antagonism increases hippocampal acetylcholine release: site and mechanism of action. **Molecular pharmacology**, v. 70, n. 4, p. 1236-1245, 2006.

DEVINSKY, Orrin et al. Cannabidiol in patients with treatment-resistant epilepsy: an open-label interventional trial. **The Lancet Neurology**, v. 15, n. 3, p. 270-278, 2016.

DI IORIO, Giuseppe et al. The endocannabinoid system: a putative role in neurodegenerative diseases. **International journal of high risk behaviors & addiction**, v. 2, n. 3, p. 100, 2013.

DOS SANTOS, R. G. et al. Phytocannabinoids and epilepsy. **Journal of clinical pharmacy and therapeutics**, v. 40, n. 2, p. 135-143, 2015.

DRUGBANK (DB). Pilocarpine. Jan. 2021. Disponível em: <<https://go.drugbank.com/drugs/DB01085#BE0000045>>. Acesso em: 19 janeiro 2021.

ELSAID, Sonja; KLOIBER, Stefan; LE FOLL, Bernard. Effects of cannabidiol (CBD) in neuropsychiatric disorders: A review of pre-clinical and clinical findings. In: **Progress in molecular biology and translational science**. Academic Press, 2019. p. 25-75.

ENGEL JR, Jerome. Approaches to refractory epilepsy. **Annals of Indian Academy of Neurology**, v. 17, n. Suppl 1, p. S12, 2014.

ENGEL JR, Jerome. The current place of epilepsy surgery. **Current opinion in neurology**, v. 31, n. 2, p. 192, 2018.

EPILEPSY FOUNDATION (EF). Specific AEDs. Abr. 2004. Disponível em: <<https://www.epilepsy.com/learn/professionals/diagnosis-treatment/psychotropic-effects-developmental-disabilities/specific-11>>. Acesso em: 10 janeiro 2021.

FANG, Min et al. A new hypothesis of drug refractory epilepsy: neural network hypothesis. **Medical Hypotheses**, v. 76, n. 6, p. 871-876, 2011.

FISHER, Robert S. et al. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*, v. 55, n. 4, p. 475- 482, 2014a.

FISHER, Robert S.; SCHARFMAN, Helen E.; DECURTIS, Marco. How can we identify ictal and interictal abnormal activity?. **Issues in Clinical Epileptology: A View from the Bench**, p. 3-23, 2014b.

FISHER, Robert S. et al. Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*, v. 58, n. 4, p. 522-530, 2017.

FREEMAN, Abigail M. et al. How does cannabidiol (CBD) influence the acute effects of delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) in humans? A systematic review. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 107, p. 696-712, 2019.

FRIEDMAN, Daniel; DEVINSKY, Orrin. Cannabinoids in the treatment of epilepsy. *New England Journal of Medicine*, v. 373, n. 11, p. 1048-1058, 2015.

FURTADO, Marcio de A. et al. Behavioral, morphologic, and electroencephalographic evaluation of seizures induced by intrahippocampal microinjection of pilocarpine. *Epilepsia*, v. 43, p. 37-39, 2002.

GOLDBERG, Ethan M.; COULTER, Douglas A. Mechanisms of epileptogenesis: a convergence on neural circuit dysfunction. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 14, n. 5, p. 337, 2013.

GOLYALA, Ambica; KWAN, Patrick. Drug development for refractory epilepsy: the past 25 years and beyond. **Seizure**, v. 44, p. 147-156, 2017.

GOMES, Marleide da Mota. Mortalidade atribuída à epilepsia, às suas doenças subjacentes ou às condições não relacionadas a ela: uma síntese. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**, v. 16, n. 3, p. 100-105, 2010.

GRAY, Royston A. et al. Anticonvulsive properties of cannabidiol in a model of generalized seizure are transient receptor potential vanilloid 1 dependent. **Cannabis and Cannabinoid Research**, v. 5, n. 2, p. 145-149, 2020.

GRAY, Royston A.; WHALLEY, Benjamin J. The proposed mechanisms of action of CBD in epilepsy. **Epileptic Disorders**, v. 22, p. S10-S15, 2020.

GRIESSENAUER, Christoph J. et al. Hemispherectomy for treatment of refractory epilepsy in the pediatric age group: a systematic review. *Journal of Neurosurgery: Pediatrics*, v. 15, n. 1, p. 34-44, 2015.

GROTENHERMEN, Franjo. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cannabinoids. **Clinical pharmacokinetics**, v. 42, n. 4, p. 327-360, 2003.

GUPTA, Shweta; KESARLA, Rajesh; OMRI, Abdelwahab. Formulation strategies to improve the bioavailability of poorly absorbed drugs with special emphasis on self-emulsifying systems. **International Scholarly Research Notices**, v. 2013, 2013.

HUDSPETH, A. James et al. (5<sup>a</sup> Ed.). **Principles of neural science**. McGraw-Hill, Health Professions Division, 2013.

HUMAN PROTEIN ATLAS (HPA). **CNR1**. Disponível em: <<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000118432-CNR1/tissue>>. Acesso em: 04 de janeiro 2021.

IANNOTTI, Fabio Arturo et al. Nonpsychotropic plant cannabinoids, cannabidivarin (CBDV) and cannabidiol (CBD), activate and desensitize transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) channels in vitro: potential for the treatment of neuronal hyperexcitability. **ACS chemical neuroscience**, v. 5, n. 11, p. 1131-1141, 2014.

JAISWAL, Manjit; DUDHE, Rupesh; SHARMA, P. K. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. *3 Biotech*, v. 5, n. 2, p. 123-127, 2015.

JIRSA, Viktor K. et al. **On the nature of seizure dynamics.** *Brain*, v. 137, n. 8, p. 2210-2230, 2014.

JUVALE, Iman Imtiyaz Ahmed; HAS, Ahmad Tarmizi Che. The evolution of the pilocarpine animal model of status epilepticus. *Heliyon*, v. 6, n. 7, p. e04557, 2020.

KANO, Masanobu et al. Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiological reviews*, v. 89, n. 1, p. 309-380, 2009.

KAPLAN, Joshua S. et al. Cannabidiol attenuates seizures and social deficits in a mouse model of Dravet syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 114, n. 42, p. 11229-11234, 2017.

KEGG PATHWAY DATABASE (KEGG). Retrograde endocannabinoid signaling - Homo sapiens (human). Abr. 2017. Disponível em < [https://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?hsa04723](https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?hsa04723)>. Acesso em 08 janeiro de 2021.

KENDALL, Debra A.; YUDOWSKI, Guillermo A. Cannabinoid receptors in the central nervous system: their signaling and roles in disease. *Frontiers in cellular neuroscience*, v. 10, p. 294, 2017.

KHAN, Archie A. et al. Cannabidiol exerts antiepileptic effects by restoring hippocampal interneuron functions in a temporal lobe epilepsy model. *British journal of pharmacology*, v. 175, n. 11, p. 2097-2115, 2018.

KITCHIGINA, Valentina F. Alterations of coherent theta and gamma network oscillations as an early biomarker of temporal lobe epilepsy and Alzheimer's disease. *Frontiers in integrative neuroscience*, v. 12, p. 36, 2018.

KWAN, Patrick et al. Definition of drug resistant epilepsy: consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia*, v. 51, n. 6, p. 1069-1077, 2010.

KWAN, Patrick; SCHACHTER, Steven C.; BRODIE, Martin J. Drug-resistant epilepsy. *New England Journal of Medicine*, v. 365, n. 10, p. 919-926, 2011.

LAPRAIRIE, R. B. et al. Cannabidiol is a negative allosteric modulator of the cannabinoid CB1 receptor. *British journal of pharmacology*, v. 172, n. 20, p. 4790-4805, 2015.

LAUN, Alyssa S. et al. GPR3, GPR6, and GPR12 as novel molecular targets: their biological functions and interaction with cannabidiol. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 40, n. 3, p. 300-308, 2019.

LAZARINI-LOPES, Willian et al. Cannabinoid Receptor Type 1 (CB1R) Expression in Limbic Brain Structures After Acute and Chronic Seizures in a Genetic Model of Epilepsy. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 14, 2020a.

LAZARINI-LOPES, Willian et al. The anticonvulsant effects of cannabidiol in experimental models of epileptic seizures: From behavior and mechanisms to clinical insights. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 111, p. 166-182, 2020b.

LEITE, João Pereira; GARCIA-CAIRASCO, Norberto; CAVALHEIRO, E. A. New insights from the use of pilocarpine and kainate models. **Epilepsy research**, v. 50, n. 1-2, p. 93-103, 2002.

LEMOS, Tadeu; CAVALHEIRO, Esper A. Suppression of pilocarpine-induced status epilepticus and the late development of epilepsy in rats. **Experimental brain research**, v. 102, n. 3, p. 423-428, 1995.

LIMA, Isabel Vieira de Assis et al. Cannabidiol anticonvulsant effect is mediated by the PI3K $\gamma$  pathway. **Neuropharmacology**, v. 176, p. 108156, 2020.

LÖSCHER, Wolfgang et al. Drug resistance in epilepsy: clinical impact, potential mechanisms, and new innovative treatment options. **Pharmacological Reviews**, v. 72, n. 3, p. 606-638, 2020.

MANNILA, Janne et al. Precipitation complexation method produces cannabidiol/ $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex suitable for sublingual administration of cannabidiol. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 96, n. 2, p. 312-319, 2007.

MARTÍNEZ-PINILLA, Eva et al. Binding and signaling studies disclose a potential allosteric site for cannabidiol in cannabinoid CB2 receptors. **Frontiers in pharmacology**, v. 8, p. 744, 2017.

MECHOULAM, R.; FEIGENBAUM, J. J. 5 Towards cannabinoid drugs. **Progress in medicinal chemistry**, v. 24, p. 159-207, 1987.

MECHOULAM, R.; SHVO, Y. Hashish—I: the structure of cannabidiol. **Tetrahedron**, v. 19, n. 12, p. 2073-2078, 1963.

MECHOULAM, Raphael; PARKER, Linda A. The endocannabinoid system and the brain. *Annual review of psychology*, v. 64, p. 21-47, 2013.

MECHOULAM, Raphael; PARKER, Linda A.; GALLILY, Ruth. Cannabidiol: an overview of some pharmacological aspects. *The Journal of Clinical Pharmacology*, v. 42, n. S1, p. 11S-19S, 2002.

MILLAR, Sophie A. et al. A systematic review on the pharmacokinetics of cannabidiol in humans. *Frontiers in pharmacology*, v. 9, p. 1365, 2018.

MILLAR, Sophie Anne et al. Towards better delivery of cannabidiol (CBD). *Pharmaceuticals*, v. 13, n. 9, p. 219, 2020.

MORALES, Paula; HURST, Dow P.; REGGIO, Patricia H. Molecular targets of the phytocannabinoids: a complex picture. In: **Phytocannabinoids**. Springer, Cham, 2017. p. 103-131.

