

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA

**AVALIAÇÃO DA ADMINISTRAÇÃO DE DEXAMETASONA SOBRE OS NÍVEIS DE
CITOCINAS INFLAMATÓRIAS EM ANIMAIS SUBMETIDOS AO *KINDLING* POR
PENTILENOTETRAZOL**

Ariane Vitali

Orientadora: Prof^a Dr^a Adriana Simon Coitinho

PORTO ALEGRE, 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA

**AVALIAÇÃO DA ADMINISTRAÇÃO DE DEXAMETASONA SOBRE OS NÍVEIS DE
CITOCINAS INFLAMATÓRIAS EM ANIMAIS SUBMETIDOS AO *KINDLING* POR
PENTILENOTETRAZOL**

Ariane Vitali

Orientadora: Prof^a Dr^a Adriana Simon Coitinho

Trabalho apresentado como um dos requisitos para a obtenção do Grau de Bacharel em Biotecnologia, ênfase em Biotecnologia Molecular.

PORTO ALEGRE, 2015

ARIANE VITALI

**AVALIAÇÃO DA ADMINISTRAÇÃO DE DEXAMETASONA SOBRE OS NÍVEIS DE
CITOCINAS INFLAMATÓRIAS EM ANIMAIS SUBMETIDOS AO *KINDLING* POR
PENTILENOTETRAZOL**

Trabalho apresentado como um dos requisitos para a obtenção do Grau de Bacharel em Biotecnologia, ênfase em Biotecnologia Molecular.

Comissão examinadora:

Prof. Dr. Alex Sander da Rosa Araujo
Departamento de Fisiologia - UFRGS

Prof. Dr. Ionara Rodrigues Siqueira
Departamento de Fisiologia - UFRGS

Prof. Dr. Adriana Simon Coitinho
Depto. de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia - UFRGS

PORTO ALEGRE, 2015

Agradecimentos

Ao final desta monografia, marco de uma longa viagem acadêmica e pretendo agradecer às pessoas que ajudaram na concretização do meu projeto. Por isso, a todas as pessoas, que de algum modo me auxiliaram neste itinerário, que fique expresso o meu reconhecimento e gratidão.

De modo particular dirijo-me com votos de agradecimento à minha orientadora, Professora Adriana Simon Coitinho, pela sua colaboração, compreensão, disponibilidade e auxílio ao construir críticas, opiniões e soluções que foram fundamentais para o encaminhamento deste trabalho.

Agradeço aos meus pais, por me esperarem em casa cada final de semana de braços abertos, pelo apoio especial demonstrado ao longo destes anos, principalmente nos momentos dos apertos em que nada nos parece ajudar.

Aos meus colegas de laboratório, que me auxiliaram ao longo do desenvolvimento do trabalho e pela companhia.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, por ter me proporcionado uma educação de excelência.

Ao meu namorado, Henrique, pelo carinho, amor e paciência ao longo do tempo.

Por último, mas não menos importante, aos meus amigos e colegas que acompanharam minha jornada até aqui.

RESUMO

A epilepsia é uma desordem neurológica caracterizada por crises convulsivas espontâneas e recorrentes que afeta mais de 50 milhões de pessoas no mundo. O tratamento com fármacos anticonvulsivantes é limitado e cerca de 30% dos pacientes não respondem satisfatoriamente à terapia. Nessa situação, a remoção cirúrgica do foco epilético é muitas vezes a única opção terapêutica para alcançar o controle das crises. Diversos estudos demonstraram a influência da inflamação sobre o processo epileptogênico. A dexametasona é um glicocorticóide sintético usado principalmente por seus potentes efeitos anti-inflamatórios, e tem sido demonstrado a sua ação inibitória sobre a atividade epilética. Neste estudo, avaliou-se o efeito da administração de dexametasona na concentração de citocinas inflamatórias (TNF α e IL-1 β), em ratos submetidos ao modelo do *kindling* induzido por pentilenotetrazol (PTZ). Ratos Wistar machos foram divididos em cinco grupos (n=10 por grupo) e receberam salina (NaCl 0,9 %), diazepam (2 mg/Kg) ou diferentes doses de dexametasona (1, 2 e 4 mg/Kg), via intraperitoneal, diariamente, durante 15 dias e, em dias alternados, também receberam doses subconvulsivantes de pentilenotetrazol (PTZ) (20 mg/Kg/mL). Ao final do experimento, eles foram sacrificados e coletaram-se amostras de soro, hipocampo e córtex. Nos dias em que receberam o PTZ, os animais foram observados durante 30 minutos e a intensidade das convulsões foi classificada de acordo com a escala de Racine. Os animais tratados apresentaram redução na intensidade das convulsões frente ao grupo salina, (p<0,005; OneWayANOVA; *post hoc* Dunnet). Na determinação das citocinas por ELISA houve diminuição significativa no nível de IL-1 β nos grupos tratados com diazepam e com 1 e 4 mg/Kg de dexametasona (P<0,005; OneWayANOVA; *post hoc* Tukey). Não houve diferença significativa no córtex e nas amostras de soro foi indetectável. Na determinação de TNF α observou-se diminuição significativa no soro, córtex e hipocampo de animais tratados com a maior dose de dexametasona (4 mg/Kg) quando comparados ao grupo controle salina (p<0,05, ANOVA de uma via, *post hoc* Dunnet). Este trabalho identificou a ação modulatória do glicocorticóide dexametasona sobre os níveis de TNF α e IL-1 β e a consequente diminuição na intensidade das crises convulsivas, demonstrando o grande potencial desse medicamento como um auxiliar para tratamento de epilepsia refratária.

Palavras-chave: epilepsia, dexametasona, inflamação, citocinas

ABSTRACT

Epilepsy is a neurological disorder characterized by spontaneous and recurrent seizures that affects more than 50 million people in the world. The treatment with anticonvulsants drugs is limited and about 30% of the patients do not respond satisfactorily to the therapy. Under these circumstances, the surgical removal of the epileptic focus is often the only therapeutic option to achieve seizure control. Several studies demonstrated the influence of the inflammation on the epileptogenic process. Dexamethasone is a synthetic glucocorticoid used mainly due to its potent anti-inflammatory effects, and an inhibitory effect on the epileptic activity has been showed. In this study, the effect of the administration of dexamethasone on the concentration of inflammatory cytokines (TNF α e IL-1 β) was evaluated in rats submitted to the *kindling* model induced by pentylentetrazole (PTZ). Males Wistar rats were divided in five groups (n=10 per group) and received saline (NaCl 0,9%), diazepam (2 mg/Kg) or different doses of dexamethasone (1, 2 and 4 mg/Kg) via intraperitoneal, daily, for 15 days and, every other day, they received subconvulsants doses of pentylentetrazole (PTZ) (20 mg/Kg/mL). At the end of the experiments, the rats were sacrificed and cortex, hippocampus and serum samples were collected. In the days when PTZ was administered, the animals were observed during 30 minutes and the seizures intensity was classified according to Racine Scale. Treated animals displayed reduced seizure intensity compared to the saline group (p<0,005; OneWayANOVA; *post hoc* Dunnet). Cytokines determination by ELISA, a significant reduction was observed in IL-1 β level in the groups treated with diazepam and with 1 and 4 mg/Kg of dexamethasone (P<0,005; OneWayANOVA; *post hoc* Tukey). There was no significant difference was observed in the cortex and it was undetectable in the serum samples. For the TNF α determination, it was observed a significant reduction in the serum, cortex and hippocampus of animals treated with the highest dose of dexamethasone (4 mg/Kg) when compared to the saline control group (p<0,005, one-way ANOVA, *post hoc* Dunnet). This work has identified the modulatory action of the glucocorticoid dexamethasone on the TNF α and IL-1 β levels and the consequent diminishment in the intensity of seizures, demonstrating the great potential of this drug to assist in the treatment for refractory epilepsy.

Key words: epilepsy, dexamethasone, inflammation, cytokines.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Representação esquemática da cascata de eventos hipotética entre inflamação periférica e crises convulsivas.....14
- Figura 2:** Comparação dos diferentes danos iniciais que levam a uma cascata de eventos inflamatórios podendo ocasionar epilepsia.....17
- Figura 3:** Mecanismos de ação dos glicocorticóides.....23
- Figura 4:** Efeito da dexametasona em diferentes parâmetros analisados na tarefa do campo aberto (*Open Field*).....31
- Figura 5:** Avaliação do efeito da dexametasona sobre a atividade convulsivante resultante do *kindling* por pentilenotretazol (PTZ).....33
- Figura 6** Níveis da citocina TNF α em soro de animais tratados com dexametasona e submetidos ao *kindling* por PTZ35
- Figura 7:** Níveis da citocina TNF α no hipocampo de animais tratados com dexametasona e submetidos ao *kindling* por PTZ35
- Figura 8:** Níveis da citocina TNF α no córtex de animais tratados com dexametasona e submetidos ao *kindling* por PTZ.....36
- Figura 9:** Níveis da citocina IL-1 β no córtex de animais tratados com dexametasona e submetidos ao *kindling* por PTZ.....37
- Figura 10:** Níveis da citocina IL-1 β no hipocampo de animais tratados com dexametasona e submetidos ao *kindling* por PTZ.....39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Terminologia e Conceitos de Epilepsia e Crises convulsivas.....	11
Tabela 2: Delineamento experimental.....	27
Tabela 3: Escala de Racine.....	29

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 EPILEPSIA.....	10
1.1.1 Tipos e mecanismos de epilepsia	10
1.2 INFLAMAÇÃO E NEUROINFLAMAÇÃO	12
1.3 PAPEL DA INFLAMAÇÃO NA EPILEPSIA	15
1.3.1 Crises convulsivas induzem inflamação	15
1.3.2 Inflamação causa crises convulsivas	16
1.4 CITOCINAS INFLAMATÓRIAS.....	18
1.4.1 Interleucina-1β (IL-1β)	19
1.4.2 Fator de Necrose Tumoral α (TNFα)	20
1.5 TRATAMENTOS ANTICONVULSIVANTES	21
1.6 GLICOCORTICÓIDES	22
2 JUSTIFICATIVA	25
3 OBJETIVOS	26
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1 ANIMAIS E TRATAMENTOS	27
4.2 PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS.....	27
4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICONVULSIVANTE.....	28
4.4 OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	29
4.5 DETERMINAÇÃO DAS CITOCINAS	29
4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	30
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31

5.1	TESTE DO CAMPO ABERTO (<i>OPEN FIELD</i>).....	31
5.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICONVULSIVANTE.....	32
5.3	DETERMINAÇÃO DAS CITOCINAS INFLAMATÓRIAS.....	34
5.3.1	TNF α	34
5.3.2	IL-1 β	37
6	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	42
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

1. INTRODUÇÃO

1.1 EPILEPSIA

A epilepsia é uma desordem cerebral caracterizada por crises convulsivas que tendem a se repetir ao longo da vida do paciente. Usualmente, as crises se apresentam como breves episódios de movimento involuntário, e são, por vezes, acompanhadas por perda de consciência e de controle da função intestinal ou vesical (VEZZANI et al., 2013). Essa desordem afeta mais de 50 milhões de pessoas no mundo, sendo considerada um dos distúrbios neurológicos mais comuns. Aproximadamente 90% dos casos de epilepsia ocorrem em países em desenvolvimento (WHO, 2015 ; MARCHETTI et al., 2005). No Brasil, estima-se que a prevalência seja de 1,4% da população em geral, porém, somente 10% a 40% recebem algum tipo de tratamento (TAVARES et al., 2014). A epilepsia possui registros que datam de 4000 a.C, sendo, portanto, considerada uma das patologias mais antigas reconhecidas do mundo (WHO, 2015).

A condição afeta pessoas de todas as idades, raças, gêneros e níveis sociais e, devido à falta de informação e conceitos errados sobre a doença, elas frequentemente sofrem preconceitos e discriminação (World Health Assembly, 2015). Essa intolerância sobre portadores dessa doença afeta as suas famílias, vida social, emprego, perspectivas conjugais e auto-estima (MARCHETTI et al., 2005). Pessoas que apresentam crises convulsivas tendem a ter mais problemas psicológicos, como ansiedade e depressão, além de problemas físicos decorridos de traumas durante as convulsões. Além disso, o risco de morte prematura em pessoas com epilepsia é até três vezes mais elevado do que na população em geral (RODRIGUES et al., 2012).

1.1.1 Tipos e mecanismos de epilepsia

É muito importante ter uma distinção clara entre os conceitos de epilepsia e crise epiléptica/convulsiva. A epilepsia é uma síndrome neurológica em que se encontra uma anormalidade epileptogênica no cérebro a qual vai levar ao aparecimento de crises convulsivas recorrentes. As mesmas podem se apresentar

de diferentes formas, conforme o comprometimento do hemisfério afetado (GITAÍ et al., 2008). Uma crise epiléptica não caracteriza um quadro de epilepsia. Para que isso ocorra, é necessário que haja duas ou mais crises originadas espontaneamente no período de um ano (Academia Brasileira de Neurologia, 2015). As crises podem ocorrer de forma isolada como resposta a algum desequilíbrio entre excitação e inibição no cérebro e, dependendo da localização, as crises podem ser parciais ou generalizadas (Tabela 1) (SILVA, et al., 2008 ; FERNANDES, 2013).

Tabela 1: Terminologia e Conceitos de Epilepsia e Crises convulsivas

Tipos de Crises	
Focal	Crises focais são originadas dentro de redes limitadas a um hemisfério
Generalizada	Crises com envolvimento nos dois hemisférios cerebrais
Etiologia	
Genética	A epilepsia é resultado direto de um defeito genético conhecido ou presumível
Estrutural/Metabólica	Há alguma outra condição metabólica ou estrutural distinta que demonstrou estar associada com desenvolvimento de epilepsia. Estes distúrbios podem ser de origem genética ou adquirida.
Desconhecida	A natureza da causa é desconhecida, pode ter uma base genética desconhecida ou ser consequência de uma desordem estrutural/metabólica ainda não identificada

Adaptada de *International League against Epilepsy* (BERG et al., 2011)

A epilepsia pode ser causada por diferentes doenças ou lesões cerebrais, entre as mais frequentes estão: anomalia cerebral durante o desenvolvimento; traumatismo craniano; hemorragias; anóxia durante o parto; tumores; infecção cerebral; crises prolongadas e crises febris (FERNANDES, 2013). Ela pode ser definida em um complexo de mais de 40 tipos de síndromes, sendo diferenciada através dos aspectos clínicos que apresenta. Para classificação leva-se em conta idade do início do evento epiléptico, padrões encefalográficos, padrão de recorrência, existência na família e prognóstico da doença (LEAL, 2011). Entre as diferentes regiões cerebrais em que as crises podem ocorrer, observa-se uma maior

predisposição do lobo temporal ao desenvolvimento da epilepsia. Com isso, a Epilepsia do Lobo Temporal (ELT) é a mais frequente forma em pacientes adultos, com cerca de 60% de prevalência. Além disso, é a forma que apresenta maior refratariedade aos tratamentos farmacológicos sendo a mais indicada a intervenção cirúrgica (ENGEL et al., 1997)

As crises convulsivas ocorrem devido a um desequilíbrio sináptico. No funcionamento cerebral normal, ocorre um equilíbrio entre excitação e inibição dos neurônios (RIAZI, 2009). Sinapses excitatórias fazem com que se abram canais por onde passam íons carregados positivamente (sódio e cálcio) e sinapses inibitórias, íons carregados negativamente (cloro). Nos focos epilépticos existe um predomínio de sinapses excitatórias sobre sinapses inibitórias. Portanto, qualquer tipo de alteração nesse mecanismo de controle pode levar a um aumento da excitabilidade neuronal, diminuição da inibição, ou ambos, ocasionando um aumento súbito e excessivo na atividade elétrica de um grupo de neurônios e, conseqüentemente, uma crise epiléptica. (CHAVES et al., 2008). Apesar dos mecanismos celulares responsáveis pela origem das crises ainda não estarem totalmente elucidados, existem algumas hipóteses relacionadas: (1) mutações que levam a alterações nos canais iônicos de sódio e potássio (2) hipersensibilidade dos canais de cálcio (3) hiperatividade glutamérgica (4) lesão do hipocampo (SILVA et al., 2008).

1.2. INFLAMAÇÃO E NEUROINFLAMAÇÃO

A inflamação é uma resposta imunológica importante para a regulação da homeostase corporal. Ela pode ser gerada a partir de danos causados por estímulos nocivos (agentes químicos, físicos ou por patógenos) com o objetivo de remover o patógeno e reparar o tecido (VEZZANI, 2013). O processo inflamatório consiste na produção de uma cascata de mediadores inflamatórios a partir do tecido afetado e do sangue, e envolve a ativação da imunidade inata e adaptativa. Diferentes linhagens celulares atuam na atividade pró-inflamatória, de acordo com o estímulo ambiental celular em que se encontram, e o reconhecimento desse ambiente é mediado por proteínas solúveis chamadas citocinas (LEAL, 2011). Esses mediadores inflamatórios podem ser produzidos por neurônios, células gliais, células

endoteliais da barreira hemato-encefálica (BHE) e células do sistema imunológico (VEZZANI et al., 2011).

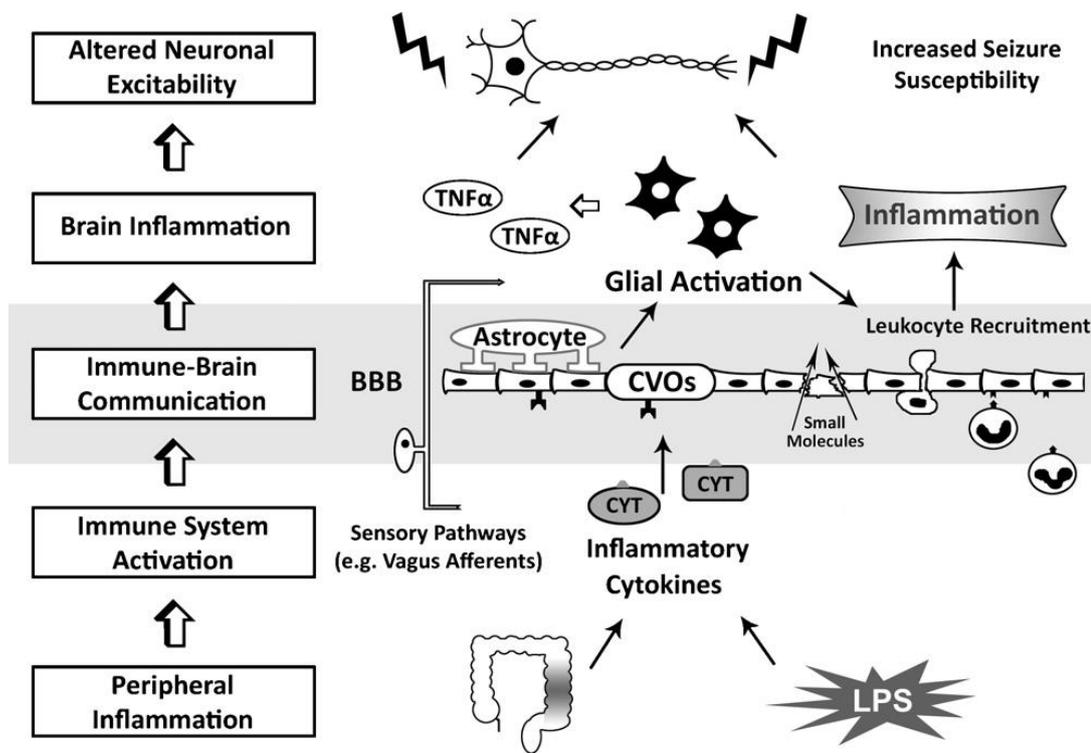
O sistema nervoso central (SNC) possui um caráter imunoprivilegiado oferecido pela barreira hemato-encefálica devido ao tráfego reduzido de monócitos e linfócitos entre SNC e sangue. A BHE consiste em uma camada de células endoteliais que envolvem o encéfalo e possuem o papel de permitir a troca de água, proteínas, íons e a endocitose de receptores específicos, controlando, assim, o balanço hídrico cerebral e conferindo proteção através de uma barreira semipermeável e seletiva (ABBOT et al., 1996). A BHE representa um fator regulatório chave na comunicação entre células do cérebro e células do sistema imune periférico (GORTER et al., 2015). Existem três grupos celulares distintos transpondo a BHE: neurônios, macroglia e microglia. As células da macroglia (astrócitos e oligodendrócitos) apresentam função de regulação de permeabilidade da BHE e mielização axonal enquanto que as microglias possuem um papel fagocítico (CHOI, 2008).

Uma resposta inflamatória no SNC pode ser desencadeada na ausência de infecção. Lesões no cérebro como convulsão, traumas ou até mesmo crises convulsivas prolongadas, podem causar alterações na permeabilidade na BHE levando ao extravasamento de células e moléculas do sistema imune periférico para dentro do SNC, podendo ocasionar inflamação local e predispor crises convulsivas (VEZZANI et al., 2011).

Doenças inflamatórias sistêmicas estão associadas com o aparecimento de uma resposta inflamatória no cérebro similar àquela ocorrida na periferia, chamada de reação inflamatória espelho. Alguns mecanismos foram propostos para tentar explicar como pode ocorrer essa indução: (1) Sinalização de citocinas, que podem ser transportadas através da BHC do sangue para o cérebro e, assim, sinalizar uma ativação ao sistema imune inato da periferia. Essa citocina desencadeia uma resposta inflamatória, ativando astrócitos e microglias, tornando-as fontes de mediadores inflamatórios, levando a uma cascata de ativação, induzindo a propagação de uma resposta local; (2) A infiltração de células do sistema imune periférico no cérebro também seria uma via de comunicação. A produção de citocinas e quimiocinas pelas microglias leva ao recrutamento de leucócitos para BHC, os quais se aderem às células endoteliais através das moléculas de adesão e

ultrapassam a barreira. Essa invasão leva a alteração na neurotransmissão, produção de citocinas e inflamação local, podendo ocasionar crises convulsivas (Figura 1) (RIAZI et al., 2009).

Altos níveis de citocinas foram documentados em distúrbios neurológicos e estudos demonstram que as citocinas inflamatórias presentes no sistema nervoso central são Interleucina 1- β (IL1- β), Fator de Necrose Tumoral α (TNF α) e Interleucina-6 (IL-6) (SINHA et al., 2008; VEZZANI et al., 2013).



(RIAZI, 2009)

Figura 1: Representação esquemática da cascata de eventos hipotética entre inflamação periférica e crises convulsivas. Representação de cascata de eventos desde o início de uma inflamação periférica até o aumento da susceptibilidade a crises epiléticas. A ativação de uma resposta imune periférica, no exemplo da figura por colite ou LPS (lipopolissacarídeo), um dos componentes principais da membrana exterior de bactérias gram-negativas que provoca uma forte resposta inflamatória, pode ocasionar uma resposta inflamatória no SNC através da sinalização das citocinas induzidas. Esta resposta inflamatória-espelho é mediada por citocinas, como no exemplo a (TNF α), assim como pela interações entre leucócitos e células gliais através da barreira hematoencefálica. O desencadeamento de uma resposta imune no SNC pode levar a uma alteração na excitabilidade neuronal, podendo ocasionar início de crises convulsivas.

1.3 PAPEL DA INFLAMAÇÃO NA EPILEPSIA

Apesar dos diversos estudos já realizados, a complexa relação entre inflamação e epilepsia ainda não foi bem elucidada. Nos últimos anos, um grande número de evidências clínicas e experimentais suporta a hipótese de que processos inflamatórios dentro do cérebro podem ser um mecanismo crucial da fisiopatologia de crises convulsivas. Por outro lado, evidências também sugerem que a inflamação pode ser uma consequência dos episódios epiléticos. Um estudo mostrou que a atividade epilética *per se* induz inflamação no cérebro e as crises recorrentes fazem com que se propague uma inflamação crônica, podendo, assim, haver desenvolvimento do quadro de epilepsia (VEZZAN et al., 2011). Todos os fatores de risco comuns para a epilepsia como traumas, tumores e infecções são acompanhados por diferentes níveis de inflamação do SNC (RIAZI, 2009).

As evidências de que mecanismos imunes e inflamatórios atuam em algumas formas de epilepsia se baseiam em diferentes achados clínicos: (1) esteróides e outros tratamentos anti-inflamatórios apresentaram atividade anticonvulsivante em alguns pacientes fármaco-resistentes (VEZZANI et al., 2013); (2) aumento nos níveis de agentes pró-inflamatórios que coincidem, ou causam, convulsões febris (DUBÉ et al, 2007 ; RIAZI, 2009); (3) ativação do sistema imune em pacientes com desordens convulsivas e alta incidência de convulsões em doenças auto-imunes (BIEN et al., 2007). Essas informações, juntamente com os relatos da existência de um estado de inflamação crônica em análise de cérebros de indivíduos epiléticos, sugerem que a inflamação e a epilepsia podem estar intimamente associadas (RAVIZA et al., 2006 ; HEIDA et al., 2005).

1.3.1 Crises convulsivas induzem inflamação

Análises imunohistoquímicas em cérebros de roedores após a indução de convulsões identificaram sinais de inflamação envolvendo diferentes populações celulares (VEZZANI et al, 2005). Em estudos utilizando modelos animais em que houve a indução de crises convulsivas por quimioconvulsivantes, *kindling* ou estimulação elétrica, houve uma rápida indução de mediadores inflamatórios em

algumas regiões do cérebro. Isso inclui citocinas inflamatórias como IL-1 β , IL-6 e TNF α , receptores *Toll-like* (TLRs), produção de quimiocinas, ativação de fator nuclear kappa B (NF κ B) e do sistema complemento e aumento na expressão de moléculas de adesão (DE SIMONI et al, 2000; RAVIZZA et al, 2008; RAVIZZA et al, 2010). As células do endotélio cerebral são as responsáveis pelo início dessa produção de mediadores inflamatórios que é induzida na presença de crises. Após iniciada a cascata de eventos inflamatórios, como já descrito anteriormente, pode ocorrer o recrutamento periférico de componentes do sistema imune, levando a infiltração na BHE. A consequente inflamação, pode afetar a severidade e recorrência das crises, além de perda neuronal (RAVIZZA et al, 2010).

1.3.2 Inflamação causa crises convulsivas

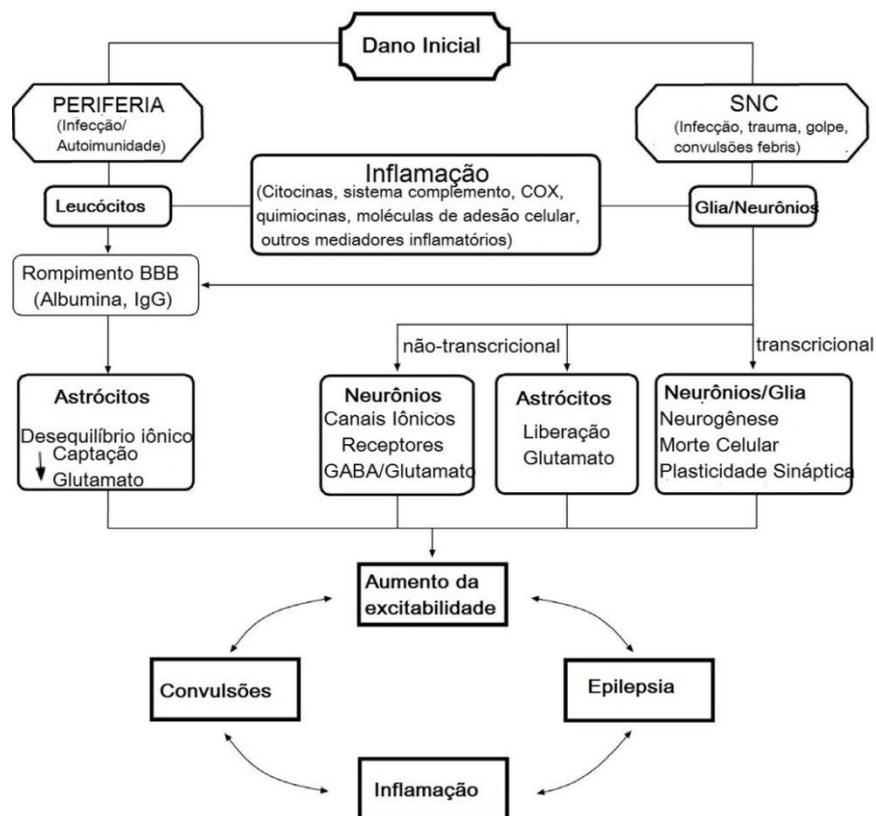
Diversas linhas de evidência mostraram que um estado pré-existente de inflamação periférica ou no cérebro pode aumentar susceptibilidade a crises convulsivas (RHO et al., 2010). A resposta inflamatória periférica leva à produção de moléculas necessárias para a migração leucocitária através da BHE, como moléculas de adesão e proteínas com imunoglobulinas e albumina. Esses componentes podem se ligar aos receptores dos astrócitos, promovendo diminuição da recaptação de glutamato, aumentando, assim, a excitabilidade neuronal, favorecendo aparecimento de crises convulsivas (Figura 2) (LEAL, 2011).