NABBOUT, Rima; THIELE, Elizabeth A. The role of cannabinoids in epilepsy treatment: a critical review of efficacy results from clinical trials. *Epileptic Disorders*, v. 22, p. S23-S28, 2020.

NAKANO, Yukako et al. Development of a novel nanoemulsion formulation to improve intestinal absorption of cannabidiol. *Medical Cannabis and Cannabinoids*, v. 2, n. 1, p. 35-42, 2019.

NGUGI, Anthony K. et al. Estimation of the burden of active and life-time epilepsy: a meta-analytic approach. *Epilepsia*, v. 51, n. 5, p. 883-890, 2010.

NISSINEN, Jari et al. A new model of chronic temporal lobe epilepsy induced by electrical stimulation of the amygdala in rat. *Epilepsy research*, v. 38, n. 2-3, p. 177-205, 2000.

PERTWEE, R. G. The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids:  $\Delta$ 9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and  $\Delta$ 9-tetrahydrocannabivarin. *British journal of pharmacology*, v. 153, n. 2, p. 199-215, 2008.

PINEL, John PJ; ROVNER, Louis I. Electrode placement and kindling-induced experimental epilepsy. *Experimental neurology*, v. 58, n. 2, p. 335-346, 1978.

PISANTI, Simona et al. Cannabidiol: State of the art and new challenges for therapeutic applications. *Pharmacology & therapeutics*, v. 175, p. 133-150, 2017.

PITKÄNEN, Asla et al. Epileptogenesis. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 5, n. 10, p. a022822, 2015.

PONTES, MARCOS; COSTA, RENATA MAZARO E. Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal.

RACINE, Ronald J. Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizure. **Electroencephalography and clinical neurophysiology**, v. 32, n. 3, p. 281-294, 1972.

ROSENBERG, Evan C.; PATRA, Pabitra H.; WHALLEY, Benjamin J. Therapeutic effects of cannabinoids in animal models of seizures, epilepsy, epileptogenesis, and epilepsy-related neuroprotection. **Epilepsy & Behavior**, v. 70, p. 319-327, 2017.

RYAN, Duncan et al. Cannabidiol targets mitochondria to regulate intracellular Ca<sup>2+</sup> levels. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 7, p. 2053-2063, 2009.

SAFFARZADEH, F. et al. TRPV1 receptors augment basal synaptic transmission in CA1 and CA3 pyramidal neurons in epilepsy. **Neuroscience**, v. 314, p. 170-178, 2016.

SAMANTA, Debopam. Cannabidiol: a review of clinical efficacy and safety in epilepsy. **Pediatric Neurology**, v. 96, p. 24-29, 2019.

SCHARFMAN, Helen E. The neurobiology of epilepsy. **Current neurology and neuroscience reports**, v. 7, n. 4, p. 348- 354, 2007.

SCHEFFER, Ingrid E. et al. ILAE classification of the epilepsies: position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*, v. 58, n. 4, p. 512-521, 2017.

SIEGEL, Adrian M. Presurgical evaluation and surgical treatment of medically refractory epilepsy. *Neurosurgical review*, v. 27, n. 1, p. 1-18, 2004.

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*, 2008.

SISTERSON, Nathaniel D. et al. Closed-loop brain stimulation for drug-resistant epilepsy: towards an evidence-based approach to personalized medicine. **Neurotherapeutics**, v. 16, n. 1, p. 119-127, 2019.

SISODIYA, S. M. et al. Drug resistance in epilepsy: expression of drug resistance proteins in common causes of refractory epilepsy. **Brain**, v. 125, n. 1, p. 22-31, 2002.

SISODIYA, S. M. et al. Drug resistance in epilepsy: expression of drug resistance proteins in common causes of refractory epilepsy. **Brain**, v. 125, n. 1, p. 22-31, 2002.

STALEY, Kevin. Molecular mechanisms of epilepsy. *Nature neuroscience*, v. 18, n. 3, p. 367, 2015.

STASIULEWICZ, Adam et al. A Guide to Targeting the Endocannabinoid System in Drug Design. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 8, p. 2778, 2020.

SZAFLARSKI, Jerzy P. et al. Long-term safety and treatment effects of cannabidiol in children and adults with treatment-resistant epilepsies: Expanded access program results. **Epilepsia**, v. 59, n. 8, p. 1540-1548, 2018.

TANG, Fei; HARTZ, Anika; BAUER, Björn. Drug-resistant epilepsy: multiple hypotheses, few answers. **Frontiers in neurology**, v. 8, p. 301, 2017.

THOMAS, Adele et al. Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB1 and CB2 receptor agonists in vitro. **British journal of pharmacology**, v. 150, n. 5, p. 613-623, 2007.

THURMAN, David J. et al. Standards for epidemiologic studies and surveillance of epilepsy. **Epilepsia**, v. 52, n. s7, p. 2-26, 2011.

TRINKA, Eugen et al. A definition and classification of status epilepticus—Report of the ILAE Task Force on Classification of Status Epilepticus. **Epilepsia**, v. 56, n. 10, p. 1515-1523, 2015.

VILELA, Luciano R. et al. Anticonvulsant effect of cannabidiol in the pentylenetetrazole model: Pharmacological mechanisms, electroencephalographic profile, and brain cytokine levels. **Epilepsy & Behavior**, v. 75, p. 29-35, 2017.

WALLISCH, Pascal et al. **MATLAB for neuroscientists: an introduction to scientific computing in MATLAB**. Academic Press, 2014.

WELTHA, Landen; REEMMER, Jesica; BOISON, Detlev. The role of adenosine in epilepsy. **Brain research bulletin**, v. 151, p. 46-54, 2019.

WHITE, C. Michael. A review of human studies assessing cannabidiol's (CBD) therapeutic actions and potential. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 59, n. 7, p. 923-934, 2019.

WILSON, Rachel I.; NICOLL, Roger A. Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature*, v. 410, n. 6828, p. 588, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Epilepsy. Jun. 2019. Disponível em: <<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy>>. Acesso em: 04 janeiro 2021.

ZUARDI, Antonio Waldo. Cannabidiol: from an inactive cannabinoid to a drug with wide spectrum of action. **Brazilian Journal of Psychiatry**, v. 30, n. 3, p. 271-280, 2008

ZUARDI, Antonio Waldo. History of cannabis as a medicine: a review. **Brazilian Journal of Psychiatry**, v. 28, n. 2, p. 153-157, 2006

# ANEXO I

## Disponibilizado na plataforma MATLAB Central File Exchange:

SERVILHA-MENEZES, Gabriel (2021). EEG ANALYSIS OF EXPERIMENTALLY INDUCED STATUS EPILEPTICUS (<https://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/74237-eeg-analysis-of-experimentally-induced-status-epilepticus>), MATLAB Central File Exchange. Retrieved February 13, 2021.

## ANALYSIS OF EXPERIMENTALLY INDUCED STATUS EPILEPTICUS v2.01

**Author: Gabriel Servilha Menezes (gabriel.smenezes@usp.br)**

Undergraduate Student of Biomedical Sciences

University of São Paulo

School of Medicine of Ribeirão Preto (FMRP-USP)

Department of Physiology

Neurophysiology and Experimental Neuroethology Laboratory

**Supervisor: Prof. Norberto Garcia Cairasco**

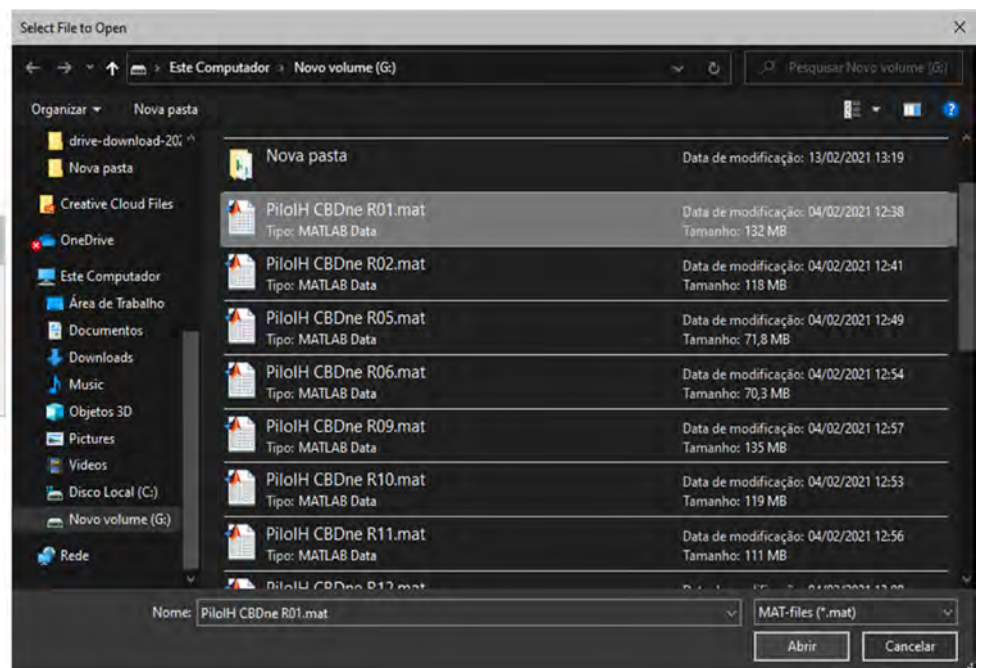
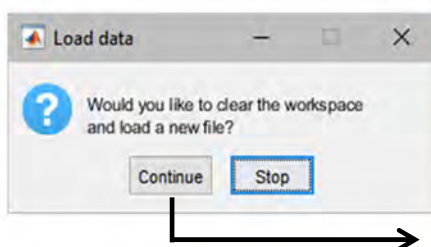
### Acknowledgments:

Financial Support: São Paulo Research Foundation (FAPESP: Proc. 2019/05957-8; Proc. 2019/05957-8; Proc. 2014/50891-1); National Council for Scientific and Technological Development (CNPq: Proc. 465458/2014-9).

**(!)Disclaimer: For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.**

### % CLEAR WORKSPACE & GET FILE HANDLE

```
if ~isempty(whos)
    clearworkspace = questdlg({'Would you like to clear the workspace', 'and load a new
file?'}, 'Load data', 'Continue', 'Stop', 'Stop');
    switch clearworkspace
        case 'Stop'
            error('Execution stopped by user!')
    end
end
clear;close all;file, path] = uigetfile('*.mat');
```



## %% SETTINGS

```
% Filename
settings = uifigure('Name','User input','Position',[100 100 320 350]);
Filename_panel = uipanel(settings,'Title','File
name:','FontName','Bahnschrift','FontSize',13,'BackgroundColor','white','Position',[10 235 300
100],'FontWeight','bold');
Filename_Exp = uieditfield(Filename_panel,'FontName','Bahnschrift','Position',[10 45 90 15]);
uilabel(Filename_panel,'FontName','Bahnschrift','Position',[10 60 90 15],'Text','Experiment:');
Filename_Group = uieditfield(Filename_panel,'FontName','Bahnschrift','Position',[105 45 90
15]);
uilabel(Filename_panel,'FontName','Bahnschrift','Position',[105 60 90 15],'Text','Exp.
group:');
Filename_ID = uieditfield(Filename_panel,'FontName','Bahnschrift','Position',[200 45 90 15]);
uilabel(Filename_panel,'FontName','Bahnschrift','Position',[200 60 90 15],'Text','Animal ID:');
uibutton(Filename_panel,'FontName','Bahnschrift','Position',[200 10 90
25],'Text','SAVE','ButtonPushedFcn','Filename_panel.Title = char(join(["File name:"
Filename_Exp.Value Filename_Group.Value Filename_ID.Value])); GraphTitle =
char(join([Filename_Exp.Value Filename_Group.Value Filename_ID.Value "'])); filename =
join([Filename_Exp.Value Filename_Group.Value Filename_ID.Value]);uiwait(settings);');

% Channels
load(file,'titles'); titles = string(titles); N_Ch = size(titles,1); titles(N_Ch+1:6)="";
Channels_panel = uipanel(settings,'Title',join(["Number of Available Channels:"
string(N_Ch)]),'FontName','Bahnschrift','FontSize',13,'BackgroundColor','white','Position',[10
60 300 170],'FontWeight','bold');
Channels_Ch1 = uieditfield(Channels_panel,'FontName','Bahnschrift','Position',[75 125 215
15],'Value',titles(1,:));
uilabel(Channels_panel,'FontName','Bahnschrift','Position',[10 125 65 15],'Text','Channel
01:');
Channels_Ch2 = uieditfield(Channels_panel,'FontName','Bahnschrift','Position',[75 105 215
15],'Value',titles(2,:));
uilabel(Channels_panel,'FontName','Bahnschrift','Position',[10 105 65 15],'Text','Channel
02:');
Channels_Ch3 = uieditfield(Channels_panel,'FontName','Bahnschrift','Position',[75 85 215
15],'Value',titles(3,:));
uilabel(Channels_panel,'FontName','Bahnschrift','Position',[10 85 65 15],'Text','Channel 03:');
Channels_Ch4 = uieditfield(Channels_panel,'FontName','Bahnschrift','Position',[75 65 215
15],'Value',titles(4,:));
uilabel(Channels_panel,'FontName','Bahnschrift','Position',[10 65 65 15],'Text','Channel 04:');
Channels_Ch5 = uieditfield(Channels_panel,'FontName','Bahnschrift','Position',[75 45 215
15],'Value',titles(5,:));
uilabel(Channels_panel,'FontName','Bahnschrift','Position',[10 45 65 15],'Text','Channel 05:');
Ch_Seq = uieditfield(Channels_panel,'FontName','Bahnschrift','Position',[75 15 80
15],'Value','2,1,3,4,5');
uilabel(Channels_panel,'FontName','Bahnschrift','Position',[18 15 60 15],'Text',{'Sequence:'});
uibutton(Channels_panel,'FontName','Bahnschrift','Position',[200 10 90
25],'Text','SAVE','ButtonPushedFcn','Channel_List = {Channels_Ch1.Value; Channels_Ch2.Value;
Channels_Ch3.Value; Channels_Ch4.Value; Channels_Ch5.Value};ChSeq = str2num(Ch_Seq.Value);');

% Creates variables (in case of no input)
Filename_panel.Title = char(join(["File name:" file(1:end-4)]));
GraphTitle = file(1:end-4);
filename = file(1:end-4);
```

```

Channel_List = {Channels_Ch1.Value;...
    Channels_Ch2.Value;...
    Channels_Ch3.Value;...
    Channels_Ch4.Value;...
    Channels_Ch5.Value};
ChSeq = str2num(Ch_Seq.Value);

% "Next" button
uibutton(settings,'FontName','Bahnschrift','Position',[220 10 90
40],'Text','Next','ButtonPushedFcn','close(settings)','FontWeight','bold','FontSize',13,'Background
groundColor',[.75 .8 .85]);

```

```
%% LOAD DATA
```

```

load(file,'data','datastart','dataend','samplerate');
Data0 = zeros((datastart(1)+1000*floor((+dataend(1))/1000))-1,N_Ch);
for i = 1:N_Ch
    Data0(:,i) = data(datastart(i):(datastart(i)+1000*floor((+dataend(1))/1000))-1)';
end

```

```
%% DOWNSAMPLE (1 kHz)
```

```

if samplerate(1)==2000
    Data0=downsample(Data0,2);
    samplerate = 1000;
elseif samplerate(1)<1000
    error('Error: Sample rate must exceed 1 kHz.');
```

```
%% FILTER
```

```

Highpass05=designfilt('highpassiir','PassbandFrequency',0.5000,'StopbandFrequency',0.4705,'Pass
bandRipple',0.1000,'StopbandAttenuation',60,'DesignMethod','ellip','SampleRate',1000);
Bandstop60=designfilt('bandstopiir','FilterOrder',2,'HalfPowerFrequency1',59.7,'HalfPowerFreque
ncy2',60.3,'SampleRate',1000);
Data=filtfilt(Highpass05,Data0);
Data=filtfilt(Bandstop60,Data);
Data=detrend(Data);

```

```
% Halts execution until input is provided or the window is closed
uiwait(settings);
```

## %% SELECT BASELINE

```
% Plot Panel
size_Data = length(Data);
max_Data=max(max(abs(Data)));
time = (0:1:size_Data-1)/60000;
BL_select = uifigure('Name','BASELINE SELECTION','Position',[25 50 1280 650]);
BL_PlotPanell1 = uipanel(BL_select,'Position',[0 80 1280 570]);
Data_axes = uiaxes(BL_PlotPanell1,'Position',[0 0 1280
570],'XMinorTick','on','XTick',0:5:size_Data-1/60000);
Data_axes.YAxis.Visible = 0;
for i = 1:N_Ch
    plot(Data_axes,time,Data(:,ChSeq(i))-max_Data*i*1.25);
    hold(Data_axes,'on');
    text(Data_axes,size_Data/60000-2,-
max_Data*i*1.25+max_Data*0.25,Channel_List(ChSeq(i)),'Color',[0 0
0],'FontSize',13,'BackgroundColor',[1 1 1
0.1],'VerticalAlignment','bottom','HorizontalAlignment','right','FontName','Bahnschrift');
end
Y_Lim = Data_axes.YLim;
axis(Data_axes,[0 (size_Data-1)/60000 Y_Lim(1) Y_Lim(2)]);
xlabel(Data_axes,'Time (min)','FontName','Bahnschrift','FontSize',10);
plot(Data_axes,[3 3],[Y_Lim(1)+0.001 Y_Lim(1)+0.003],'-k','LineWidth',3);
text(Data_axes,3,Y_Lim(1)+0.002,'2 mV ','Color',[0 0
0],'FontSize',13,'VerticalAlignment','middle','FontName','Bahnschrift','HorizontalAlignment','ri
ght');

% Selection Panel
SldPanel =
uipanel(BL_select,'FontName','Bahnschrift','FontSize',13,'BackgroundColor','white','Position',[0
0 1280 80],'FontWeight','bold');
Epoch_BL = uidropdown(SldPanel,'FontName','Bahnschrift','Editable','on','Position',[10 15 80
20],'Items',{'1 min','2 min','5 min','10 min','20 min'],'ItemsData',[1 2 5 10
20],'Value',10,'ValueChangedFcn','size_BL = Epoch_BL.Value;BL_highlight.Position = [BL_sld.Value
-1 size_BL 1]; BL = [BL_sld.Value BL_sld.Value+size_BL];');
uilabel(SldPanel,'FontName','Bahnschrift','Position',[10 40 120
30],'Text',{'Baseline','Size:'},'FontWeight','bold','FontSize',13);
size_BL = Epoch_BL.Value;
BL_sld = uislider(SldPanel,'Position',[100 40 1000 3],'Limits',[0
60],'MajorTicks',0:2.5:60,'Value',10,'FontName','Bahnschrift','ValueChangedFcn','BL_start.Value
= BL_sld.Value;BL_highlight.Position = [BL_sld.Value -1 size_BL 1]; BL = [BL_sld.Value
BL_sld.Value+size_BL];BL_field.Value = BL_sld.Value;');
uilabel(SldPanel,'FontName','Bahnschrift','Position',[100 50 110 15],'Text','Start of
Baseline:','FontWeight','bold','FontSize',13);
BL_field =
uieditfield(SldPanel,'numeric','FontSize',16,'FontName','Bahnschrift','Position',[1110 25 60
30],'Value',BL_sld.Value,'ValueChangedFcn','BL_start.Value = BL_field.Value;BL_sld.Value =
BL_field.Value;BL = [BL_field.Value BL_field.Value+size_BL];BL_highlight.Position =
[BL_field.Value -1 size_BL 1];');
```

```

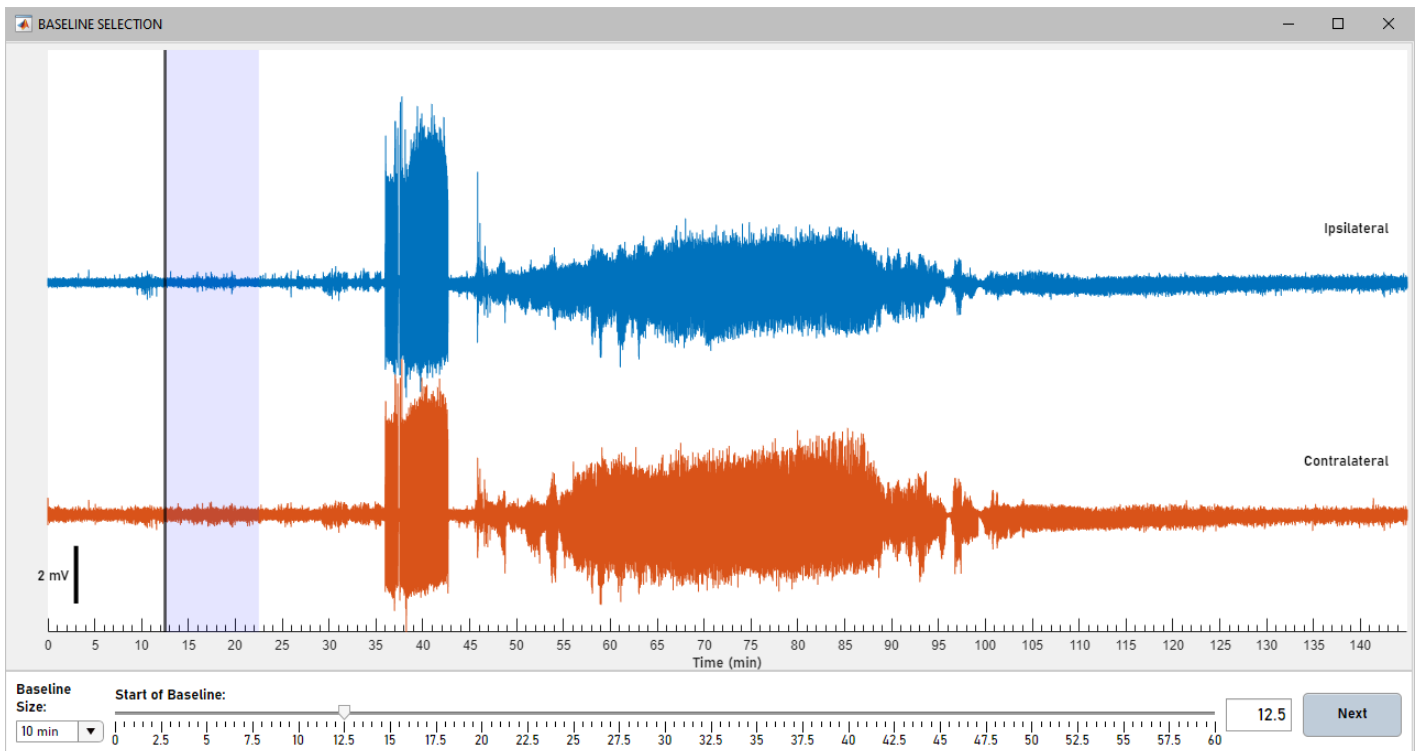
% Creates variables (in case of no input)
BL_start = xline(Data_axes,BL_sld.Value,'-k','LineWidth',2);
BL_highlight = rectangle(Data_axes,'Position',[BL_sld.Value -1 size_BL 1],'FaceColor',[0 0 1
0.1],'LineStyle','none');
BL = [10 10+size_BL];

% "Next" button
uibutton(SldPanel,'FontName','Bahnschrift','Position',[1180 20 90
40],'Text','Next','ButtonPushedFcn','close(BL_select)','FontWeight','bold','FontSize',13,'Backgr
oundColor',[.75 .8 .85]);

% Halts execution until input is provided or the window is closed
uiwait(BL_select);

% Clear unnecessary variables
clear('BL_axes', 'Data_axes', 'BL_sld', 'BL_field', 'Epoch_BL', 'Epoch_Power', 'BL_PlotPanel1',
'BL_PlotPanel2', 'SldPanel', 'BL_select', 'settings', 'BL_highlight', 'BL_start', 'Bandstop60',
'Highpass05', 'Highpass5', 'YLim', 'i');