A causa que mais favorece essa hipótese é a grande susceptibilidade de ocorrência de crise epiléptica quando em um quadro de febre alta. Em crianças, a febre é a causa mais frequente de crises convulsivas. A resposta inflamatória promove a liberação de prostaglandinas que vão atuar sobre o hipotálamo e desenvolver a reação febril. A elevação da temperatura corporal promove aumento de IL1- β que vai levar a uma cascata de produção de mediadores inflamatórios (DUBÉ et al., 2007).

Análises experimentais mostraram que a injeção de lipopolissacarídeo (LPS), um dos componentes principais da membrana externa de bactérias gram-negativas que provoca uma forte resposta inflamatória, diminuiu o limiar para início das crises em animais induzidos por pentilenotetrazol (PTZ) (SAYYAH, 2003). Isso ocorre porque LPS promove a ativação de TLR4 (receptor do tipo *Toll*), induzindo produção

de uma proteína chamada *high mobile group box 1* (HMGB1) que é um potente ativador de microglia e astrócitos, favorecendo aumento da excitabilidade neuronal (MAROSO et al, 2010).

Alguns estudos farmacológicos utilizando modelos animais de convulsões em roedores, em que havia a injeção de indutores inflamatórios como citocinas, sistema complemento ou receptores de prostaglandinas, mostraram uma diminuição do limiar para ocorrência de crises convulsivas (RAVIZZA et al., 2013 ; RAO, 2008; SAYYAH, 2003). Além disso, injeção intracerebral de antagonistas específicos de moléculas pró-inflamatórias diminuiu os efeitos convulsivantes em ratos (VEZZANI, 2014).



(Adaptada de VEZZANI, 2014)

Figura 2: Comparação dos diferentes danos iniciais que levam a uma cascata de eventos inflamatórios podendo ocasionar epilepsia. Nessa figura há a comparação de como danos iniciados, seja no SNC por traumas locais ou infecção, ou na periferia por infecções ou doenças auto-ímmunes, podem levar à ativação de células do cérebro ou de leucócitos, respectivamente. Essas células liberam mediadores inflamatórios no cérebro ou no sangue, iniciando, assim, uma cascata de eventos inflamatórios que levam a

crises convulsivas. A produção dos mediadores inflamatórios é responsável por ativação da sinalização de neurônio e células da glia e pode também afetar a permeabilidade da barreira hematoencefálica, levando ao rompimento e liberação de albumina e IgG. Esses mediadores ativam receptores específicos expressos pelas glias e neurônios, induzindo efeitos não transcricionais em canais iônicos, receptores de glutamato e liberação de neurotransmissores, levando a aumento da excitabilidade neuronal. A ativação transcricional de genes também pode ser desencadeada por moléculas inflamatórias, tais como citocinas que podem contribuir para diminuição do limiar para ocorrência de convulsão através da expressão de genes envolvidos na neurogênese, morte celular e na plasticidade sináptica. A liberação de IgG e albumina pode promover a ativação de sinais inflamatórios e prejudicar a função dos astrócitos como regulação das concentrações extracelulares de potássio e reabsorção de glutamato extracelular. Estes efeitos contribuem para aumento da excitabilidade neuronal e consequente geração de convulsões que, por sua vez, ocasionam mais inflamação, estabelecendo-se assim um ciclo vicioso que contribui para o desenvolvimento de epilepsia.

1.4 CITOCINAS INFLAMATÓRIAS

A comunicação entre células do sistema imunológico ocorre via contato direto célula-célula ou via moléculas solúveis chamadas citocinas (VEZZANI et al., 2005). Citocinas são proteínas de baixo peso molecular secretadas por diversas células no organismo em resposta a inúmeros estímulos atuando como mensageiras do sistema imunológico. São capazes de mediar diversas funções celulares e, ao entrarem em contato com elas, as células podem sofrer diferenciação, proliferação, ativação ou inibição. As citocinas se ligam aos receptores específicos das membranas das células-alvo, disparando sinais que alteram a expressão gênica. A ligação com esses receptores pode ser do tipo autócrina, agindo na própria célula produtora, parácrina, atuando em células próximas e endócrina, quando sua ação é à distância. Citocinas são produzidas principalmente pelos linfócitos T auxiliares e as células Th1 produzem citocinas relacionadas principalmente com a defesa mediada por fagocitose contra agentes infecciosos intracelulares, ou seja, com caráter pró-inflamatório, como, por exemplo, Interferon-gama (INF- γ), Interleucina-2 (IL-2), IL-1, IL-6 e Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α). As células Th2 secretam citocinas relacionadas com a produção de anticorpos IgE e reações imunes contra alérgenos, como Interleucina-4 (IL-4), Interleucina-5 (IL-5), Interleucina-10 (IL-10) e Interleucina-13 (IL-13) (ABBAS et al, 2008).

1.4.1 Interleucina 1 β (IL-1 β)

A IL-1 β é uma das formas moleculares de IL-1, produzida por praticamente todos os tipos celulares nucleados, principalmente monócitos, macrófagos e células dendríticas. Está entre os mais importantes marcadores de indução da resposta inflamatória, agindo em conjunto com TNF α na resposta imune inata e adaptativa (ABBAS et al, 2008). No SNC é constitutivamente expressa em níveis muito baixos e atua como um mediador entre células gliais e neurônios. As alterações promovidas por ela são relacionadas ao extravasamento de proteínas o que pode levar ao início de uma resposta inflamatória, acarretando instabilidade da BHE. (RAVIZZA et al., 2008).

Esta citocina apresenta seus efeitos biológicos após ligação com seu receptor, IL1R, ocasionando uma cascata de fosforilações que promove a formação de um complexo de cinases e proteínas responsáveis pela ativação de NF κ B (um fator de transcrição que desempenha papel fundamental na resposta imunológica a inflamação), transcrição de genes relacionados a IL-6 e TNF α , além de atuar sobre balanço de íons dos neurônios (BALOSSO et al., 2005). O mecanismo de inibição natural dessa citocina envolve o bloqueio da ligação no receptor por antagonistas de receptores de citocinas, o IL-1Ra, uma molécula secretada por monócitos e macrófagos, que modula uma variedade de respostas imunes e inflamatórias relacionadas à IL-1 (COSTA et al., 2008).

A IL-1 β é pouco detectada em um cérebro saudável, mas sua expressão, assim como de seu receptor IL-1R, é rapidamente aumentada nas células glia em diversas situações patológicas do SNC (VEZZANI et al, 2012). Durante experimentos de indução de crises convulsivas ela foi altamente expressa pelas microglias, astrócitos e células endoteliais do SNC, persistindo mesmo na ausência de crises (RAVIZZA et al., 2008).

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC. Ele possui dois tipos de receptores, os ionotrópicos (acoplados a canais iônicos) e os metabotrópicos (acoplados a proteína G). A ligação de IL-1 β ao seu receptor induz as Src kinases a fosforilarem as subunidades dos receptores NMDA (N-metil-D-aspartato), receptores ionotrópicos de glutamato, permitindo influxo de Ca²⁺ nos

neurônios e promovendo despolarização dos mesmos (BALOSSO, et al., 2008). A rápida recaptação de glutamato é necessária para neurotransmissão excitatória normal e prevenção contra excitotoxicidade. A IL-1 β também inibe a recaptação de glutamato pelos astrócitos, aumentando a liberação do mesmo pelos neurônios, promovendo, assim, a excitabilidade neuronal (HU et al., 2000). O principal neurotransmissor inibitório, o ácido γ -aminobutírico (GABA), quando se liga ao seu receptor, permite a entrada do íon cloreto para dentro da célula, ocasionando a hiperpolarização da mesma. Com isso, dificulta-se a hiperpolarização, levando a uma inibição da condução neuronal. A IL-1 β também podem inibir o fluxo de Cl⁻ mediado por GABA, reduzindo, assim, a transmissão inibitória (WANG et al., 2000).

1.4.2 Fator de Necrose Tumoral α (TNF α)

O TNF α é considerado um dos principais mediadores da resposta inflamatória a patógenos bacterianos. Sua produção é realizada principalmente por macrófagos e células T no sistema imunológico e por microglias e astrócitos no sistema nervoso (LU et al., 2008). Entre as suas funções biológicas está o recrutamento de neutrófilos e monócitos através da ativação endotelial e a promoção da secreção de quimiocinas. No SNC, quando ligado a seus receptores, promove ativação de NF κ B e apoptose (ABBAS, 2008).

A expressão de TNF α , assim como de IL-1 β , também aumenta rapidamente após a indução de crises convulsivas, porém ela retorna aos níveis basais após 2 dias do evento inicial (DE SIMONI et al., 2000). Os níveis aumentados dessa citocina também são notados em outras doenças que afetam o SNC como meningite, esclerose múltipla e doença de Alzheimer (LU et al., 2008)

O papel de TNF α nas crises convulsivas ainda é controverso. Ele possui dois tipos distintos de receptores: receptor TNF α tipo I ou p55 e receptor TNF α tipo II ou p75. O p55 contém um “domínio intracelular morto” e demonstra contribuir para o dano celular, e o receptor p75 aparenta ter um papel protetor neuronal. A maioria das respostas biológicas atribuídas ao TNF α são mediadas pelo receptor tipo I (LU et al., 2008). Um estudo demonstrou que a citocina quando interage com o seu receptor TNF α tipo II, apresenta um papel de redução das crises (BALOSSO, 2005). Em outros experimentos, utilizando animais com deleção do gene do receptor TNF α

tipo I, a citocina também demonstrou um papel protetor nas crises convulsivas (LU et al, 2008). Por isso, acredita-se que TNF α possui um papel ambíguo em relação a atividade convulsivante. A concentração da citocina e o tipo de receptor expresso afetam diretamente o resultado das convulsões (LEAL, 2011).

1.5 TRATAMENTOS ANTICONVULSIVANTES

A abordagem de tratamento de crises convulsivas se dá através da utilização de fármacos antiepilépticos (DAEs) e anticonvulsivantes, após cuidadoso diagnóstico. O tratamento é indicado após a segunda crise convulsiva, pois o risco de recorrência sobe de 46% para 70%. (HAUSER et al., 1998). Os principais fármacos utilizados são carbamazepina, clobazam, oxcarbezina, fenitoína, ácido valpróico, topiramato e lamotrigina. A intervenção farmacológica, seja através dos DAEs convencionais ou dos fármacos ditos de nova geração, tem como objetivo abolir as crises, sem interferir com a atividade cognitiva do paciente (PERUCCA, 2002). O tratamento é necessário a fim de evitar os riscos associados a ocorrência de convulsões, seja pelos possíveis acidentes, melhora na qualidade de vida do paciente ou também pela prevenção da morte neuronal que ocorre em cada descarga elétrica, que pode vir a gerar outros danos neurológicos. Os fármacos empregados no tratamento não são verdadeiramente antiepilépticos, pois são utilizados para suprir a crise através do controle dos sintomas, não tratando a causa em si. O tratamento se inicia como uma monoterapia, ou seja, com um só fármaco. A politerapia está associada a casos não responsivos e normalmente está relacionada a mais desvantagens, principalmente maior toxicidade (PERUCCA, 2007).

A maioria dessas substâncias apresenta capacidade para alterar a neurotransmissão inibitória ou excitatória, seja por efeito sobre receptores dos neurotransmissores e metabolismo dos mesmos ou na ação em canais iônicos. Três mecanismos principais são descritos: (1) modulação dos canais iônicos. (2) aumento da modulação inibitória (mediado por GABA) ou através de efeitos em outros sistemas transmissores (3) atenuação da transmissão excitatória mediada pelo bloqueio de receptores glutamato (KWAN et al., 2011)

O tratamento com fármacos anticonvulsivantes é limitado e incapaz de controlar as crises em todos os pacientes. Atualmente, 30-40% destes indivíduos não respondem satisfatoriamente à terapia farmacológica habitual (SUN et al., 2010). Além disso, os DAEs estão associados com diversos efeitos colaterais como sonolência, hepatotoxicidade, perturbação gastrointestinal, entre outros (DEDEURWAERDERE et al., 2012).

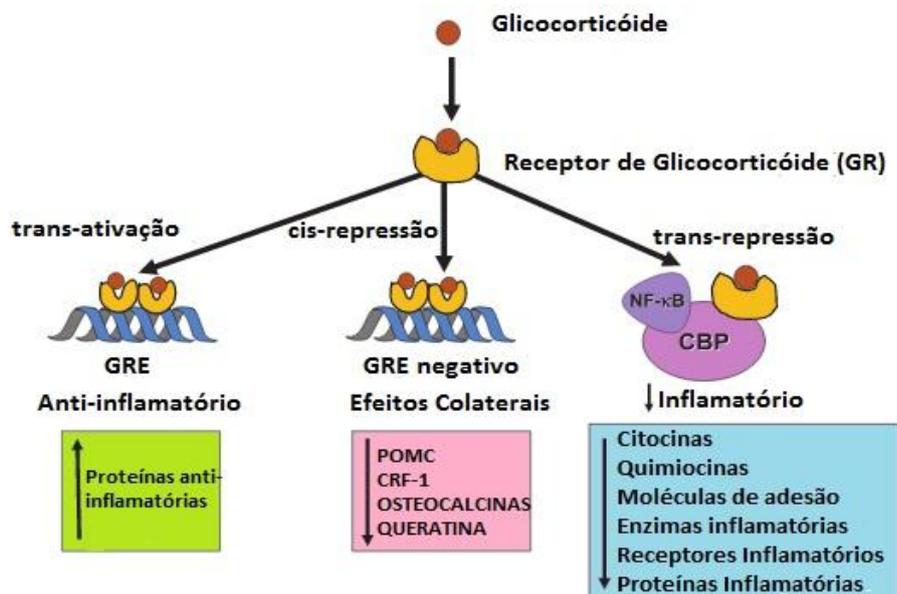
A utilização de medicamentos anticonvulsivantes geralmente oferece o alívio apenas sintomático das epilepsias, promovendo a redução da frequência das crises convulsivas recorrentes. Além disso, o elevado número de pacientes não responsivos à medicação restringe as alternativas terapêuticas para tratamento. A intervenção cirúrgica de remoção do foco epiléptico, tratamento empregado nesses casos, é limitada devido à localização das áreas de epileptogênese e do risco de perda de funções cerebrais. Tudo isso, aliado às restrições metodológicas presentes no tratamento das epilepsias, revelam a necessidade da busca por novas alternativas terapêuticas (LEAL, 2011).

Considerando os diversos estudos que vem sendo realizados sobre o papel da inflamação no desenvolvimento de crises epiléticas, o uso de fármacos que bloqueiem vias inflamatórias podem vir a ser um potencial alvo terapêutico (PERUCCA, 2007). A utilização de medicamentos anti-inflamatórios já disponíveis no mercado é ainda mais interessante pois já são amplamente utilizados e se conhecem os efeitos colaterais dos mesmos.

1.6 GLICOCORTICÓIDES

Os glicocorticóides são hormônios sintetizados e secretados pelo córtex adrenal em resposta à ativação do ACTH (hormônio adrenocorticotrófico). Essa classe de hormônios exerce inúmeras ações fisiológicas no organismo quando disponíveis em concentrações normais, atuando normalmente sobre o metabolismo dos carboidratos, proteínas e gorduras. Eles estão entre os fármacos mais utilizados no mundo e são considerados a terapia anti-inflamatória mais efetiva para doenças crônicas (SANTOS et al., 2007). Entre as principais aplicações de glicocorticóides está o tratamento de doenças autoimunes, asma, doenças alérgicas, rejeição de transplantes, entre outros (WANNACHER et al, 1998).

O fármaco sofre difusão através das membranas celulares se ligando a receptores citoplasmáticos específicos. Esses receptores homodimerizam e se ligam a elementos de resposta a glicocorticóides (GRE) na região promotora de genes responsivos a glicocorticóide e essa interação modula a expressão gênica. Seus efeitos sobre as células inflamatórias incluem: indução de apoptose, inibição de citocinas e inibição da migração. Os mecanismos mais descritos para ação desses fármacos são (1) O glicocorticóide se liga a seus receptores de membrana e o complexo formado sofre endocitose e direciona para o núcleo onde se ligará a sequências de DNA chamadas de elementos de resposta a glicocorticóides. Desse modo, ocorrerá o recrutamento de proteínas que modificam a cromatina, alterando a expressão gênica; (2) interação do complexo fármaco-receptor com o fator de transcrição NFκB (Figura 3); (3) via de sinalização não genômica através da interação de proteínas associadas a receptores de membrana e segundos mensageiros.



(Adaptada de BARNES, 2010)

Figura 3: Mecanismos de ação dos glicocorticóides. A regulação da expressão gênica pelos glicocorticóides acontece de diferentes formas. Glicocorticóides entram na célula e se ligam a seus receptores (GR) e são direcionados para o núcleo. Os receptores homodímeros se ligam a elementos de resposta a glicocorticóides (GRE) na região promotora de genes sensíveis a esteróides podendo levar a expressão de proteínas anti-inflamatórias. Em uma via menos comum, o complexo GR pode se ligar a elementos de resposta negativos, levando a supressão de alguns genes que podem ser

importantes na mediação de efeito colaterais do fármaco. O complexo receptor também interage com outras moléculas como a proteína de ligação CREB (CBP), a qual é ativada por fatores de transcrição pró-inflamatórios como NF- κ B, inativando, assim, genes que eram ativados por essas moléculas, como mediadores inflamatórios.

Os glicocorticóides têm sido utilizados para tratar convulsões por muito tempo, tendo resultados satisfatórios em estudos de tratamento de espasmos infantis e na prevenção da atividade epiléptica (JUNIOR, 2007).

A dexametasona é um glicocorticóide esteroide sintético usado principalmente por seus potentes efeitos anti-inflamatórios. Um estudo demonstrou o efeito inibitório da dexametasona sobre atividade epiléptica, entretanto, o mecanismo pelo qual isso ocorre ainda é desconhecido (MARCHI et al., 2011). Para que os glicocorticóides possam se tornar uma escolha segura para tratamento de pacientes não responsivos ao tratamento da epilepsia, mais conhecimento sobre a ação dos mesmos no controle das crises convulsivas se faz necessário.

2. JUSTIFICATIVA

A epilepsia é uma desordem neurológica caracterizada por crises convulsivas espontâneas e recorrentes que afeta aproximadamente 1 a 2% da população mundial. Ela é descrita como o mais freqüente transtorno neurológico grave, além de ser uma das doenças não-transmissíveis mais frequentes. Durante a vida, 10% das pessoas vão ter pelo menos uma crise convulsiva, e, um terço delas, vai desenvolver epilepsia. Mundialmente, 2,4 milhões de pessoas são diagnosticadas por ano. Quase 95% dos fármacos disponíveis para tratamento foram aprovados antes de 1985 e fornecem controle das crises em 60-70% dos pacientes, sendo que a maioria deles está associada com efeitos adversos como sonolência, hepatotoxicidade, perturbação gastrointestinal, entre outros. Até o momento não há cura e os tratamentos com anticonvulsivantes não são totalmente eficazes para os diferentes casos de epilepsia. Por isso, visando a melhoria da qualidade de vida dos pacientes e controle das crises epiléticas, estudos sobre a possível aplicação de medicamentos já amplamente utilizados, mas com novo enfoque terapêutico, possuem um campo muito promissor para pesquisa. Acredita-se que o surgimento e aplicação de novas técnicas terapêuticas que exerçam atividade modulatória sobre citocinas pró-inflamatórias, poderão ser utilizadas para o tratamento da epilepsia.

3. OBJETIVOS

Avaliar o efeito da administração de dexametasona na concentração de citocinas inflamatórias, em ratos submetidos ao modelo do *kindling* induzido por pentilenotetrazol (PTZ).

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da dexametasona sobre os níveis da interleucina 1-beta (IL-1 β) em soro, hipocampo e córtex de animais submetidos ao kindling por PTZ.

.

- Avaliar o efeito da dexametasona sobre os níveis do fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) em soro, hipocampo e córtex de animais submetidos ao kindling por PTZ.

.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS E TRATAMENTOS

Ratos Wistar machos, com 3 meses de idade, pesando aproximadamente 300 g provenientes do biotério central da UFRGS, foram utilizados no estudo. Os animais tiveram livre acesso à água e comida e foram mantidos em caixas de polipropileno medindo 41x34x16 cm, com, no máximo, 5 animais por caixa, em um ambiente com ciclos de claro-escuro de 12h a uma temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$. Os animais foram mantidos no biotério setorial do departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da UFRGS.

Foram adotados procedimentos para o cuidado e uso dos animais de acordo com as regulamentações publicadas pela Sociedade Brasileira para Neurociência e Comportamento (SBNec). O estudo foi aprovado pela Comissão de ética no uso de animais da UFRGS sob o número 23554.

Utilizaram-se 50 animais ao todo e os mesmos foram divididos aleatoriamente em 5 grupos de estudo: dois grupos controles (salina e diazepam) e 3 grupos de tratamento (dexametasona). Diazepam é um fármaco já utilizado para controle de crises convulsivas. Os animais dos grupos tratados ($n=10$ em cada grupo) receberam diferentes doses de dexametasona (1, 2 e 4 mg/Kg), via intraperitoneal, diariamente, durante 15 dias. Os grupos controles receberam diazepam (2 mg/Kg) e solução de cloreto de sódio (0,9 %) (Tabela 2).

Tabela 2: Delineamento experimental

CONTROLES		TRATAMENTOS		
Salina	Diazepam	Dexametasona 1	Dexametasona 2	Dexametasona 4
0,9%	2 mg/Kg	1 mg/Kg	2 mg/Kg	4 mg/Kg

4.2. PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS

A fim de avaliar se o uso da dexametasona poderia interferir na atividade locomotora e exploratória, ou seja, se possui algum efeito excitatório ou inibitório no

sistema nervosa central, realizou-se o teste de campo aberto (*Open Field*). No 1º dia, após a administração das diferentes doses dos fármacos, foram avaliados os parâmetros comportamentais dos animais. No teste de *Open Field*, os ratos são colocados em uma caixa de acrílico, onde o chão é dividido em 12 quadrantes iguais por linhas pretas. Inicialmente eles são posicionados no quadrante esquerdo, explorando livremente a caixa por 5 minutos. O número de cruzamentos (*crossings*), performance de orientação (*rearing*), que é o número total de vezes que o animal levanta as patas dianteiras e movimenta a cabeça numa postura típica de orientação em um ambiente novo, latência para iniciar a locomoção (diretamente proporcional ao grau de ansiedade do animal), número de auto-limpezas (*grooming*) e número de bolos fecais durante a exploração são registrados (IZQUIERDO, 1989).

4.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICONVULSIVANTE

Utilizou-se nesse estudo o modelo de abrasamento (*kindling*), considerado um modelo crônico de epilepsia que consiste em repetidas estimulações elétricas ou químicas de estruturas cerebrais (Goddard, 1967). Este método resulta em um gradual desenvolvimeto de estado epiléptico levando ao desenvolvimento de crises generalizadas. O *kindling* é um modelo bem adequado de epilepsia clínica devido às suas manifestações clínicas serem muito parecidas com as crises em humanos.

Repetidas administrações de PTZ podem ser utilizadas. O PTZ é um bloqueador seletivo dos canais de cloreto acoplados ao complexo receptor de GABA, ou seja, ele atua diminuindo a função gabaérgica. O modelo químico de *kindling* com PTZ é confiável e não requer a implantação de eletrodos nos animais. Além disso, é altamente reproduzível em diferentes espécies, a mortalidade é baixa e, com repetições suficientes em intervalos apropriados, a maioria dos animais alcança crises tônico-clônicas (GILBERT et al., 2006)

Os animais receberam as mesmas doses descritas dos tratamentos durante 15 dias e, em dias alternados, receberam também doses subconvulsivantes de pentilenotetrazol (PTZ) intraperitonealmente dissolvido em salina (20 mg/Kg/mL). O PTZ foi injetado 30 minutos após a administração dos tratamentos. Os animais ficaram em observação por 30 minutos por um observador treinado, e a severidade

das convulsões foi graduada de acordo com a escala adaptada por Racine (Tabela 3) (RACINE, 1972).

Tabela 3: Escala de Racine

0	Sem Resposta
1	Clonus Facial
2	Mioclonias de cabeça e pescoço
3	Clonias de membros superiores
4	Clonias de membros inferiores
5	Elevação e queda

(RACINE, 1972)

4.4 OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Após 15 dias de tratamento, os animais foram sacrificados por decapitação, mediante o uso da guilhotina. Escolheu-se esse método, pois a injeção de qualquer substância anestésica poderia influenciar nas análises das dosagens realizadas. Coletaram-se amostras de soro, córtex e hipocampo e as mesmas foram armazenadas a -80 °C.

Previamente à análise de ELISA, as amostras de córtex e hipocampo foram homogeneizadas em salina 0,9% na proporção de 1:10 e, posteriormente, foram centrifugadas a 3500 rpm por 10 minutos. Separou-se o sobrenadante que foi utilizado nas análises. O soro foi centrifugado a 3500 rpm por 10 minutos e separado, também, o sobrenadante.

4.5. DETERMINAÇÃO DAS CITOCINAS

Os níveis de TNF- α e a IL-1 β foram dosados nas amostras coletadas pelo método de ELISA seguindo as especificações do fabricante. Para dosagem de TNF α foi utilizado o kit Rat TNF alpha PicoKine™ ELISA Kit da Boster®, e para IL-1 β o kit IL-1 beta(Interleukin-1 beta) Rat da Abcam®. Utilizou-se um leitor de ELISA (SPECTRAMAX 190) a 450 nm para realização das leituras. A concentração foi

calculada através de curva-padrão obtida com diferentes concentrações da citocina recombinante.

Os kits baseiam-se no método de ELISA sanduíche, ou captura, em que um anticorpo específico para citocina é aderido aos poços da placa. Quando a amostra é adicionada, o antígeno da citocina se liga a esse anticorpo adsorvido. Posteriormente, um segundo anticorpo específico ligado a uma enzima é adicionado e se liga ao antígeno já imobilizado. Quando o substrato dessa enzima é acrescentado, é convertido a um produto colorido, sendo a intensidade da coloração proporcional à quantidade de antígeno na amostra (ABBAS et al., 2008).

4.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram apresentados como média e erro padrão. Após a definição dos subgrupos, realizou-se a análise estatística utilizando a Análise de Variância (ANOVA) seguida de teste *pos hoc* de Dunnet (Avaliação da atividade anticonvulsivante e dosagem de TNF α) ou Tukey (dosagem de IL1- β). Foram considerados estatisticamente significativos os resultados com $p < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se um banco de dados montado no pacote estatístico SPSS versão 13.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 TESTE DO CAMPO ABERTO (*OPEN FIELD*)

Estudos que avaliam o comportamento exploratório dos animais são de grande relevância, pois permitem avaliar locomoção e emocionalidade. Segundo alguns autores, o comportamento do animal é determinado pelo conflito existente entre a aversão a lugares abertos, iluminados e desprotegidos e a motivação de explorar (ASANO, 1986 ; CRUSIO et al., 1989). Elevada defecação e baixa atividade locomotora, assim como um alto número de auto-limpezas, indicam ansiedade. Além disso, a locomoção do animal na periferia pode ser utilizada como indicador da atividade locomotora e no centro como medida mais seletiva de ansiedade (KALUEFF, 2002).

No presente trabalho, os animais foram observados no aparato por 5 minutos após o primeiro dia de tratamento. Registraram-se os números de cruzamentos, *rearings*, *groomings* e bolos fecais.

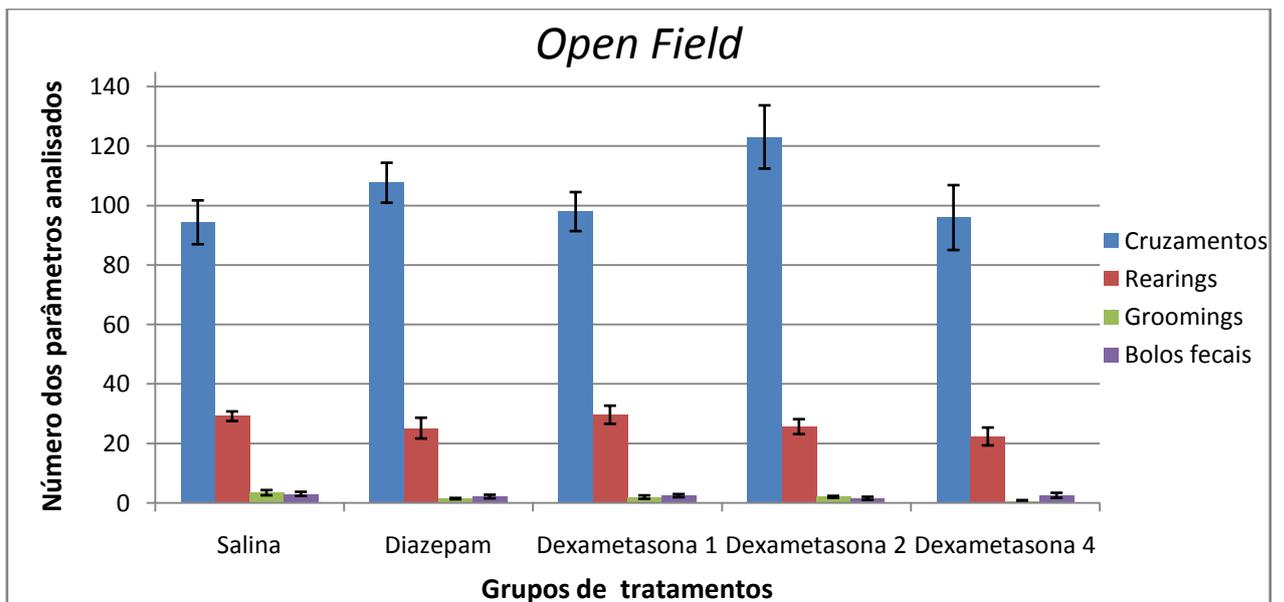


Figura 4: Efeito da dexametasona em diferentes parâmetros analisados na tarefa do campo aberto (*Open Field*). Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média e considerados significativamente diferentes com $P < 0,05$ (ANOVA One Way).