```



#### %% SE INDUCTION / MANIPULATIONIION ARTIFACT

```

% Window Selection
Artifact = uifigure('Name','SE INDUCTION / MANIPULATIONIION ARTIFACT','Position',[25 50 1280 650]);
PlotPanel1 = uipanel(Artifact,'Position',[0 550 1280 100]);
Data_axes = uiaxes(PlotPanel1,'Position',[0 0 1280
100],'XMinorTick','on','XTick',0:5:size_Data-1/60000);
Data_axes.YAxis.Visible = 0;
Data_axes.XAxis.Visible = 0;
for i = 1:N_Ch
    plot(Data_axes,time,Data(:,ChSeq(i))-max_Data*i*1.25);
    hold(Data_axes,'on');
    text(Data_axes,size_Data/60000-2,-
max_Data*i*1.25+max_Data*0.25,Channel_List(ChSeq(i)),'Color',[0 0

```

```

0], 'FontSize',13, 'BackgroundColor',[1 1 1
0.1], 'VerticalAlignment', 'bottom', 'HorizontalAlignment', 'right', 'FontName', 'Bahnschrift');
end
Y_Lim = Data_axes.YLim;
axis(Data_axes,[0 (size_Data-1)/60000 Y_Lim(1) Y_Lim(2)]);
text(Data_axes,2,Y_Lim(1)+0.0035, '5 mV ', 'Color',[0 0 0], 'FontSize',11, 'BackgroundColor',[1 1 1
0.3], 'HorizontalAlignment', 'right', 'VerticalAlignment', 'middle', 'FontName', 'Bahnschrift');
plot(Data_axes,[2 2],[Y_Lim(1)+0.001 Y_Lim(1)+0.006], '-k', 'LineWidth',2.2);
text(Data_axes,5.5,Y_Lim(1)+0.0025, '5 min', 'Color',[0 0 0], 'FontSize',11, 'BackgroundColor',[1
1 1 0.3], 'HorizontalAlignment', 'center', 'VerticalAlignment', 'bottom', 'FontName', 'Bahnschrift');
plot(Data_axes,[3 8],[Y_Lim(1)+0.001 Y_Lim(1)+0.001], '-k', 'LineWidth',2.2);

% Window Selection
SldPanell =
uipanel(Artifact, 'FontName', 'Bahnschrift', 'FontSize',13, 'BackgroundColor', 'white', 'Position',[0
490 1280 60], 'FontWeight', 'bold');
Zoom_sld = uislider(SldPanell, 'Position',[80 40 1060 3], 'Limits',[floor(BL(2))
floor(BL(2))+60], 'MajorTicks', floor(BL(2)):5:floor(BL(2))+60, 'Value', BL(2)+20, 'FontName', 'Bahnsch
hrift', 'ValueChangedFcn', 'Zoom = [Zoom_sld.Value-2.5 Zoom_sld.Value+2.5];Zoom_highlight.Position
= [Zoom_sld.Value-2.5 -5 5 50];Zoom_axes.XLim =
Zoom;ArtifactEnd_sld.Position=[Zoom_axes.InnerPosition(1) 65 Zoom_axes.InnerPosition(3)
3];ArtifactEnd_sld.Limits=Zoom;scaleX_plot.XData = [Zoom(1)+.5/3
Zoom(1)+.5/3];scaleX_text.Position = [Zoom(1)+.5/3 Y_Lim(1)+0.0025 0];');
uilabel(SldPanell, 'FontName', 'Bahnschrift', 'Position',[10 15 100 40], 'Text',{'Zoom
area'; 'Selection:'});
Zoom_highlight = rectangle(Data_axes, 'Position',[Zoom_sld.Value-2.5 -5 5 50], 'FaceColor',[.2 .4
.8 0.2], 'LineStyle',':');
Zoom = [Zoom_sld.Value-2.5 Zoom_sld.Value+2.5];
Delta_Inj_Artifact = uidropdown(SldPanell, 'FontName', 'Bahnschrift', 'Position',[1170 10 100
20], 'Items',{'30 s', '1 min', '1.25 min', '2 min'}, 'ItemsData',[0.5 1 1.25
2], 'Value',1, 'ValueChangedFcn', 'EndOfArt1.Value = ArtifactEnd_sld.Value;EndOfArt2.Value =
ArtifactEnd_sld.Value;EndOfInj1.Value = ArtifactEnd_sld.Value-
Delta_Inj_Artifact.Value;EndOfInj2.Value = ArtifactEnd_sld.Value-Delta_Inj_Artifact.Value;');
uilabel(SldPanell, 'FontName', 'Bahnschrift', 'Position',[1170 25 100 40], 'Text',{'Delta
(Injection/'; 'End of Artifact):'});

% Window Selection Display Panel
PlotPanel2 = uipanel(Artifact, 'Position',[0 60 1280
430], 'FontName', 'Bahnschrift', 'FontSize',13, 'FontWeight', 'bold');
Zoom_axes = uiaxes(PlotPanel2, 'Position',[0 50 1280 390]);
Zoom_axes.YAxis.Visible = 0;
Zoom_axes.XAxis.Visible = 0;
for i = 1:N_Ch
    Zoom_selection = plot(Zoom_axes,time,Data(:,ChSeq(i))-max_Data*i*1.25);
    hold(Zoom_axes, 'on');
end
Y_Lim = Zoom_axes.YLim;
axis(Zoom_axes,[Zoom(1) Zoom(2) Y_Lim(1) Y_Lim(2)]);
xlabel(Zoom_axes, 'Time (min)', 'FontName', 'Bahnschrift', 'FontSize',10);
scaleX_text = text(Zoom_axes,Zoom(1)+.5/3,Y_Lim(1)+0.0025, '3 mV ', 'Color',[0 0
0], 'FontSize',13, 'HorizontalAlignment', 'right', 'VerticalAlignment', 'middle', 'FontName', 'Bahnschr
ift', 'FontWeight', 'bold');
scaleX_plot = plot(Zoom_axes,[Zoom(1)+.5/3 Zoom(1)+.5/3],[Y_Lim(1)+0.001 Y_Lim(1)+0.004], '-
k', 'LineWidth',3);

```

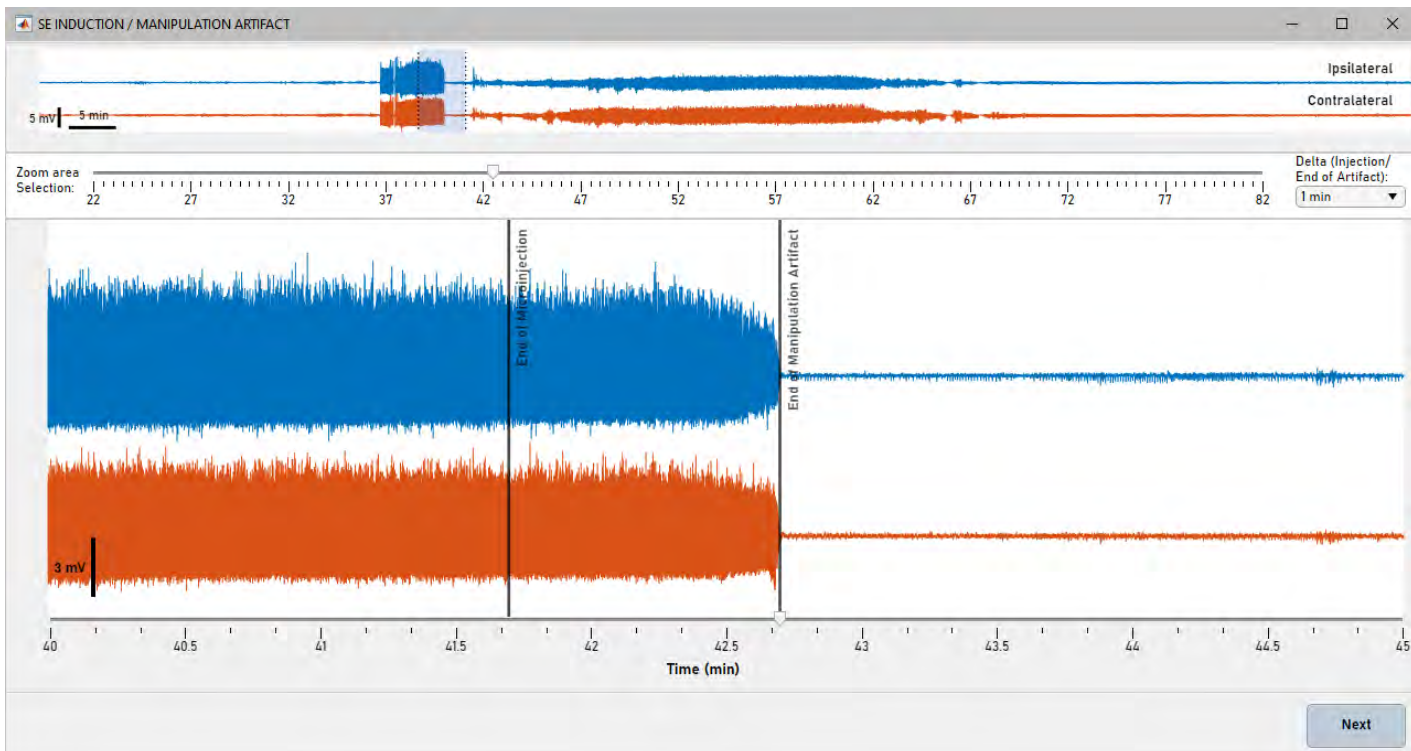
```

% End of Manipulation Artifact Selection
ArtifactEnd_sld = uislider(PlotPanel2,'Position',[Zoom_axes.InnerPosition(1) 65
Zoom_axes.InnerPosition(3)
3], 'MajorTicks',[0:.5:500], 'MinorTicks',[[0:.5/3:500]], 'Limits', Zoom, 'Value', BL(2)+20, 'FontName'
, 'Bahnschrift', 'ValueChangedFcn', 'ArtifactEnd_sld.Value =
(round(ArtifactEnd_sld.Value/(1/60000)))/60000; EndOfArt1.Value =
ArtifactEnd_sld.Value; EndOfInj1.Value = ArtifactEnd_sld.Value-Delta_Inj_Artifact.Value;');
EndOfArt1 = xline(Zoom_axes,ArtifactEnd_sld.Value, "-k", {'End of Manipulation Artifact
'}, "LineWidth", 2, 'FontSize', 10, 'FontName', 'Bahnschrift', 'FontWeight', 'bold');
EndOfInj1 = xline(Zoom_axes,ArtifactEnd_sld.Value-Delta_Inj_Artifact.Value, "-k", {'End of
Microinjection  '}, "LineWidth", 2, 'FontSize', 10, 'FontName', 'Bahnschrift', 'FontWeight', 'bold');
uilabel(PlotPanel2, 'FontName', 'Bahnschrift', 'Position', [600 10 100 20], 'Text', 'Time
(min)', 'FontSize', 14, 'FontWeight', 'bold');
Inj_Art = [ArtifactEnd_sld.Value-Delta_Inj_Artifact.Value ArtifactEnd_sld.Value];

% "Next" button
uibutton(Artifact, 'FontName', 'Bahnschrift', 'Position', [1180 10 90
40], 'Text', 'Next', 'ButtonPushedFcn', 'Inj_Art = [ArtifactEnd_sld.Value-Delta_Inj_Artifact.Value
ArtifactEnd_sld.Value]; Delta_InjArt =
Delta_Inj_Artifact.Value; close(Artifact)', 'FontWeight', 'bold', 'FontSize', 13, 'BackgroundColor', [.
75 .8 .85]);

% Halts execution until input is provided or the window is closed
uiwait(Artifact);

```



```
%% COLORS
```

```

ColorsDef{1} = [0 .3 .8 .2]; ColorsDef{2} = [1 .5 0 .2];
ColorsDef{3} = [0.8050, 0.0780, 0.1840 .2]; ColorsDef{4} = [0.4940, 0.1840, 0.5560 .2];
ColorsDef{5} = [0.4660, 0.6740, 0.1880 .2];
colorMap = hot(256);

```

## %% SEIZURE DETECTION

```
% Options panel
SZdetection = uifigure('Position',[5 45 1350 690],'DeleteFcn','Itr = 1;');
SettingsPanel = uipanel(SZdetection,'Position',[1185 50 160
635],'Title','Settings','FontName','Bahnschrift','FontSize',13,'BackgroundColor','white','FontW
eight','bold');
SZ_DetPanel = uipanel(SettingsPanel,'Position',[5 255 150 355],'Title','Seizure
Detection','FontName','Bahnschrift','FontSize',13,'BackgroundColor','white','FontWeight','bold'
);
Filter_freq = uidropdown(SZ_DetPanel,'FontName','Bahnschrift','Position',[5 280 140
20],'Items',{'1 Hz','2 Hz','3 Hz','4 Hz','8 Hz','13 Hz','30 Hz','80 Hz','No
filter'},'ItemsData',[1 2 3 4 8 13 30 80 0],'Value',4);
uilabel(SZ_DetPanel,'FontName','Bahnschrift','Position',[5 300 140 30],'Text',{'High pass
filter for'; 'seizure detection:'});
SZ_Threshold = uidropdown(SZ_DetPanel,'FontName','Bahnschrift','Position',[5 225 140
20],'Items',{'1.25 x','1.5 x','2 x','3 x','5 x'},'ItemsData',[1.25 1.5 2 3 5],'Value',2);
uilabel(SZ_DetPanel,'FontName','Bahnschrift','Position',[5 245 140 30],'Text',{'Seizure
detection'; 'Threshold:'});
size_RMS = uidropdown(SZ_DetPanel,'FontName','Bahnschrift','Position',[5 170 140
20],'Items',{'25 ms','50 ms','100 ms','250 ms','500 ms','1 s'},'ItemsData',[25 50 100 250 500
1000],'Value',100);
uilabel(SZ_DetPanel,'FontName','Bahnschrift','Position',[5 190 140 30],'Text',{'Root Mean
Square '; 'Window Size:'});
MovMean_Window = uidropdown(SZ_DetPanel,'FontName','Bahnschrift','Position',[5 115 140
20],'Items',{'5 Segments','10 Segments','25 Segments','50 Segments','100 Segments','250
Segments','500 Segments'},'ItemsData',[5 10 25 50 100 250 500],'Value',25);
uilabel(SZ_DetPanel,'FontName','Bahnschrift','Position',[5 135 140 30],'Text',{'Moving Mean
Window '; 'Size:'});
MinIctal = uidropdown(SZ_DetPanel,'FontName','Bahnschrift','Position',[5 60 140
20],'Items',{'500 ms','1 s','2 s','3 s','5 s','10 s'},'ItemsData',[.5 1 2 3 5 10],'Value',3);
uilabel(SZ_DetPanel,'FontName','Bahnschrift','Position',[5 80 140 30],'Text',{'Minimum';
'Ictal:'});
MinInterval = uidropdown(SZ_DetPanel,'FontName','Bahnschrift','Position',[5 5 140
20],'Items',{'1 s','2 s','3 s','5 s','10 s','15 s','25 s'},'ItemsData',[1 2 3 5 10 15
25],'Value',10);
uilabel(SZ_DetPanel,'FontName','Bahnschrift','Position',[5 25 140 30],'Text',{'Minimum';
'Interval:'});

% Analysis size panel
Epoch_panel = uipanel(SettingsPanel,'Title','Epochs
','FontName','Bahnschrift','FontSize',13,'BackgroundColor','white','Position',[5 40 150
210],'FontWeight','bold');
Epoch_Analysis = uidropdown(Epoch_panel,'FontName','Bahnschrift','Editable','on','Position',[5
145 140 20],'Items',{'10 min','30 min','60 min','70 min','80 min','90 min'},'ItemsData',[10 30
60 70 80 90],'Value',90,'ValueChangedFcn','size_Analysis = Epoch_Analysis.Value;');
uilabel(Epoch_panel,'FontName','Bahnschrift','Position',[5 165 140 20],'Text','Analysis:');
Epoch_Power = uidropdown(Epoch_panel,'FontName','Bahnschrift','Editable','on','Position',[5 100
140 20],'Items',{'1 min','2 min','5 min','10 min','20 min'},'ItemsData',[1 2 5 10
20],'Value',5,'ValueChangedFcn','size_Power = Epoch_Power.Value;');
uilabel(Epoch_panel,'FontName','Bahnschrift','Position',[5 120 140 20],'Text','Seg. Power
Analysis:');
CB_TimeSeries = uicheckbox(Epoch_panel,'Text','Time Series','Value', 1,'Position',[5 77 140
15],'FontName','Bahnschrift');
```

```

CB_Latency = uicontrol(Epoch_panel,'Text','Latency','Value', 1,'Position',[5 59 140
15],'FontName','Bahnschrift');
CB_Spectrogram = uicontrol(Epoch_panel,'Text','Spectrogram','Value', 1,'Position',[5 41 140
15],'FontName','Bahnschrift');
CB_BandPower = uicontrol(Epoch_panel,'Text','Band Power','Value', 1,'Position',[5 23 140
15],'FontName','Bahnschrift');

uibutton(SettingsPanel,'FontName','Bahnschrift','Position',[5 5 150 30],'Text','APPLY
CHANGES','ButtonPushedFcn','uiresume(SZdetection)');
uibutton(SZdetection,'FontName','Bahnschrift','Position',[1185 5 160 40],'Text','Proceed to
Analysis','ButtonPushedFcn','RMSwindow = size_RMS.Value;Threshold = SZ_Threshold.Value;Itr = 1;
close(SZdetection)','FontWeight','bold','FontSize',13,'BackgroundColor',[.75 .8 .85]);

%Creates plotting tabs
DetectTabs = uitabgroup(SZdetection,'Position',[0 0 1180 690]);
Channel_1 = uitab(DetectTabs,'Title',Channel_List{ChSeq(1)});
Channel_2 = uitab(DetectTabs,'Title',Channel_List{ChSeq(2)});
Channel_3 = uitab(DetectTabs,'Title',Channel_List{ChSeq(3)});
Channel_4 = uitab(DetectTabs,'Title',Channel_List{ChSeq(4)});
Channel_5 = uitab(DetectTabs,'Title',Channel_List{ChSeq(5)});
Tabs = {Channel_1,Channel_2,Channel_3,Channel_4,Channel_5};

% Plots
Itr = 0;
while Itr < 1
    Check_TimeSeries = CB_TimeSeries.Value;
    Check_Latency = CB_Latency.Value;
    Check_Spectrogram = CB_Spectrogram.Value;
    Check_BandPower = CB_BandPower.Value;

    size_Analysis = Epoch_Analysis.Value;
    size_Power = Epoch_Power.Value;
    if Filter_freq.Value > 0
        Highpass4 =
designfilt('highpassiir','PassbandFrequency',4,'StopbandFrequency',3.4,'PassbandRipple',0.1000,'
StopbandAttenuation',60,'DesignMethod','ellip','SampleRate',1000);
        Data_HP = filtfilt(Highpass4,Data);
    else
        Data_HP = Data;
    end
    for i = 1:N_Ch
        time_rms=(0:size_RMS.Value:size_Data-1)/60000;
        BL_rms{i} = rms(Data_HP((BL(1)*60000)+1:BL(2)*60000,ChSeq(i)));
        Reshaped_Data{i} =
reshape(Data_HP(size_RMS.Value*round(Inj_Art(2)*60000/size_RMS.Value)+1:end,ChSeq(i)),size_RMS.V
alue,[]);
        rms_Data{i} = rms(Reshaped_Data{i});
        MovMean_Data{i} = movmean(rms_Data{i},MovMean_Window.Value);
        SZlogic{i} = (MovMean_Data{i}/BL_rms{i})>SZ_Threshold.Value; SZlogic{i}(1,[1,end])=0;
        SZstart1{i} = time_rms(islocalmax(SZlogic{i},"FlatSelection","first"));
        SZend1{i} = time_rms(islocalmax(SZlogic{i},"FlatSelection","last"));
        SZstart2{i} = SZstart1{i}((SZstart1{i}<SZend1{i})&(SZend1{i})-
SZstart1{i})>=MinIctal.Value/60);