Na análise do campo aberto, não se observou diferença significativa entre os grupos tratados (Figura 4). Isso demonstrou que a utilização da dexametasona não possui efeito excitatório ou inibitório no SNC, não causando, assim, interferência na atividade locomotora e exploratória dos animais ($P > 0,05$, ANOVA One Way).

5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICONVULSIVANTE

A escala de Racine, desenvolvida em 1972, é uma das ferramentas mais utilizadas para categorizar a intensidade de crises convulsivas em modelos animais de epilepsia. Essa escala é graduada de 1 a 5 e quanto maior o grau alcançado, maior a severidade da convulsão (LÜTTJOHANN et al., 2009). A crise convulsiva ocorre devido a um desequilíbrio da atividade sináptica com um aumento de sinapses excitatórias. Esse desequilíbrio leva o corpo a executar contrações musculares involuntárias. Cada estágio da escala de Racine é resultado dessas contrações involuntárias, sendo elas maiores a cada nível (RIAZI, 2009).

O primeiro nível é caracterizado com movimentos involuntários da boca e da face, sendo um pouco difícil de ser determinado. No segundo, contrações involuntárias no pescoço causam movimentos bruscos na cabeça. O terceiro e o quarto nível são caracterizados por mioclonias nos membros superiores e inferiores, respectivamente. Já no quinto e último nível observa-se elevação e queda do animal, tendo um maior risco à lesões e ao óbito (RACINE, 1972).

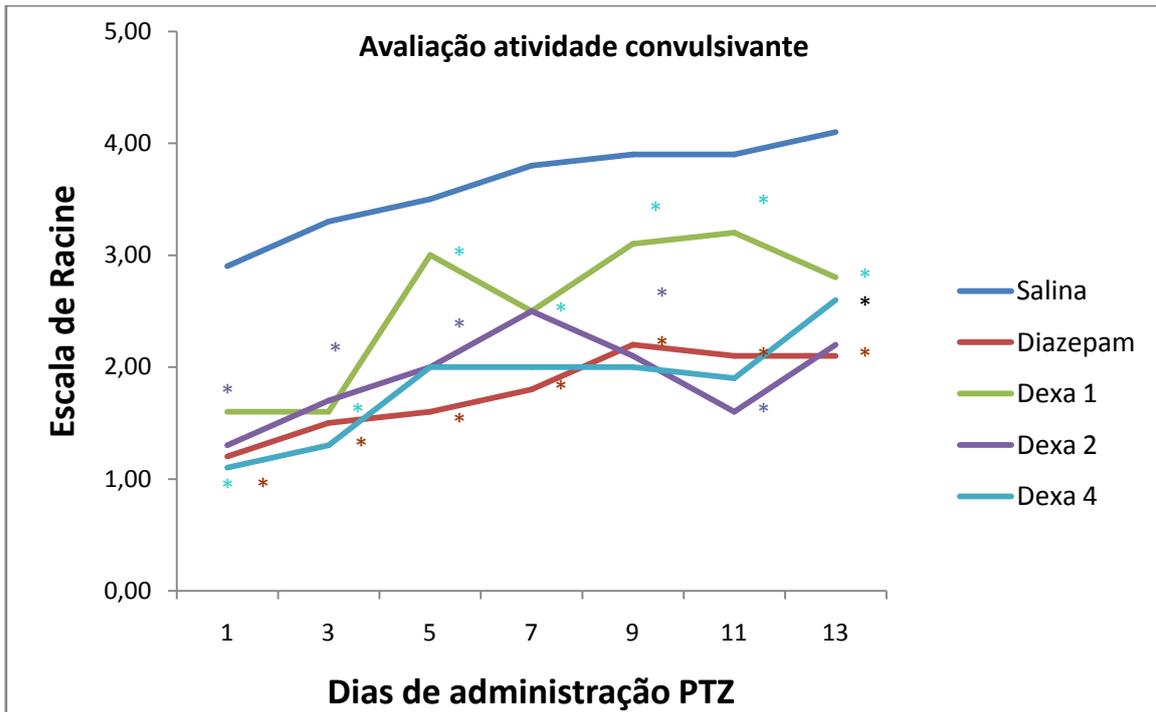


Figura 5: Avaliação do efeito da dexametasona sobre a atividade convulsivante resultante do *kindling* por pentilenotretazol (PTZ). Níveis da escala de Racine observados durante o experimento de *kindling* por pentilenotretazol (PTZ). Os resultados foram expressos em média. Observou-se diferença significativa entre o grupo salina e os demais grupos ($P < 0,05$; ANOVA One Way e *post hoc* de Dunnet).

O modelo de *kindling* leva ao progressivo desenvolvimento de crises convulsivas em resposta a um estímulo subconvulsivante administrado repetidamente. As principais características desse modelo são o aumento das crises, a redução do limiar para ocorrência das mesmas e um aumento gradual da sensibilidade ao estímulo convulsivo utilizado (GODDARD et al., 1969). Esse desenvolvimento gradual foi claramente percebido no grupo controle salina, que apresentou um padrão de crescimento, ou seja, a intensificação das crises conforme o tempo de tratamento (Figura 5). Esse dado demonstrou que o estado de *kindling* foi atingido, validando o modelo utilizado.

Com os dados obtidos, pôde-se perceber também uma diminuição significativa da atividade convulsivante nos animais tratados com diazepam, corroborando com resultados de outros estudos em que doses de diazepam (0,25 e 1,0 mg/kg) apresentaram efeito anticonvulsivante em animais submetidos ao *kindling* por PTZ (LAZAROVA et al., 1990 ; KULKARNI et al., 1995). Além disso, os grupos

tratados com dexametasona também apresentaram redução significativa no padrão das crises convulsivas quando comparadas com o controle salina. Os animais do grupo Dexa 1 – com dose de 1 mg/Kg – demonstraram atenuação das crises, entretanto, não tão intensamente quanto a dos animais tratados com doses maiores de 2 e 4 mg/Kg (Dexa 2 e Dexa 4), que se aproximaram do padrão demonstrado pelo diazepam, um dos principais fármacos antiepiléticos utilizados (Ministério da Saúde, 2010). Entre as doses utilizadas, pode-se destacar a Dexa 4 (4 mg/Kg) que levou ao desenvolvimento de crises menos severas nos animais tratados.

No experimento realizado nenhum animal atingiu o nível 5 da escala de Racine e nem foi à óbito. Esses resultados são apoiados por estudos que demonstraram que os níveis 4 e 5 da escala foram alcançados apenas utilizando doses convulsivantes de PTZ (60 e 80 mg/Kg) e que mioclonias intermitentes são o máximo de resposta associadas a doses subconvulsivantes de PTZ depois de um tratamento prolongado (DEL-BEL et al., 1997 ; PINEL et al., 1977 ; NUTT et al., 1982). Além disso, mortalidade associada ao *kindling* por PTZ não é comumente reportada (GILBERT et al., 2006).

5.3 DETERMINAÇÃO DAS CITOCINAS INFLAMATÓRIAS

Diversos estudos demonstraram a relação entre inflamação e crises epiléticas. Evidências experimentais em modelos animais demonstraram que crises convulsivas induzem altos níveis de mediadores inflamatórios em regiões do cérebro envolvidas na geração e propagação da atividade epilética. Essa resposta consiste, principalmente, no aumento de citocinas inflamatórias como interleucina-1 β , Interleucina-6 e TNF α (DE SIMONI et al, 2000; RAVIZZA et al., 2006; VEZZANI et al., 2008). No presente trabalho avaliamos os níveis de TNF α e IL-1 β , duas citocinas pró-inflamatórias, em amostras de soro, hipocampo e córtex de animais tratados com dexametasona, um anti-inflamatório esteroideal.

5.3.1 TNF α

Estudos demonstraram que a expressão de TNF α aumenta rapidamente após a indução de crises convulsivas, e os níveis aumentados da mesma também

são notados em outras doenças do SNC como meningite, esclerose múltipla e doença de Alzheimer (DE SIMONI et al., 2000 ; RAINE, 2005 ; LU et al, 2008 ; Zhao et al., 2003).

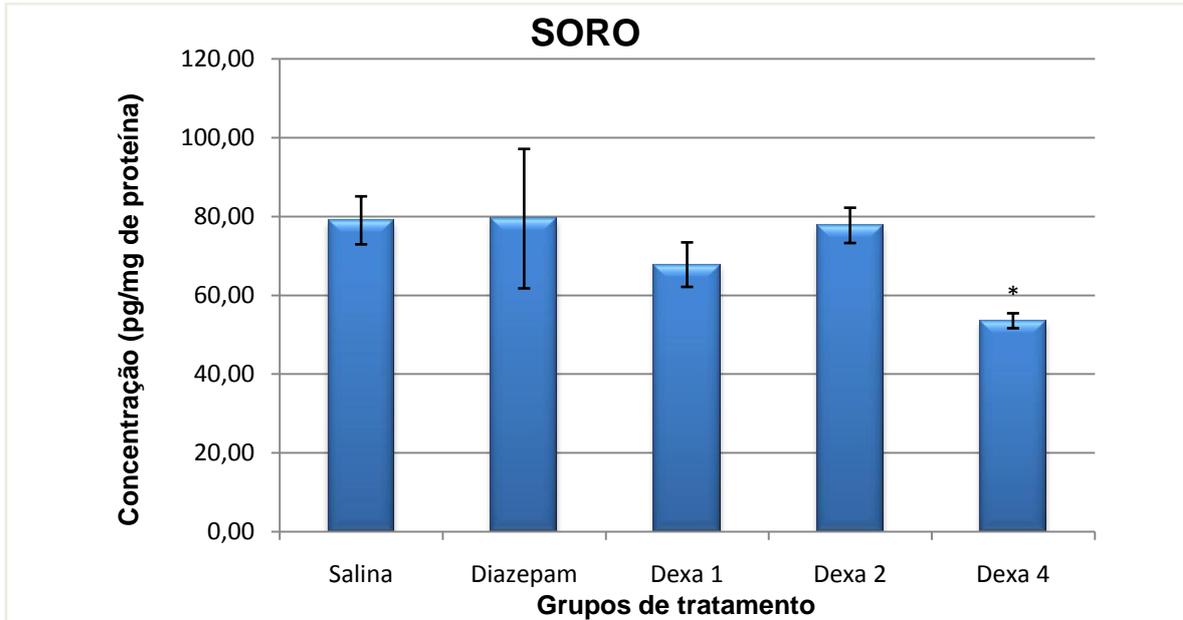


Figura 6: Níveis da citocina TNF α em soro de animais tratados com dexametasona e submetidos ao kindling por PTZ. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão. Houve diferença significativa entre os grupos Dexa 4 e Salina ($*p < 0,05$; ANOVA One Way e *post hoc* de Dunnet).

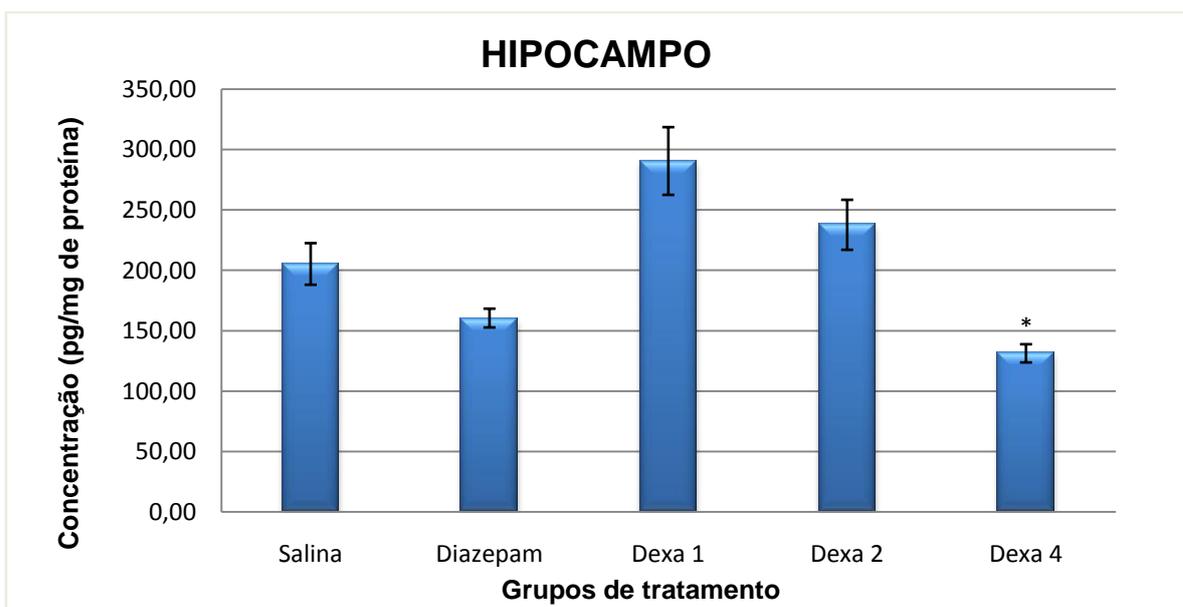


Figura 7: Níveis da citocina TNF α no hipocampo de animais tratados com dexametasona e submetidos ao kindling por PTZ. Os resultados foram expressos em média mais ou menos erro

padrão da média. Houve diferença significativa entre os grupos Dexta 4 e Salina (* $p < 0,05$; ANOVA One Way e *post hoc* de Dunnet).