```

```

SZend2{i} = SZend1{i}((SZstart1{i}<SZend1{i})&(SZend1{i)-
SZstart1{i}>=MinIctal.Value/60);
SZstart3{i} = SZstart2{i}(logical([1,SZstart2{i}(2:end)-SZend2{i}(1:end-
1)]>=MinInterval.Value/60));
SZend3{i} = SZend2{i}(logical([SZstart2{i}(2:end)-SZend2{i}(1:end-
1)]>=MinInterval.Value/60,1));
SZs{i} = SZend3{i}-SZstart3{i};
ABSfirstSZ = min(cellfun(@(x)x(1),SZstart3))+Inj_Art(2);

DetectionPlot1_Panel = uipanel(Tabs{i}, 'Position',[0 330 1180 330]);
DetectionPlot1(i) = uiaxes(DetectionPlot1_Panel, 'Position',[0 0 1175 320]);
for ii = 1:length(SZstart3{i})
    rectangle(DetectionPlot1(i), 'Position',[SZstart3{i}(ii)+Inj_Art(2) -max_Data
SZend3{i}(ii)-SZstart3{i}(ii) 2*max_Data], 'FaceColor',[.3 .3 .3 .1], 'LineStyle','none');
end
hold(DetectionPlot1(i), 'on');
plot(DetectionPlot1(i), time, Data(:,ChSeq(i)), "-", "Color", ColorsDef{i});
DetectionPlot1(i).YAxis.Visible = 0;
xlim(DetectionPlot1(i), [0 size_Data/60000]);
ylim(DetectionPlot1(i), [-max_Data max_Data]);
xlabel(DetectionPlot1(i), 'Time (min)', 'FontName', 'Bahnschrift', 'FontSize', 10);
xticks(DetectionPlot1(i), 0:5:1000);
plot(DetectionPlot1(i), [1 1], [-max_Data+0.001 -max_Data+0.004], 'k-', 'LineWidth', 2.2);
text(DetectionPlot1(i), 1, -max_Data+0.0025, ' 3 V', 'Color', [0 0
0], 'FontSize', 13, 'VerticalAlignment', 'middle', 'FontName', 'Bahnschrift');
line(DetectionPlot1(i), BL, [-max_Data*0.2 -max_Data*0.2], 'Color', [.5 .5
.5], 'LineWidth', 3)
text(DetectionPlot1(i), BL(1), -max_Data*0.25, 'Baseline', 'Color', [.5 .5
.5], 'FontSize', 13, 'VerticalAlignment', 'top', 'FontName', 'Bahnschrift');
xline(DetectionPlot1(i), Inj_Art(1), "k");
text(DetectionPlot1(i), Inj_Art(1), -max_Data*0.9, {'End of ' ; 'Microinjection
'}, 'Color', [0 0
0], 'FontSize', 13, 'HorizontalAlignment', 'right', 'VerticalAlignment', 'bottom', 'FontName', 'Bahnschr
ift');
title(DetectionPlot1(i), [GraphTitle '- Time Series (' Channel_List{ChSeq(i)} ')']);
hold(DetectionPlot1(i), 'off');

DetectionPlot2_Panel = uipanel(Tabs{i}, 'Position',[0 0 1180 330]);
DetectionPlot2(i) = uiaxes(DetectionPlot2_Panel, 'Position',[0 0 1175 320]);
area(DetectionPlot2(i), time_rms(end-
length(MovMean_Data{i})+1:end), MovMean_Data{i}/BL_rms{i}, SZ_Threshold.Value, 'FaceColor', ColorsDe
f{i}(1:3), 'EdgeColor', 'none');
hold(DetectionPlot2(i), 'on');
Y_Lim = DetectionPlot2(i).YLim;
xlim(DetectionPlot2(i), [time_rms(end-length(MovMean_Data{i})+1) time_rms(end)]);
ylim(DetectionPlot2(i), Y_Lim);
for ii = 1:length(SZstart3{i})
    rectangle(DetectionPlot2(i), 'Position',[SZstart3{i}(ii)+Inj_Art(2)
SZ_Threshold.Value SZend3{i}(ii)-SZstart3{i}(ii) 100], 'FaceColor',[.3 .3 .3
.1], 'LineStyle','none');
end
xlabel(DetectionPlot2(i), 'Time (min)', 'FontName', 'Bahnschrift', 'FontSize', 10);
ylabel(DetectionPlot2(i), ["Modulus of the Relative Amplitude"; "(X times Baseline[arb.
unit])"], 'FontName', 'Bahnschrift', 'FontSize', 10);

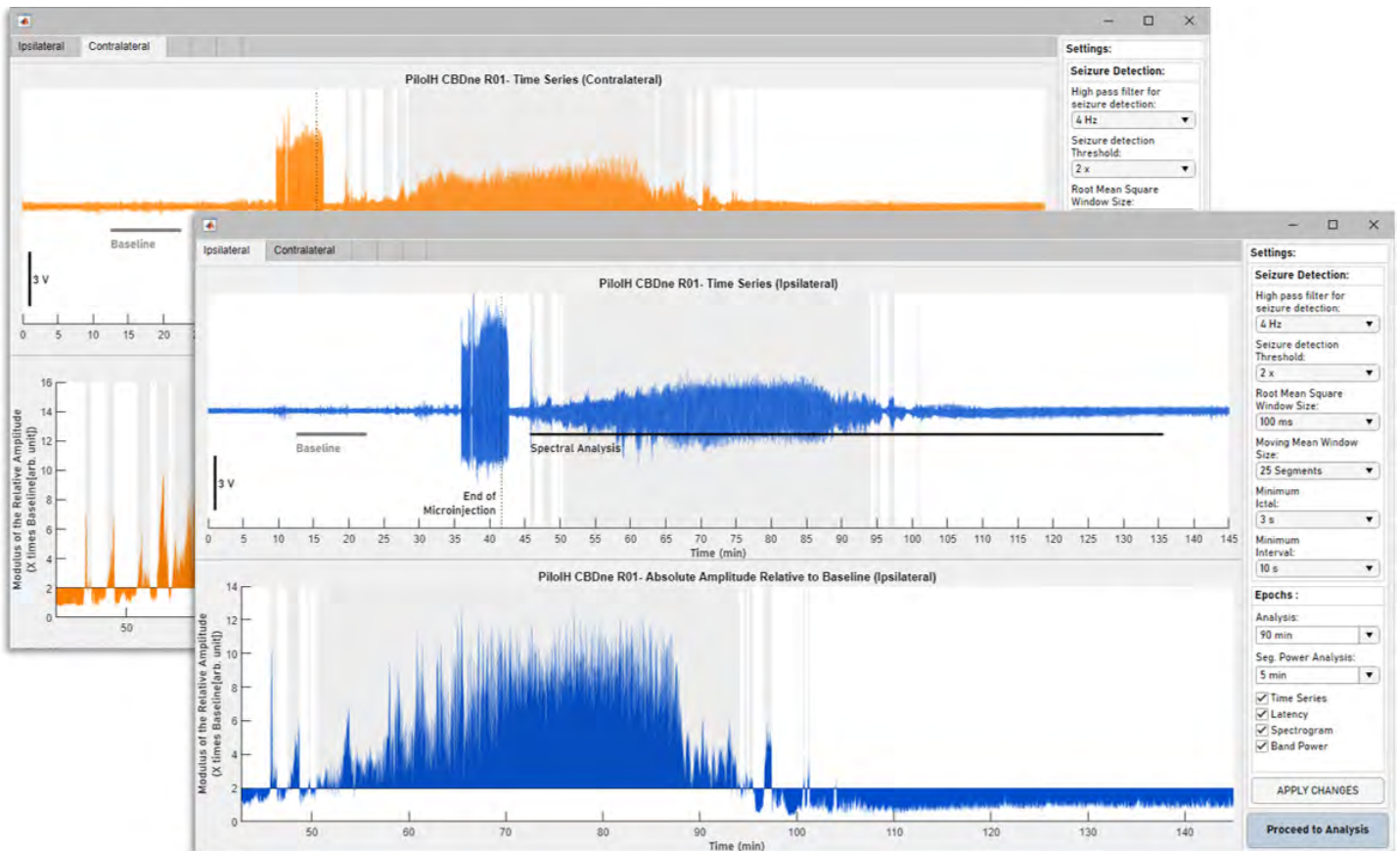
```

```

        title(DetectionPlot2(i),[GraphTitle '- Absolute Amplitude Relative to Baseline ('
Channel_List{ChSeq(i)} ')]);
        hold(DetectionPlot2(i),'off');
    end

    for i=1:N_Ch
        line(DetectionPlot1(i),[ABSfirstSZ ABSfirstSZ+size_Analysis],[-max_Data*0.2 -
max_Data*0.2],'Color',[0 0 0],'LineWidth',2);
        text(DetectionPlot1(i),ABSfirstSZ,-max_Data*0.25,'Spectral Analysis','Color',[0 0
0],'FontSize',13,'VerticalAlignment','top','FontName','Bahnschrift');
    end
    uiwait(SZdetection);
end

```



#### %% DEFINE INDEXES

```

Index_Inj = round(Inj_Art(1)*60000);
Index_endArt = round(Inj_Art(2)*60000);
Index_fistSZ = ABSfirstSZ*60000;
Index_endEpoch = Index_fistSZ + size_Analysis*60000;
Index_BL1 = BL(1)*60000;
Index_BL2 = BL(2)*60000;
t_0 = (-Index_Inj:1:size_Data-Index_Inj-1)/60000;

```

#### %% SPECTROGRAM CALCULATION

```

if Check_Spectrogram
    for i = 1:N_Ch
        [~,BL_F{i},BL_T{i},BL_P{i}] =
spectrogram(Data(Index_BL1:Index_BL2,ChSeq(i)),hann(1000),750,2000,1000,'yaxis');
        [~,F{i},T{i},P{i}] = spectrogram(Data(Index_fistSZ:Index_endEpoch-
1,ChSeq(i)),hann(1000),750,2000,1000,'yaxis');
    end
end

```

```

end
end

```

## %% PLOT FIGURES

```

MainFigure = uifigure('Position',[5 45 1350 690]);

%Creates plotting tabs
ChTabs = uitabgroup(MainFigure,'Position',[0 0 1350 690]);
Channel_1 = uitab(ChTabs,'Title',Channel_List{ChSeq(1)},'Scrollable','on');
Channel_2 = uitab(ChTabs,'Title',Channel_List{ChSeq(2)},'Scrollable','on');
Channel_3 = uitab(ChTabs,'Title',Channel_List{ChSeq(3)},'Scrollable','on');
Channel_4 = uitab(ChTabs,'Title',Channel_List{ChSeq(4)},'Scrollable','on');
Channel_5 = uitab(ChTabs,'Title',Channel_List{ChSeq(5)},'Scrollable','on');
Tabs = {Channel_1,Channel_2,Channel_3,Channel_4,Channel_5};

N_Check = sum([Check_TimeSeries;Check_Latency;Check_Spectrogram;Check_BandPower;]);
Positions = {[0 0 1330 300],[0 300 1330 300],[0 600 1330 300],[0 900 1330 300]};

for i = 1:N_Ch
    Lat_StartSZ{i} = [NaN];
    Lat_StartSE{i} = [NaN];
    SZstart{i} = SZstart3{i}(SZstart3{i}< min(cellfun(@(x)x(1),SZstart3))+size_Analysis);
    SZend{i} = SZend3{i}(SZend3{i}< min(cellfun(@(x)x(1),SZstart3))+size_Analysis);
    if length(SZend{i})<length(SZstart{i});
        SZend{i}(end+1) = min(cellfun(@(x)x(1),SZstart3))+size_Analysis;
    end
    Lat_StartSZ{i} = SZstart{i}(1)+Inj_Art(2)-Inj_Art(1);
    SZs_dur{i} = SZend{i}-SZstart{i};
    if length(SZstart{i})(SZs_dur{i}>30)>=1
        Lat_StartSE{i} = cellfun(@(x)x(1),{SZstart{i}(SZs_dur{i}>30)}+Inj_Art(2)-Inj_Art(1));
    end
end
Abs_LatSZ = min(Lat_StartSZ{:});
Abs_LatSE = min(Lat_StartSE{:});

% Time Series
if Check_TimeSeries
    for i = 1:N_Ch
        TS_Panel{i} = uipanel(Tabs{i},'Position',Positions{N_Check});
        TS_ax{i} = uiaxes(TS_Panel{i},'Position',[0 0 1330
300],'FontName','Bahnschrift','FontSize',13);
        plot(TS_ax{i},t_0,Data(:,ChSeq(i)),'Color',ColorsDef{i});
        hold(TS_ax{i},'on');
        TS_ax{i}.YAxis.Visible = 0;
        ylim(TS_ax{i},[-.010 .010]);
        xlim(TS_ax{i},[-30 t_0(Index_endEpoch)]);
        xlabel(TS_ax{i},'Time (min)','FontName','Bahnschrift','FontSize',10);
        xticks(TS_ax{i},-1000:5:1000);
        plot(TS_ax{i},[-29 -29],[-.009 -.004],'k-','LineWidth',2.2);
        text(TS_ax{i},-29,-.0065,' 5 V','Color',[0 0
0],'FontSize',13,'VerticalAlignment','middle','FontName','Bahnschrift');
        line(TS_ax{i},t_0(round(BL,5)*60000),[-.001 -.001],'Color',[.5 .5 .5],'LineWidth',3)
        text(TS_ax{i},t_0(round(BL(1),5)*60000),-.001,'Baseline','Color',[.5 .5
.5],'FontSize',13,'VerticalAlignment','top','FontName','Bahnschrift');
    end
end

```

```

        xline(TS_ax{i},0,"-k");
        text(TS_ax{i},0,-0.009,{'End of ' ; 'Microinjection '},'Color',[0 0
0], 'FontSize',13, 'HorizontalAlignment', 'right', 'VerticalAlignment', 'bottom', 'FontName', 'Bahnschr
ift');

        xline(TS_ax{i},Inj_Art(2)-Inj_Art(1),":k");
        text(TS_ax{i},Inj_Art(2)-Inj_Art(1),-0.009,{' Animal'; ' Release'},'Color',[0 0
0], 'FontSize',13, 'HorizontalAlignment', 'left', 'VerticalAlignment', 'bottom', 'FontName', 'Bahnschri
ft');

        title(TS_ax{i},[GraphTitle '- Time Series (' Channel_List{ChSeq(i)} ')']);
        for ii = 1:length(SZstart{i})
            rectangle(TS_ax{i}, 'Position', [SZstart{i}(ii)+(Inj_Art(2)-Inj_Art(1)) -50
SZs_dur{i}(ii) 100], 'FaceColor', [.3 .3 .3 .1], 'LineStyle', 'none');
        end

plot(TS_ax{i},Lat_StartSZ{i},.0098,'v','MarkerEdgeColor','none','MarkerFaceColor',[0.9290,
0.6940, 0.1250], 'MarkerSize',7);
    if length(SZstart{i})(SZs_dur{i}>30)>=1
        if Lat_StartSZ{i} == Lat_StartSE{i}

plot(TS_ax{i},Lat_StartSE{i},.009,'v','MarkerEdgeColor','none','MarkerFaceColor',[0.9290,
0.6940, 0.1250], 'MarkerSize',7);
            else

plot(TS_ax{i},Lat_StartSE{i},.0098,'v','MarkerEdgeColor','none','MarkerFaceColor',[0.85, 0,
0], 'MarkerSize',7);
            end
        end
        hold(TS_ax{i}, 'off');

    end
    N_Check=N_Check-1;
end

% Seizure Latency, Duration and and Frequency
if Check_Latency
    for i = 1:N_Ch
        LAT_Panel{i} = uipanel(Tabs{i}, 'Position', Positions{N_Check});
        LAT_ax{i} = uiaxes(LAT_Panel{i}, 'Position', [0 0 1330
300], 'FontName', 'Bahnschrift', 'FontSize',13);

area(LAT_ax{i},(t_0(Index_endArt):RMSwindow/60000:t_0(length(Reshaped_Data{i})*RMSwindow+Index_e
ndArt-
100)),MovMean_Data{i}/BL_rms{i},Threshold, 'FaceColor', ColorsDef{i}(1:3), 'EdgeColor', 'none');
        hold(LAT_ax{i}, 'on');
        Y_Lim = LAT_ax{i}.YLim;
        xlim(LAT_ax{i}, [t_0(Index_endArt) t_0(Index_endEpoch)]);
        xticks(LAT_ax{i},0:5:1000);
        ylim(LAT_ax{i},Y_Lim);
        for ii = 1:length(SZstart{i})
            rectangle(LAT_ax{i}, 'Position', [SZstart{i}(ii)+(Inj_Art(2)-Inj_Art(1)) 0
SZs_dur{i}(ii) 100], 'FaceColor', [.3 .3 .3 .1], 'LineStyle', 'none');
        end
        xlabel(LAT_ax{i}, 'Time (min)', 'FontName', 'Bahnschrift', 'FontSize',10);