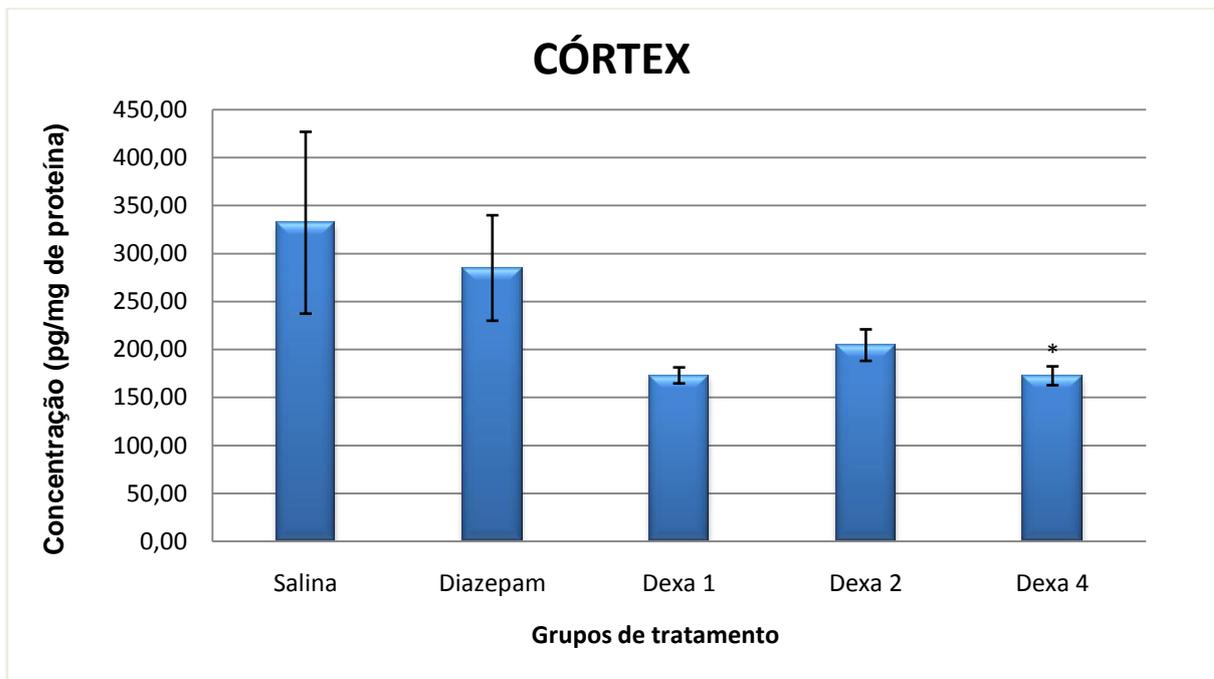


Figura 8: Níveis da citocina TNF α no córtex de animais tratados com dexametasona e submetidos ao kindling por PTZ. Os resultados foram expressos em média mais ou menos erro padrão da média. Houve diferença significativa entre os grupos Dexta 4 e Salina (* $p < 0,05$; ANOVA One Way e *post hoc* de Dunnet).

No experimento realizado observou-se uma diminuição significativa nos níveis de TNF α no soro de animais tratados com a maior dose de dexametasona (Dexta 4) quando comparado ao grupo controle salina (Figura 6). O mesmo resultado foi observado nas amostras de hipocampo (Figura 7) e córtex (Figura 8).

Estes resultados corroboram com diversos outros estudos que mostram o efeito desse anti-inflamatório na diminuição dos níveis de citocinas pró-inflamatórias. Uma pesquisa mostrou que o mRNA de algumas citocinas, incluindo TNF α , foram suprimidos após tratamento com dexametasona em células do tecido epitelial humano (MISUNO et al., 2014). Em pacientes com meningite bacteriana, a dexametasona inibiu a produção de TNF α e IL-1 β no líquido cefalorraquidiano, revertendo o desenvolvimento de edema cerebral e limitando o aumento da concentração de leucócitos (LUTSAR, 2003).

5.3.2 IL-1 β

A citocina IL-1 β foi detectada no córtex, mas a mesma não apresentou diferença em seus níveis após o tratamento com dexametasona entre os diferentes grupos (Figura 9). O córtex é a região que mais origina descargas elétricas em seres humanos e, em modelos animais, apresenta maior susceptibilidade às crises (SILVA et al., 2004). A IL-1 β é expressa em níveis muito baixos no SNC, portanto a alta expressão da mesma encontrada no trabalho demonstra o possível estado de inflamação causado pelo *kindling*. O aumento da expressão desta citocina no cortex após episódios de convulsões já foi observado em outros trabalhos (VEZZANI et al., 1999 ; ERIKSSON et al., 2000 ; CHAPMAN et al., 2006).

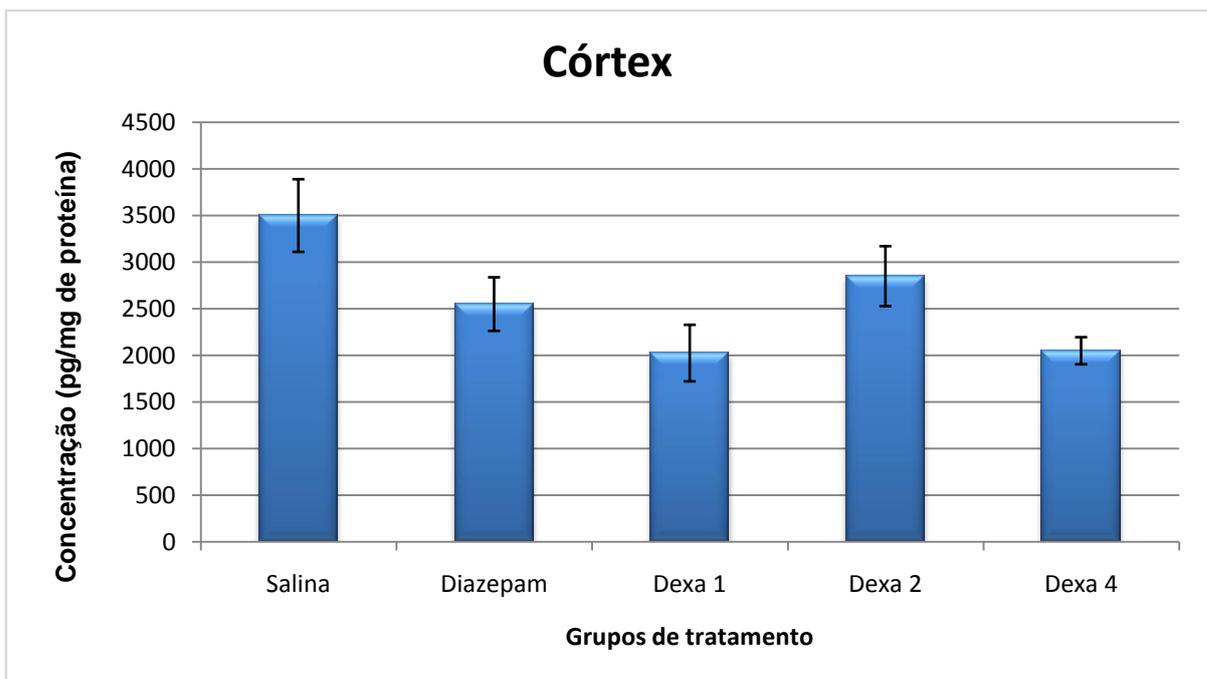


Figura 9: Níveis da citocina IL-1 β no córtex de animais tratados com dexametasona e submetidos ao kindling por PTZ. Os resultados foram expressos em média mais ou menos erro padrão da média. Não houve diferença significativa entre os grupos (* $p < 0,05$; ANOVA One Way).

Nas amostras de hipocampo houve diferença significativa entre o grupo salina e os outros, com exceção do grupo Dexa 2 (Figura 10). O hipocampo é a segunda maior área do cérebro rica em IL-1R1 (receptor de IL-1 β). Além disso, é a região mais afetada na Epilepsia do Lobo Temporal (ELT) – a epilepsia mais frequente em

adultos e com uma alta refratariedade farmacológica (30 a 40%) -, o que demonstra possível relação entre IL-1 β e o desenvolvimento de crises convulsivas (VEZZANI et al., 2011 ; ENGEL et al., 1989; LEAL, 2011). O aumento de IL-1 β observado em todos os grupos submetidos ao kindling por PTZ corrobora com resultados anteriores em que foi verificado um aumento significativo nos níveis dessa citocina no hipocampo de animais com convulsões febris (HEIDA et al., 2005). A concentração desta citocina encontrada nas amostras de córtex e hipocampo para o grupo sem tratamento (salina) foi parecida em todos os grupos, indicando que a concentração de IL-1 β em diferentes áreas do cérebro após as crises é semelhante.

O grupo tratado com diazepam apresentou diminuição significativa nos níveis da citocina quando comparado ao salina. O diazepam é um princípio ativo do grupo farmacológico das benzodiazepinas, sendo o mais representativo deles. É um fármaco largamente utilizado como ansiolítico, relaxante muscular e anticonvulsivante. O mecanismo de ação desse fármaco envolve interação com receptores GABA que consistem em cinco subunidades organizadas em torno de um canal iônico de cloreto, sendo que em uma dessas subunidades existem os locais de ligação das benzodiazepinas. A ativação do receptor pelo GABA abre o canal de cloro, permitindo a entrada dos íons cloreto para dentro da célula, resultando na hiperpolarização (inibição) do neurônio, e a ocupação do espaço de ligação das benzodiazepinas pelo diazepam, acompanhando o GABA, potencializa a sua ação inibitória (SILVA, 2013 ; COELHO et al., 2006). Alguns estudos utilizando outros fármacos benzodiazepínicos, como lorazepam e clonazepam, mostraram inibição da expressão do mRNA de IL-1 β e TNF α em células do baço e em amostras de hipocampo/hipotálamo em modelo animal de estresse (RAMIREZ et al., 2015). Isso demonstra que o grupo dos fármacos benzodiazepínicos pode exercer alguma influência nos níveis de citocinas inflamatórias em regiões do cérebro.

A dexametasona ocasionou diminuição significativa nos níveis de IL-1 β nas amostras de hipocampo com as doses de 1 e 4 mg/Kg (Dexa 1 e Dexa 4). A eficácia desse anti-inflamatório foi maior para IL-1 β (Figura 10) do que para TNF α (Figura 7) nas amostras de hipocampo, pois apresentou redução da concentração das mesmas com uma dose menor. Não há estudos que suportem o fato da dose intermediária (Dexa 2) não ter ocasionado também diminuição na citocina, mas acredita-se que,

talvez com um maior número de amostras no grupo, essa diferença pudesse ser demonstrada.

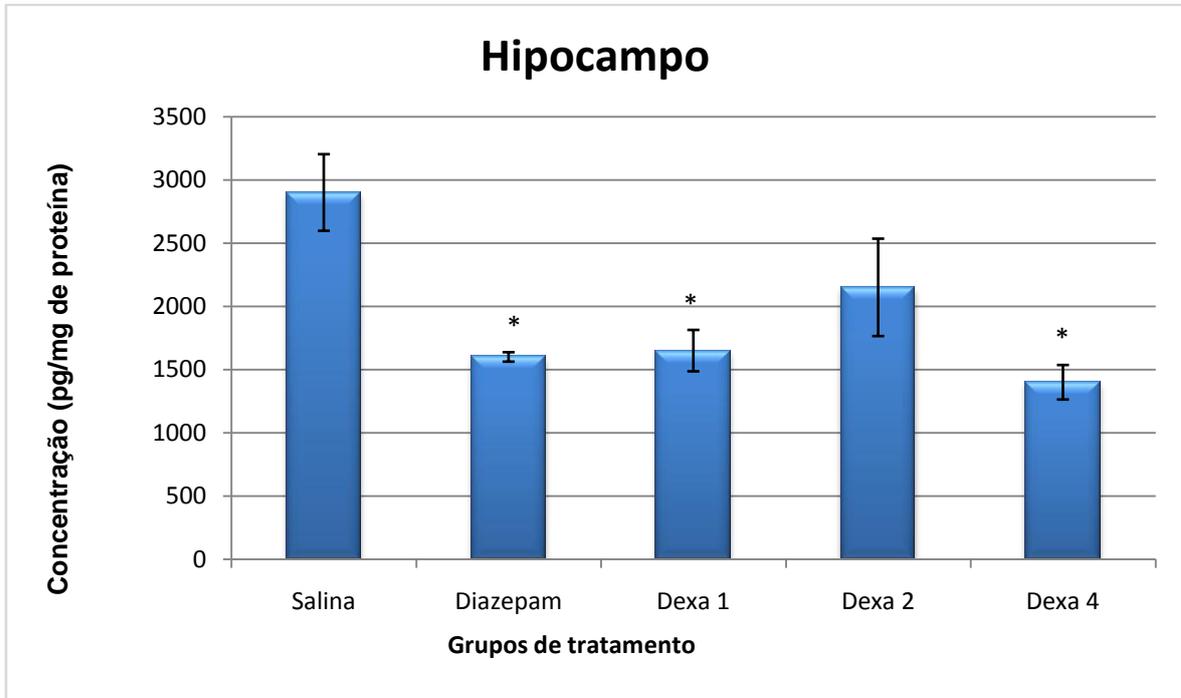


Figura 10: Níveis da citocina IL-1 β no hipocampo de animais tratados com dexametasona e submetidos ao kindling por PTZ. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média. Houve diferença significativa entre o grupo Salina e os demais, com exceção de Dexa 2 (* $p < 0,05$; ANOVA One Way e *post hoc* Tukey).

Nesse estudo não foi detectada IL-1 β nas amostras de soro dos animais. O fato dos níveis de IL-1 β não terem aumentado no sangue e terem aumentado nas regiões do cérebro durante as crises convulsivas, indica que o aumento da mesma no cérebro não necessariamente leva ao aumento a um nível periférico. Um estudo envolvendo modelo animal de dano cerebral apresentou resultados que reforçam essa proposta, em que foi observado um aumento na expressão de IL-1 β no cérebro após o ferimento, mas não no sangue (KAMM et al, 2006).