```

```

        ylabel(LAT_ax{i},["Modulus of the Relative Amplitude";"(X times Baseline [arb.
unit])"],'FontName','Bahnschrift','FontSize',10);
        title(LAT_ax{i},[GraphTitle '- Absolute Amplitude Relative to Baseline ('
Channel_List{ChSeq(i)} ')]);

        SZ_FreqDur{i}=table([SZstart{i}],[SZend{i}],[SZs_dur{i}],'VariableNames',{'Starting Time
of Seizures','Ending Time of Seizures','Seizure Duration'});
        if ~(Lat_StartSE{i} == [])
            SZ_Latency{i}=table([Lat_StartSZ{i}],[Lat_StartSE{i}],'VariableNames',{'Latency to
First Seizure','Latency to Start of Status Epilepticus'});
        else
            SZ_Latency{i}=table([Lat_StartSZ{i}],[No SE'],'VariableNames',{'Latency to First
Seizure','Latency to Start of Status Epilepticus'});
        end
    end
    N_Check=N_Check-1;
end

%Spectrogram
if Check_Spectrogram
    for i = 1:N_Ch
        SP_Panel{i} = uipanel(Tabs{i},'Position',Positions{N_Check},'Scrollable','on');
        SP_BL_ax{i} = uiaxes(SP_Panel{i},'Position',[0 0
90+1000*(diff(BL)/(size_Analysis+diff(BL))) 300],'FontName','Bahnschrift','FontSize',13);
        SP_ax{i} = uiaxes(SP_Panel{i},'Position',[90+1000*(diff(BL)/(size_Analysis+diff(BL))) 0
1330 300],'FontName','Bahnschrift','FontSize',13);
        SP_ax{i}.YAxis.Visible = 0;
        imagesc(SP_BL_ax{i},BL_T{i},BL_F{i},pow2db(BL_P{i}));
        imagesc(SP_ax{i},T{i},F{i},pow2db(P{i}));
        set(SP_BL_ax{i},'YDir','normal');
        set(SP_ax{i},'YDir','normal');
        colormap(SP_BL_ax{i},colorMap);
        colormap(SP_ax{i},colorMap);
        caxis(SP_BL_ax{i],[-120 -55]);
        caxis(SP_ax{i],[-120 -55]);
        c{i} = colorbar(SP_ax{i});
        ylim(SP_BL_ax{i],[0 100]);
        ylim(SP_ax{i],[0 100]);
        xlim(SP_BL_ax{i],[0 600]);
        xlim(SP_ax{i],[0 5400]);
        xlabel(SP_BL_ax{i},'Baseline','FontName','Bahnschrift','FontSize',10);
        xlabel(SP_ax{i},'Time (min)','FontName','Bahnschrift','FontSize',10);
        ylabel(SP_BL_ax{i},'Frequency (Hz)','FontName','Bahnschrift','FontSize',10);
        xticks(SP_BL_ax{i},0:(diff(BL)*60)/2:diff(BL)*60);
        xticks(SP_ax{i},0:600:5400);
        xticklabels(SP_BL_ax{i},{' ','10 min'});
        xticklabels(SP_ax{i},{'0','10','20','30','40','50','60','70','80','90'});
        title(SP_BL_ax{i},' ');
        title(SP_ax{i},[GraphTitle '- Spectrogram (' Channel_List{ChSeq(i)} ')]);
    end
    N_Check=N_Check-1;
end

% BandPower
if Check_BandPower

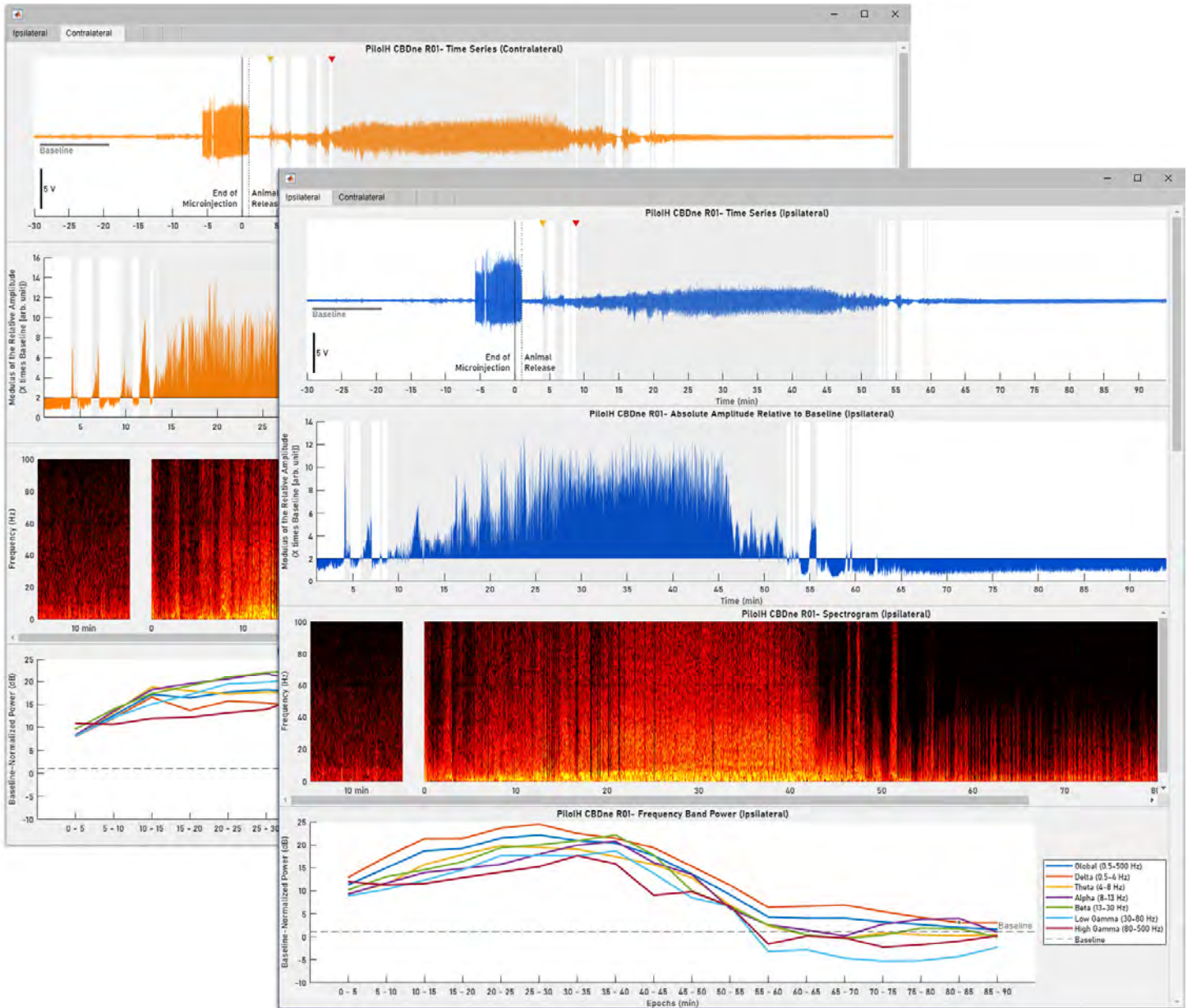
```

```

for i = 1:N_Ch
    power_BL{i}=( [bandpower(Data(BL(1)*60000:BL(2)*60000-1,ChSeq(i)),1000,[0 500]);...
        bandpower(Data(BL(1)*60000:BL(2)*60000-1,ChSeq(i)),1000,[0.5 4]);...
        bandpower(Data(BL(1)*60000:BL(2)*60000-1,ChSeq(i)),1000,[4 8]);...
        bandpower(Data(BL(1)*60000:BL(2)*60000-1,ChSeq(i)),1000,[8 13]);...
        bandpower(Data(BL(1)*60000:BL(2)*60000-1,ChSeq(i)),1000,[13 30]);...
        bandpower(Data(BL(1)*60000:BL(2)*60000-1,ChSeq(i)),1000,[30 80]);...
        bandpower(Data(BL(1)*60000:BL(2)*60000-1,ChSeq(i)),1000,[80 500])]);
    DataSZ{i}=reshape(Data(Index_fistSZ:Index_endEpoch-1,ChSeq(i)),size_Power*60000,[]);
    power_DataSZ{i}=10*log10([bandpower(DataSZ{i},1000,[0.5 500])./power_BL{i}(1)];... %
Global
        (bandpower(DataSZ{i},1000,[0.5 4])./power_BL{i}(2));... % Delta
        (bandpower(DataSZ{i},1000,[4 8])./power_BL{i}(3));... % Theta
        (bandpower(DataSZ{i},1000,[8 13])./power_BL{i}(4));... % Alpha
        (bandpower(DataSZ{i},1000,[13 30])./power_BL{i}(5));... % Beta
        (bandpower(DataSZ{i},1000,[30 80])./power_BL{i}(6));... % Low Gamma
        (bandpower(DataSZ{i},1000,[80 500])./power_BL{i}(7))].'; % High Gamma
    size_PW = size(DataSZ{i});
    bPW_Panel{i} = uipanel(Tabs{i}, 'Position', Positions{N_Check});
    bPW_ax{i} = uiaxes(bPW_Panel{i}, 'Position', [0 0 1330
300], 'FontName', 'Bahnschrift', 'FontSize', 13);
    plot(bPW_ax{i}, power_DataSZ{i}, 'LineWidth', 2);
    yline(bPW_ax{i}, 1, "--k", "Baseline");
    legend(bPW_ax{i}, {'Global (0.5-500 Hz)', 'Delta (0.5-4 Hz)', 'Theta (4-8 Hz)', 'Alpha (8-
13 Hz)', 'Beta (13-30 Hz)', 'Low Gamma (30-80 Hz)', 'High Gamma (80-500
Hz)', 'Baseline'}, 'Location', 'eastoutside');
    xlim(bPW_ax{i}, [0 size_PW(2)+1]);
    xticks(bPW_ax{i}, 0:1:size_PW(2));
    for j=1:size_PW(2)+1
        if j == 1
            xtckLabel{i}(j) = " ";
        else
            xtckLabel{i}(j) = join([string(size_Power*(j-2)) "-" string(size_Power*(j-1))]);
        end
    end
    xticklabels(bPW_ax{i}, xtckLabel{i});
    ylabel(bPW_ax{i}, 'Baseline-Normalized Power
(dB)', 'FontName', 'Bahnschrift', 'FontSize', 10);
    xlabel(bPW_ax{i}, 'Epochs (min)', 'FontName', 'Bahnschrift', 'FontSize', 10);
    title(bPW_ax{i}, [GraphTitle '- Frequency Band Power (' Channel_List{ChSeq(i)} ')']);

end
N_Check=N_Check-1;
end

```



%% SAVE

```

SAVE_Panel = uifigure('Name', 'Save Analysis:', 'Position', [100 100 320 80]);
uilabel(SAVE_Panel, 'FontName', 'Bahnschrift', 'Position', [20 50 300 15], 'Text', 'Would you
like to save your files?');
uibutton(SAVE_Panel, 'FontName', 'Bahnschrift', 'Position', [30 10 120 25], 'Text', 'Save
Analysis', 'ButtonPushedFcn', 'answer = "Save";close(SAVE_Panel)');
uibutton(SAVE_Panel, 'FontName', 'Bahnschrift', 'Position', [180 10 120
25], 'Text', 'Cancel', 'ButtonPushedFcn', 'answer = "Cancel";close(SAVE_Panel)');
answer = "Cancel";
uiwait(SAVE_Panel);
switch answer
    case "Save"
        xlsx_Range1 = {'A1:C1', 'D1:F1', 'G1:I1', 'J1:L1', 'M1:O1', 'P1:R1'};
        xlsx_Range2 = {'A2', 'D2', 'G2', 'J2', 'M2', 'P2'};
        xlsx_Range3 = {'A1:C1', 'D1:F1', 'G1:I1', 'J1:L1', 'M1:O1', 'P1:R1'};
        xlsx_Range4 = {'A2', 'D2', 'G2', 'J2', 'M2', 'P2'};
        for i = 1:N_Ch
            % Latency
            ChT{i} = table(0, 'VariableNames', Channel_List(ChSeq(i)));

```

```

        writetable(ChT{i},[filename
'.xlsx'],'FileType','spreadsheet','Sheet','Latency','Range',xlsx_Range1{i},'UseExcel',true);
        TLatency{i}=table([Lat_StartSZ{i}],[Lat_StartSZ{i}],'VariableNames',{'Seizure
Latency','SE Latency'});
        writetable(TLatency{i},[filename
'.xlsx'],'FileType','spreadsheet','Sheet','Latency','Range',xlsx_Range2{i},'UseExcel',true);
        % Seizures
        ChSZ_T{i} = table(0,'VariableNames',Channel_List(ChSeq(i)));
        writetable(ChSZ_T{i},[filename
'.xlsx'],'FileType','spreadsheet','Sheet','Seizures','Range',xlsx_Range3{i},'UseExcel',true);
        TSZs{i}=table(SZstart{i},'SZend{i}','SZs_dur{i}','VariableNames',{'Seizure
Start','Seizure End','Seizure Duration'});
        writetable(TSZs{i},[filename
'.xlsx'],'FileType','spreadsheet','Sheet','Seizures','Range',xlsx_Range4{i},'UseExcel',true);
        % Power
        TPower{i}=table(power_DataSZ{i}(:,1),power_DataSZ{i}(:,2),power_DataSZ{i}(:,3),power_DataSZ{i}(:,
,4),power_DataSZ{i}(:,5),power_DataSZ{i}(:,6),power_DataSZ{i}(:,7),'VariableNames',{'Global
(0.5-500 Hz)','Delta (0.5-4 Hz)','Theta (4-8 Hz)','Alpha (8-13 Hz)','Beta (13-30 Hz)','Low Gamma
(30-80 Hz)','High Gamma (80-500 Hz)'});
        writetable(TPower{i},[filename
'.xlsx'],'FileType','spreadsheet','Sheet',join(["Power"
Channel_List(ChSeq(i))]),'Range','A1','UseExcel',true);
        end
        TLatency{i+1}=table(Abs_LatSZ,Abs_LatSE,'VariableNames',{'Abs. Seizure
Latency','Abs. SE Latency'});
        writetable(TLatency{i+1},[filename
'.xlsx'],'FileType','spreadsheet','Sheet','Latency','Range',xlsx_Range2{i+1},'UseExcel',true);

        %Graphs
        for i = 1:N_Ch
            exportgraphics(TS_ax{i},[filename ' ' Channel_List{ChSeq(i)} '
TS.tiff'],'Resolution',1000);
            exportgraphics(LAT_ax{i},[filename ' ' Channel_List{ChSeq(i)} '
LAT.tiff'],'Resolution',1000);
            exportgraphics(SP_BL_ax{i},[filename ' ' Channel_List{ChSeq(i)} '
BL_SP.tiff'],'Resolution',1000);
            exportgraphics(SP_ax{i},[filename ' ' Channel_List{ChSeq(i)} '
SP.tiff'],'Resolution',1000);
            exportgraphics(bPW_ax{i},[filename ' ' Channel_List{ChSeq(i)} '
PW.tiff'],'Resolution',1000);
        end

        case "Cancel"
            disp('User opted not to save.')
            disp('Run "SAVE" section of the script to save analysis.')
        end
end

```