Alguns autores observaram aumento de IL-1 β no sangue após a indução de crises convulsivas em animais por pilocarpina, bem como em pacientes com epilepsia focal e em crianças com crises convulsivas febris (MARCHI et al., 2009; LEHTIMAKI et al., 2007; CHOI et al., 2011). Entretanto, outros estudos apresentaram resultados contrários, não encontrando aumento dessa citocina no

sangue (ALLAPIRTTI et al., 2009 ;BAUER er al., 2009 ; TOMOUM et al., 2007). Essas diferenças demonstram que não há consistência nos resultados encontrados quando se trata dos níveis de IL-1 β a nível periférico, salientando que o aumento das citocinas no sangue pode depender do tipo de crise convulsiva ou do tipo de síndrome epiléptica. Além disso, o fato dos níveis estarem alterados no córtex e hipocampo indica que essa citocina foi sintetizada dentro do cérebro, ou seja, não houve infiltração das citocinas que circulam no sangue (HOLTMANN et al., 2013 ; HEIDA et al., 2005).

Estudos utilizando outros corticosteróides para tratamento de convulsões já existem. O uso do glicocorticóide metilprednisona foi capaz de reprimir a expressão de IL-2, IFN- γ , IL-5, IL-6, IL-10, IL-17, IL-1 β a TNF α em células mononucleares de sangue periférico humano (BACK at al., 2015). Em crianças que possuem a Síndrome de Rasmussen, a utilização de prednisona mostrou possuir efeitos benéficos nas crises convulsivas e funções neurológicas. A Síndrome de Rasmussen é uma encefalopatia inflamatória rara que acomete principalmente crianças e caracteriza-se por atrofia unilateral hemisférica, convulsões focais e déficit neurológico progressivo (OWOLABI, 2009). Em uma pesquisa, oito pacientes que apresentavam essa síndrome e possuíam convulsões como sintomas, foram tratados com doses altas de esteróides (metilprednisona e prednisona em doses decrescentes). Sete desses oito pacientes apresentaram redução das crises convulsivas em 6 meses de tratamento (CHINCILLA et al., 1994). Outro estudo realizado com 17 pacientes demonstrou uma redução de 50% na frequência nos episódios de crises convulsivas em oito analisados, enquanto que dois outros pacientes apresentaram uma redução de 25% (HART et al., 1994).

Nos últimos anos têm sido descritos os efeitos pró-convulsivantes de IL-1 β no cérebro. Evidências demonstraram que os receptores dessa citocina no hipocampo estão colocalizados com receptor NMDA de glutamato, que está relacionado com o aparecimento e propagação das crises convulsivas. A ativação dos IL-1R1 através da ligação com a citocina, induz a fosforilação de uma subunidade do receptor de glutamato mediada pela quinase Scr. Como consequência, o influxo de Ca²⁺ para dentro dos neurônios é aumentado, levando à despolarização e aumento da excitabilidade (VIVIANI et al., 2003). Além disso, IL-1 β pode promover a inibição da recaptação de glutamato dos astrócitos e aumento da liberação pelas células da glia

(mediado também por TNF α), resultando em um aumento dos níveis de glutamato extracelular (HU et al., 2000 ; FELLIN et al., 2006).

Os efeitos de TNF α também têm sido descritos. Em estudos animais foi demonstrado que TNF α exerce um papel ambíguo no mecanismo das crises convulsivas, dependendo da ativação de diferentes receptores no SNC, p55 e p75. Através da ligação com p55, foi demonstrado que essa citocina pode aumentar a sinapse excitatória devido à interação com receptores AMPA de glutamato, mostrando que p55 está envolvido nos efeitos pró-convulsivantes de TNF α . Entretanto, os mecanismos responsáveis pelo domínio da via de p55 sobre p75, ou vice-versa, ainda não foram muito bem elucidados (LI et al., 2010). Apenas um estudo demonstrou que baixas concentrações da citocina podem ativar a via p55 e concentrações maiores são necessárias para ativar efeitos anticonvulsivantes via p75 (YUHAS et al., 2003).

Devido a isso, acredita-se que um controle nos níveis dessas citocinas no cérebro possa, de alguma forma, diminuir a propagação das crises convulsivas.

No nosso trabalho conseguimos verificar diminuição na concentração de IL-1 β e TNF α nas amostras através do tratamento com dexametasona e, como consequência, observamos diminuição na intensidade das crises dos animais tratados. Com isso, não podemos afirmar que somente a diminuição dessas citocinas foi responsável pela redução das convulsões, afinal, o fármaco também exerce influência sobre outros mediadores, mas podemos perceber a relação existente entre inflamação e o desenvolvimento de crises convulsivas.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Durante a vida, 10% das pessoas vão apresentar pelo menos uma crise convulsiva e, um terço delas, vai chegar a desenvolver epilepsia. Até o momento não há cura e os tratamentos com anticonvulsivantes não são totalmente eficazes, sendo, nesses casos, a remoção cirúrgica do foco epilético, muitas vezes a única opção terapêutica para os pacientes que não respondem à terapia farmacológica habitual. No presente trabalho, a dexametasona foi responsável pela diminuição significativa na intensidade das crises convulsivas induzidas por pentilenotetrazol (PTZ). Nos resultados também foi verificada a diminuição dos níveis de TNF α com a dose maior de dexametasona nas amostras de soro, córtex e hipocampo. A diminuição de IL-1 β com o tratamento também foi observada nas amostras de hipocampo, principal área afetada no tipo de epilepsia que possui maior refratariedade ao tratamento anticonvulsivante (Epilepsia do Lobo Temporal). Estes resultados nos permitem observar a estreita relação entre epilepsia e inflamação e nos fazem observar que novas técnicas terapêuticas que exerçam atividade modulatória sobre citocinas pró-inflamatórias são alternativas para estudo sobre controle das crises convulsivas. Caso os efeitos modulatórios de dexametasona sobre as citocinas e o controle das convulsões seja confirmado, esse fármaco poderá apresentar vantagem sobre estudos com novos fármacos. Isso porque já é um anti-inflamatório utilizado para tratamento de diversas outras doenças, ou seja, possui liberação comercial e se conhecem os efeitos adversos. Desta forma, seria apenas utilizado com um novo enfoque terapêutico.

Os resultados encontrados nesse trabalho demonstram o grande potencial da dexametasona como auxiliar no tratamento da epilepsia refratária. Entretanto, novos estudos com esse fármaco são necessários para uma maior compreensão dos mecanismos envolvidos nesse processo e para comprovação desse uso terapêutico. Como perspectivas do trabalho, outras citocinas inflamatórias serão dosadas, ensaios de estresse oxidativo serão realizados, além de histologia com amostras do baço com marcadores de células inflamatórias.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, ABUL K.; LICHTMANN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro, Elsevier, 2008.
- ABBOTT, N. J, ROMERO, I. A. **Transporting therapeutic across the blood-brain barrier**. *Mol Med Today*.2(3);106-113.1996
- Academia Brasileira de Neurologia. **Epilepsia**, 2015.
- AIRD, R. B., WOODBURY, D. M. **Neurotropic drugs and epilepsy**. *Int J Neurol* (1975) 10:233-240
- ALAPIRTTI, T., RINTA, S., HULKKONEN, J., MALINEN, R., KERANEN, T., PELTOLA, J. **Interleukin-6, interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1beta production in patients with focal epilepsy: a video-EEG study**. *J Neurol Sci* (2009) 280:94–97.
- ASANO, Y. **Characteristics of open field behavior of Wistar and Sprag Dawley rats**. *Jikken Dobutsu*. 1986 Oct;35(4):505-8.
- BACK, I. M., CROMBRUGGEN, K., HOLTAPPELS, G., BOSSCHER, K. **Differential Cytokine Profiles upon Comparing Selective versus Classic Glucocorticoid Receptor Modulation in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells and Inferior Turbinate Tissue**. *Plos One* (2015). [Ol:10.1371/journal.pone.0123068](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123068).
- BALOSSO, S., MAROSO, M., SANCHEZ, A. M., RAVIZZA, T., FRASCA, A., BARTFAI, T., VEZZANI, A. **A novel non-transcriptional pathway mediates the proconvulsive effects of interleukin-1beta**. *Brain*. 2008 Dec;131(Pt 12):3256-65
- BALOSSO, S., RAVIZZA, T., PEREGO, C., PESCHON J., CAMPBELL I. L., SIMONI, M. G., VEZZANI, A. **Tumor necrosis factor-alpha inhibits seizures in mice via p75 receptors**. *Ann Neurol* 2005;57:804–812
- BARNES, P. J. **Mechanisms and resistance in glucocorticoid control of inflammation**. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2010 May 31;120(2-3):76-85
- BAUER, S., CEPOK, S., TODOVORA-RUDOLPH, A., NOWAK, M., KOLLER, M., LORENZ, R., OERTEL, W.H., ROSENOW, F., HEMMER, B., HAMER, H.M. **Etiology and site of temporal lobe epilepsy influence postictal cytokine release**. *Epilepsy Res* (2009) 86:82–88.
- BERG, A.T., SCHEFFER, I. E. **New concepts in classification of the epilepsies: Entering the 21st century**. *Epilepsia*, 52(6):1058–1062, 2011.

BIEN, C. G. **Limbic encephalitis as a precipitating event in adult-onset temporal lobe epilepsy.** *Neurology* (2007) 69, 1236–1244.

BRODIE, M.J., ELDER, A.T., KWAN, P. **Epilepsy in later life.** *Lancet Neurol* 2009; 8: 1019–30.

CHAPMAN, S., KADAR, T., GILAT, E. **Seizure duration following sarin exposure affects neuro-inflammatory markers in the rat brain.** *Neurotoxicology* 2006;27:277–83.

CHAVES, M. L. F., FINKELSZTEIN, A., STEFANI, M. A. **Rotinas em neurobiologia e neurocirurgia.** Porto Alegre: Artmed, 2008. 826p.

CHINCHILLA, D., ROBAISN, O., PLOUIN, P., PONSOT, G., PINEL, J. F., GRABER, D. **Reappraisal of Rasmussen's syndrome with special emphasis on treatment with high doses of steroids.** *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* (1994);57:1325-1333

CHOI, J, KOH, S. **Role of brain inflammation in epileptogenesis.** *Yonsei Med J.* (2008)49:1-18.

CHOI, J., MIN, H.J., SHIN, J.S. **Increased levels of HMGB1 and proinflammatory cytokines in children with febrile seizures.** *J Neuroinflammation* (2011) 8:135.

COELHO, F. M. S., ELIAS, R. M., POYARES, D., TUFIK, S. **Benzodiazepínicos: uso clínico e perspectivas.** Grupo editorial Moreira Junior (2005) S0034-72642006001600002.

COSTA, R. D., MENDONÇA, V. A., LYON, S., NISHI, M. N. **Avaliação da expressão de interleucina 1 beta (IL-1 β) e antagonista do receptor de interleucina 1 (IL-1Ra) em pacientes com hanseníase.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 41(Suplemento II) (2008):99-103.

CRUSIO, W.E, SCHWEGLER, H., ABELEN, J.H. **Behavioral responses to novelty and structural variation of the hippocampus in mice. I. Quantitative-genetic analysis of behavior in the open-field.** *Behav Brain Res.* (1989) Feb 1;32(1):75-80.

DE SIMONI, M. G., PEREGO, C., RAVIZZA, T., MONETA, D., CONTI, M., MARCHESI, F., LUIGI, A. GARATTINI, S., VEZZANI, A. **Inflammatory cytokines and related genes are induced in the rat hippocampus by limbic status epilepticus.** *European Journal of Neurosciences* (2000) Vol 12, pp. 2623-2633.

DEDEURWAERDERE, S., FRIEDMAN, A., FABENE, P. F., MAZARATI, A., MURASHIMA, Y. L., VEZZANI, A., BARAM, T. Z. **Finding a better drug for epilepsy: antiinflammatory targets.** *Epilepsia.* 2012 Jul;53(7):1113-8.

DUBÉ, C. M., BREWSTER, A. L., RICHICHI, C., ZHA, Q., BARAM, T. Z. **Fever, febrile seizures and epilepsy.** *Trends in Neurosciences* (2007) 30(10), 490–496.

- DUNCAN, J. S., SANDER, J. W., SISODIYA, S. M., WALKER, M. C. **Adult epilepsy.** Lancet 367 (2006) 1087–1100.
- ENGEL, J. JR., PEDLEY, T.A. **Introduction: what is epilepsy?** Epilepsy: A Comprehensive Textbook Lippincott-Raven Publishers (1997) p. 1-7.
- ERIKSSON, C., TEHRANIAN, R., IVERFELDT, K., WINBLAD, B., schultzberg, M. **Increased expression of mRNA encoding interleukin-1beta and caspase-1, and the secreted isoform of interleukin-1 receptor antagonist in the rat brain following systemic kainic acid administration.** J Neurosci Res (2000) 60:266–79.
- FELLIN, T., GOMEZ-GONZALO, M., GOBBO, S., CARMIGNOTO, G., HAYDON, P.G. **Astrocytic glutamate is not necessary for the generation of epileptiform neuronal activity in hippocampal slices.** J. Neurosci. (2006) 26, 9312–9322
- FERNANDES, M. J. S. **Epilepsia do lobo temporal: mecanismos e perspectivas.** Estudos avançados (2013) 27 (77).
- GILBERT, M. E., GOODMAN, J. H. **Chemical Kindling.** Models of Seizures and Epilepsy. (2006) Pages 379–393
- GITAÍ, D. L., PEREIRA, R. N. M., GITAÍ, L. L. G., LEITE, J. P., CAIRASCO, N. G., LARSON, M. L. P. **Genes e epilepsia I: epilepsia e alterações genéticas.** Rev Assoc Med Bras 2008; 54(3): 272-8
- GODDARD, G.V. **Development of epileptic seizures through brain stimulation at low intensity.** Nature (1967); 214: 1020–1.
- GODDARD, G.V., MCINTYRE, D.C., LEECH, C. **A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation.** Experimental Neurology (1969) 25: 295–330
- GORTER, J. A., VLIET, E. A., ARONICA, E. **Status epilepticus, blood–brain barrier disruption, inflammation, and epileptogenesis.** Epilepsy & Behavior 49 (2015) 13–16
- HALL, C.S. **Emotional behavior in the rat: I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality.** J. Comp. Psychol. (1934) 18: 385–403.
- HART, Y.M., CORTEZ, M., ANDERMANN, F., HWANG, P., FISH, D.R., DULAC, O., **Medical treatment of Rasmussen’s syndrome (chronic encephalitis and epilepsy): effect of high-dose steroids or immunoglobulins in 19 patients.** Neurology (1994);44:1030— 6

HAUSER, W.A., RICH, S.S., LEE, J.R., ANNEGERS, J.F., ANDERSON, V.E. **Risk of recurrent seizures after two unprovoked seizures.** N Engl J Med (1998) 338: 429–34.

HEIDA, J.G., PITTMAN, Q.J., **Causal links between brain cytokines and experimental febrile convulsions in the rat.** Epilepsia (2005) 46, 1906—1913.

HOLTMANN, L., VLIET, E. A., ARONICA, E., WOUTERS, D., WADMAN, W. J., GORTER, J. A. **Blood plasma inflammation markers during epileptogenesis in post-status epilepticus rat model for temporal lobe epilepsy.** Epilepsia. (2013) Apr;54(4):589-95

HU, S., SHENG, W.S., EHRLICH, L.C., PETERSON, P.K., CHAO, C.C. **Cytokine effects on glutamate uptake by human astrocytes.** Neuroimmunomodulation (2000);7:153–159.

IZQUIERDO, I. **Different forms of posttraining memory processing.** Behavioral and Neural Biology (1989) 51: 171-202.

JUNIOR, V. H. C. **Efeitos da dexametasona em parâmetros neuroquímicos em camundongos submetidos ao modelo de convulsão induzida por ácido quinolínico.** Porto Alegre, 2007. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Universidade Federal do Rio Grande do Sul

KALUEFF, A.V. **Grooming and stress.** KSF Publishers, Kiv. 2002

KAMM, K., VANDERKOLK, W., LAWRENCE, C., JONKER, M., DAVIS, A.T. **The effect of traumatic brain injury upon the concentration and expression of interleukin-1beta and interleukin-10 in the rat.** J Trauma (2006) 60:152– 157.

KULKARNI, S. K., GEORGE, B. **Pentylentetrazol-induced kindling in Animals: Protective Effect of BR-16A.** Indian Journal of Experimental Biology (1995): (33), June, 424-427

KWAN, P., BRODIE, M. J. **Neuropsychological effects of epilepsy and antiepileptic drugs.** The Lancet (2001) Vol 357.

LAZAROVA, M. B., PETKOV, V. V., GENKOVA, M. P. **Effect of diazepam and medazepam on pentylentetrazol kindling in albino rats.** Acta Physiol Pharmacol Bulg. 1990;16(2):37-41.

LEAL, M.M.T. **Avaliação do potencial antiinflamatório das células mononucleares de medula óssea em camundongos com epilepsia induzida por cloreto de pilocarpina.** Salvador: 2011. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Estadual de Feira de Santana.

LEHTIMAKI, K.A, KERANEN, T., PALMIO, J., MAKINEN, R., HURME, M., HONKANIEMI, J., PELTOLA, J. **Increased plasma levels of cytokines after seizures in localization-related epilepsy.** Acta Neurol Scand (2007) 116:226–230.

LI, G., BAUER, S., NOWAK, M., NORWOOD, B., HAMER, H. **Cytokines and epilepsy.** *Seizure* 20 (2011) 249–256.

LU, M. O., ZHANG, X. M., MIX, E., QUEZADA, H. C., JIN, T., ZHU, J., ADEM, A. **TNF-alpha receptor 1 deficiency enhances kainic acid-induced hippocampal injury in mice.** *Journal of Neuroscience Research* (2008) 86:1608–1614

LÜTTJOHANN, A., FABENE, P. F., LUIJTELAAR, G. **A revised Racine's scale for PTZ-induced seizures in rats.** *Physiology & Behavior* 98 (2009) 579–586

MARCHETTI, R. L. **Transtornos mentais associados à epilepsia.** *J. Rev. Psiqu. Clín.* (2005) v.32, n.3, p.170-182.

MARCHI, N., FAN, Q., GHOSH, C., FAZIO, V., BERTOLINI, F., BETTO, G., BATRA, A., CARLTON, E., NAJM, I., GRANATA, T., JANIGRO, D. **Antagonism of peripheral inflammation reduces the severity of status epilepticus.** *Neurobiol Dis* (2009) 33:171–181.

MARCHI, N., GRANATA, T., FRERI, E., CIUSANI, E., RAGONA, F., JANIGRO, D. **Efficacy of Anti-Inflammatory Therapy in a Model of Acute Seizures and in a Population of Pediatric Drug Resistant Epileptics.** *PLoS One.* 2011; 6(3): e18200.

MAROSO, M. BALOSSO, M., RAVIZZA, T., LIU, J., ARONICA, E., IYER, M. E., ROSETTI, C., MOLTENI, M., CASALGRANDI, M., MANFREDI, A. A., BIANCHI, M. E., VEZZANI, A. **Toll-like receptor4 and high mobility group box 1 are involved in ictogenesis and can be targeted to reduce seizures.** *Nat Med.*(2010) 16; 413-419.

Ministério da Saúde. **Formulário Terapêutico Nacional.** Brasília, DF – 2010.

MIZUNO, K., MORIZANE, S., TAKIGUCHI, T., IWATSUKI, K. **Dexamethasone but not tacrolimus suppresses TNF-a-induced thymic stromal lymphopoietin expression in lesional keratinocytes of atopic dermatitis model.** *Journal of Dermatological Science* (2015) Oct;80(1):45-53.

MUSTAFA, M. M., RAMILO, O., OLSEN, K. D., MAGNESS, R. R. **Cerebrospinal fluid prostaglandins, interleukin 1 beta, and tumor necrosis factor in bacterial meningitis. Clinical and laboratory correlations in placebo-treated and dexamethasone-treated patients.** *Am J Dis Child.* (1990) Aug;144(8):883-7

NUTT, D.J., COWEN, P.J., BATTIS, C.C., GRAHAME-SMITH, D.G., GREEN, A.R. **Repeated administration of subconvulsant doses of GABA antagonist drugs. I. Effects on seizure threshold (Kindling).** *Psychopharmacology* (1982) 76: 84–87.

OWOLABI, M. **Rasmussen's Encephalitis: An Overview.** InTechOpen, Published on: 2011-12-09.

PERUCCA, E. **Pharmacological and therapeutic properties of valproate: a summary after 35 years of clinical experience.** *CNS Drugs*. 2002;16(10):695-714.

PERUCCA, E., FRENCH, J., BIALER, M. **Development of new antiepileptic drugs: challenges, incentives, and recent advances.** *Lancet Neurol* (2007); 6: 793–804

PERUCCA, E., TOMSON, T. **The pharmacological treatment of epilepsy in adults.** *Lancet Neurol* (2011); 10: 446–56

PINEL, J.P., CHEUNGG, K.F. **Controlled demonstration of metrazol kindling.** *Pharmacol Biochem Behav* (1977) 6: 599–600.

RACINE, R.; OKUJAVA, V.; CHIPASHVILI, S. **Modification of seizure activity by electrical stimulation: III. Mechanisms.** *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, (1972) 32(3):295-9.

RAINE, C.S. **Multiple sclerosis: TNF revisited, with promise.** *Nat Med* (1995) 1:211–214.

RAMIREZ, K., NIRLA, A., SHERIDAN, J. F. **GABAergic modulation with classical benzodiazepines prevent stress-induced neuro-immune dysregulation and behavioral alterations.** *Brain Behav Immun*. (2015) S0889-1591(15)00467-5

RAO, R.S., MEDHI, B., SAIKIA, U.N., ARORA, S.K., TOOR, J.S., KHANDUJA, K.L., PANDHI, P., **Experimentally induced various inflammatory models and seizure: understanding the role of cytokine in rat.** *Eur. Neuropsychopharmacol*. (2008)18, 760—767.

RAVIZZA, T., BALOSSO, S., ARONICA, E., VEZZANI, A. **Epilepsy: Mechanisms, Models, and Translational Perspectives** (CRC Press, Boca Raton, (2010) 45–59.

RAVIZZA, T. GAGLIARDI, B., NOÉ, F., BOER, K., ARONICA, E., VEZZANI, A. **Innate and adaptive immunity during epileptogenesis and spontaneous seizures: Evidence from experimental models and human temporal lobe epilepsy.** *Neurobiology of Disease* 29 (2008) 142–160

RAVIZZA, T., BOER, K., REDEKER, S., SPLIET, W.G., RIJEN, P.C., TROOST, D., VEZZANI, A., ARONICA, E. **The IL-1 β system in epilepsy-associated malformations of cortical development.** *Neurobiol. Dis*. (2006) 24, 128—143.

RAVIZZA, T., KOUSTOULA, C., VEZZANI, A. **Immunity Activation in Brain Cells in Epilepsy: Mechanistic Insights and Pathological Consequences.** *Neuropediatrics* (2013);44:330–335.

RAVIZZA, T., VEZZANI, A. **Status epilepticus induces time-dependent neuronal and astrocytic expression of interleukin-1 receptor type I in the rat limbic system.** *Neuroscience* 137 (2006) 301–308

RIAZI, K., GALIC, M. A., PITTMAN, Q. J. **Contributions of peripheral inflammation to seizure susceptibility: Cytokines and brain excitability.** *Epilepsy Research* (2009) 89, 34—42

RHO, J. M., SANKAR, R., STAFSTROM, C. E. **Epilepsy: Mechanisms, Models, and Translational Perspectives.** CRC Press. 4th edition, 2010.

RODRIGUES, A. D., SCHEFFEL, T. B., SCOLA, G., SANTOS, M. T., DOS, F. B., FREITAS, S. C. V., SALVADOR, M. **Neuroprotective and anticonvulsant effects of organic and conventional purple grape juices on seizures in Wistar rats induced by pentylentetrazole.** *Neurochemistry International* (2012) 60(8), 799–805.

SANTOS, C. L., RAFACHO, A., BOSQUEIRO, J. R. **Efeitos da administração de dexametasona in vivo sobre glicemia, insulinemia e substratos circulantes são dependentes do tempo de tratamento.** *Biosci. J., Uberlândia* (2007) v. 23, n. 3, p. 101-110.

SAYYAH, M., JAVAD-POUR, M., GHAZI-KHANSARI, M. **The bacterial endotoxin lipopolysaccharide enhances seizure susceptibility in mice: involvement of proinflammatory factors: nitric oxide and prostaglandins.** *Neuroscience* (2003) 122, 1073—1080

SCHACHTER, S. C. **Drug-mediated antiepileptogenesis in humans.** *Neurology* (2002) Nov 12;59(9 Suppl 5):S34-5. Review

SILVA, A. V., CABRAL, S. R. **Ictogênese, Epileptogênese e Mecanismo de Ação das Drogas na Profilaxia e Tratamento da Epilepsia.** *J Epilepsy Clin Neurophysiol* 2008; 14(Suppl 2):39-45.

SILVA, A. V., CAVALHEIRO, E. A. **Epilepsia: uma janela para o cérebro.** *Multi Ciência: A Mente Humana # 3* (2004).

SILVA, S. R. F. **Farmacocinética do diazepam.** Porto: 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Fernando Pessoa.

SINHA, S., PATIL, S. A., JAYALEKSHMY, V., SATISHCHANDRA, P. **Do cytokines have any role in epilepsy?** *Epilepsy Research* (2008) 82(2-3), 171–176.

SUN, X. Y., WEI, C. X., DENG, X. Q., SUN, Z. G., QUAN, Z. S. **Evaluation of the anticonvulsant activity of 6-(4-chlorophenoxy)-tetrazolo[5,1-a]phthalazine in various experimental seizure models in mice.** *Pharmacological Reports* (2010) 62(2), 273–277.

TAVARES, A. L. A., FIORIO, P. P., BERNARDI, S. T., BONI, V. H. **O perfil da epilepsia no Brasil.** *Anais II Congresso de Pesquisa e Extensão da FSG. V.2, N.2* (2014), 822-825.

TOMOUM, H.Y., BADAWEY, N.M., MOSTAFA, A.A., HARB, M.Y. **Plasma interleukin-1beta levels in children with febrile seizures.** *J Child Neurol* (2007) 22:689–692.

VEZZANI, A. BALOSSO, A., RAVIZZA, T. **Inflammation and Epilepsy.** *Handbook of Clinical Neurology* (2012) Volume 107, Pages 163-175.

VEZZANI, A. BALOSSO, A., RAVIZZA, T. **The role of cytokines in the pathophysiology of epilepsy.** *Brain, Behavior, and Immunity* 22 (2008) 797–803

Vezzani, A., CONTI, M., DE LUIGI, A., RAVIZZA, T., MONETA, D., MARCHESI, F. **Interleukin-1beta immunoreactivity and microglia are enhanced in the rat hippocampus by focal kainate application: functional evidence for enhancement of electrographic seizures.** *J Neurosci* (1999)19:5054–65.

VEZZANI, A. **Epilepsy and Inflammation in the Brain: Overview and Pathophysiology.** *Epilepsy Currents* (2014) Vol. 14, No. 1 Supplement pp. 3–7

VEZZANI, A., FRIEDMAN, A., BARTFAL, T. BARAM, T. Z. **The role of inflammation in epilepsy.** *Nature Rev. Neurol.* (2011) 7, 31–40.

VEZZANI, A., FRIEDMAN, A., DINGLEDINE, R. J. **The role of inflammation in epileptogenesis.** *Neuropharmacology* (2013) 69(1), 16–24.

VEZZANI, A., GRANATA, T. **Brain Inflammation in Epilepsy: Experimental and Clinical Evidence, Brain Inflammation in Epilepsy: Experimental and Clinical Evidence.** *Epilepsia* (2005) 46(11), 1724–1743.

VIVIANI, B., BARTESAGHI, S., GARDONI, F. **Interleukin-1beta enhances NMDA receptor-mediated intracellular calcium increase through activation of the Src family of kinases.** *J Neurosci* (2003);23:8692–700

WANG, S., CHENG, Q., MALINK, S., YANG, J.. **Interleukin-1beta inhibits gammaaminobutyric acid type A (GABA(A)) receptor current in cultured hippocampal neurons.** *J Pharmacol Exp Ther* (2000);292:497–504.

WORLD HEALTH ASSEMBLY. **Global burden of epilepsy and the need for coordinated action at the country level to address its health, social and public knowledge implications.** 136th session EB136.R8 Agenda item 6.6. February, 2015.

World Health Organization. **Epilepsy.** 2015

YUHAS, Y., WEIZMAN, A., ASHKENAZI, S. **Bidirectional concentration-dependent effects of tumor necrosis factor alpha in Shigella dysenteriae-related seizures.** *Inf Immun* (2003);71:2288–91.

ZHAO, M., CRIBBS, D.H., ANDERSON, A.J., CUMMINGS, B.J., SU, J.H., WASSERMAN, A.J., COTMAN, C.W. **The induction of the TNFa death domain**

signaling pathway in Alzheimer's disease brain. *Neurochem Res* (2003). 28:307–318.

ZHU, B. G., ZHU, D. H., CHEN, Y. Z. **Rapid enhancement of high affinity glutamate uptake by glucocorticoids in rat cerebral cortex synaptosomes and human neuroblastoma clone SK-N-SH: possible involvement of G-protein.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* (1998) 247(2), 261–265